



HAL
open science

Surveillance et épidémiologie d'*Echinococcus multilocularis* et d'*Echinococcus granulosus sensu lato*

Gérald Umhang

► **To cite this version:**

Gérald Umhang. Surveillance et épidémiologie d'*Echinococcus multilocularis* et d'*Echinococcus granulosus sensu lato*. Zootechnie. Université Paris-Est, 2017. Français. NNT : 2017PESC1210 . tel-01757050

HAL Id: tel-01757050

<https://theses.hal.science/tel-01757050>

Submitted on 3 Apr 2018

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

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



THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Université Paris Est
Spécialité : Science de la Vie et de la Santé

présentée et soutenue publiquement par

Gérald UMHANG

le 28 juin 2017

Surveillance et épidémiologie moléculaire
d'*Echinococcus multilocularis*
et d'*Echinococcus granulosus sensu lato*

Directeur de thèse : **Nadia HADDAD**

Jury

Bruno GOTTSTEIN, Professeur, Université de Berne
Benoît DURAND, Directeur de recherche, Anses de Maisons-Alfort
Jacques CABARET, Directeur de recherche, INRA de Tours
Frédéric GRENOUILLET, Professeur, CHU de Besançon

Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur

Anses, laboratoire de la rage et de la faune sauvage de Nancy
Unité de surveillance et d'éco-épidémiologie des animaux sauvages
Laboratoire national de référence *Echinococcus spp.*
Technopôle agricole et vétérinaire de Pixérécourt
54220 Malzéville

Remerciements :

Je voudrai remercier toutes les personnes qui ont pu prendre une part au cours de ces 10 années de travaux passionnantes sur ce petit ver dont je n'avais pourtant jamais entendu parler avant ma candidature à ce poste.

Je tiens à adresser un très grand merci à Nadia Haddad pour avoir accepté l'encadrement de cette thèse et cela malgré la distance en étant toujours très concernée, bienveillante et en sachant me faire profiter de ces conseils très pertinents.

Merci beaucoup à Bruno Gottstein et Benoît Durand d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et d'en évaluer la qualité scientifique. Merci également à Frédéric Grenouillet et Jacques Cabaret pour leur participation au jury en tant qu'examineurs.

Je tiens également à remercier l'Anses pour m'avoir permis de réaliser cette thèse sur travaux dans le cadre de la formation personnelle.

Je remercie la directrice Elodie Monchâtre pour son soutien dans le cadre de cette thèse ainsi que tous les agents du LRFSN avec qui j'ai partagé mon quotidien au laboratoire.

Un énorme merci à Franck Boué pour son soutien et son accompagnement depuis mon arrivée au laboratoire. Merci aussi de m'avoir encouragé et accordé toute la liberté nécessaire pour mener à bien ce projet en parallèle de mes activités au sein de l'unité SEEPIAS.

Un merci particulier aux agents de l'unité SEEPIAS (anciennement URRME puis UPAS) pour avoir participé à ses différents travaux. Merci forcément à l'équipe labo : Vanessa, Jean-Marc, Christophe et Carine qui ont réalisés l'ensemble des analyses des travaux menés au LNR, du grattage d'intestins jusqu'à la PCR temps réel, permettant d'obtenir tous ces résultats. Merci également à l'équipe terrain : Jean-Mi et Christophe pour les collectes de fèces, comptage aux phares et autres piégeage de rongeurs qui ont si souvent constitué le matériel biologique indispensables à ces études.

Un grand merci à Céline Richomme pour m'avoir incité à cette démarche de doctorat mais encore plus pour m'avoir guidé sans relâche depuis son arrivée à travers le monde de l'épidémiologie et m'avoir fait bénéficier de ses précieux conseils.

Merci à Marie Moinet, collègue de bureau pendant presque 10 ans, et qui a supporté mes monologues quotidien sans rechigner (enfin jusqu'à préférer l'exil en Nouvelle-Zélande !).

Un merci particulier pour Marie-José Duchêne en raison de tout le travail de documentation et de bibliographie réalisé au cours de ces 10 ans qui m'aura été indispensable et très profitable.

Je remercie aussi les collaborateurs avec qui j'ai souvent travaillé et qui m'ont beaucoup apporté : Benoît, Vincent, Stéphanie et Sébastien de l'ELIZ ; Jenny, Fred, Patrick et Francis de Besançon ; mais aussi les collaborateurs plus ponctuels : Jennifer, Marie-Lazarine, Matthieu ; mais aussi ceux de l'étranger : Myriam et Selim, Adriano, Jacek et Oleg ; et également les laboratoires vétérinaires départementaux, les fédérations de chasseurs et la DGAI.

Merci également à tous les stagiaires d'IUT et de Master pour leurs contributions et dont l'encadrement m'a été très profitable.

Merci aussi aux potes du foot de Laxou de m'offrir une décompression indispensable et irremplaçable (malgré que certains pensent que je ne suis qu'un compteur nocturne de renards !).

Je ne peux que remercier mes parents pour m'avoir toujours soutenu et permis mon parcours scolaire et universitaire.

Merci à mon frère qui m'a certainement guidé même involontairement dans cette voie de la biologie nous permettant de discuter encore maintenant de PCR et de microsatellites.

Un merci forcément à Marie pour sa présence, son soutien sans faille, ses conseils, pour tout ...

Merci Charlie d'être si fière d'avoir « un papa qui travaille sur les renards ».

Merci Robin d'être venu agrémente de ton sourire la période de rédaction de ce manuscrit.

Liste des publications scientifiques internationales sur le sujet :

- M., Banda, F., Mbaya, H., Aschenborn, J., Aschenborn, O., Koskei, P., **Umhang, G.**, De La Rue, M., Elmahdi, I.E., Mackenstedt, U., Kern, P. and Romig, T., 2016. Genetic polymorphism and population structure of *Echinococcus ortleppi*. *Parasitology* 144, 450-458.
- *Addy, F., Wassermann, D. Kagendo, D.Ebi, E. Zeyhle, I.E. Elmahdi, **G. Umhang**, A. Casulli, M.F. Harandi, O. Aschenborn, P. Kern, U. Mackenstedt, T. Romig, 2017. Genetic differentiation of the G6/7 cluster of *Echinococcus canadensis* based on mitochondrial marker genes. *International Journal of Parasitology*, In Press.
- *Afonso, E., Knapp, J., Tête, N., **Umhang, G.**, Rieffel, D., van Kesteren, F., Ziadinov, I., Craig, P.S., Torgerson, P.R. and Giraudoux, P., 2015. *Echinococcus multilocularis* in Kyrgyzstan: similarity in the Asian EmsB genotypic profiles from village populations of Eastern mole voles (*Ellobius tancrei*) and dogs in the Alay valley. *Journal of Helminthology* 89, 664–670.
- Boué, F., El Berbri, I., Hormaz, V., Boucher, J.-M., El Mamy, A.B., Traore, A., Fassi Fihri, O., Petavy, A.-F., Dakkak, A. and **Umhang, G.**, 2017. Use of FTA® card methodology for sampling and molecular characterization of *Echinococcus granulosus sensu lato* in Africa. *Experimental Parasitology* 173, 29-33.
- *Boufana, B., **Umhang, G.**, Qiu, J., Chen, X., Lahmar, S., Boue, F., Jenkins, D. and Craig, P., 2013. Development of three PCR assays for the differentiation between *Echinococcus shiquicus*, *E. granulosus* (G1 genotype), and *E. multilocularis* DNA in the co-endemic region of Qinghai-Tibet plateau, China. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 88, 795-802.
- Chihai, O., **Umhang, G.**, Erhan, D., Boue, F., Talambuta, N., Rusu, S. and Zamornea, M., 2016. Slaughterhouse survey of cystic echinococcosis in cattle and sheep from the Republic of Moldova. *Journal of Helminthology* 90, 279-283.
- Combes, B., Comte, S., Raton, V., Raoul, F., Boue, F., **Umhang, G.**, Favier, S., Dunoyer, C., Woronoff, N. and Giraudoux, P., 2012. Westward spread of *Echinococcus multilocularis* in foxes, France, 2005–2010. *Emerging Infectious Diseases* 18, 2059-2062.
- Comte, S., Raton, V., Raoul, F., Hegglin, D., Giraudoux, P., Deplazes, P., Favier, S., Gottschek, D., **Umhang, G.**, Boué, F., Combes B. Fox baiting against *Echinococcus multilocularis*: contrasted achievements among two medium size cities. *Preventive Veterinary Medicine*, 2013, 111(1-2), 147-155.
- Comte, S., **Umhang, G.**, Raton, V., Raoul, F., Giraudoux, P., Combes, B. and Boué, F. *Echinococcus multilocularis* management by fox culling: an inappropriate paradigm. *Soumis à Preventive Veterinary Medicine* en octobre 2016.
- *Debourgogne, A., Goehringer, F., **Umhang, G.**, Gauchotte, G., Henard, S., Boue, F., May, T. and Machouart, M., 2014. Primary cerebral alveolar echinococcosis: Mycology to the rescue. *Journal of Clinical Microbiology* 52, 692-694.
- *Debourgogne, A., Blanchet, D., Fior, A., **Umhang, G.**, Simon, S. and Aznar, C., 2017. Neotropical echinococcosis caused by *Echinococcus vogeli* in a 6-year-old child: the second case report in humans in French Guiana. *Paediatrics and International Child Health* 37, 63-65.
- El Berbri, I., Petavy, A.F., **Umhang, G.**, Bouslikhane, M., Fassi Fihri, O., Boue, F. and Dakkak, A., 2015. Epidemiological investigations on cystic echinococcosis in North-West (Sidi Kacem province) Morocco: Infection in ruminants. *Advances in Epidemiology*, (ID104025), 1-9.
- Grenouillet, F., **Umhang, G.**, Arbez-Gindre, F., Mantion, G., Delabrousse, E., Millon, L. and Boue, F., 2014. *Echinococcus ortleppi* infections in humans and cattle, France. *Emerging Infectious Diseases* 20, 2100-2102.
- Karamon, J., Samorek-Pieróg, M., Kochanowski, M., Dąbrowska, J., Sroka, J., Gołąb, E., **Umhang, G.** and Cencek, T., 2016. First detection of *Echinococcus multilocularis* in dogs in a highly endemic area of Poland. *Folia Parasitologica (Praha)* 63, 1-5
- *Kinkar, L., Laurimäe, T., Sharbatkhori, M., Mirhendi, H., Kia, E.B., Ponce-Gordo, F., Andresiuk, V., Simsek, S., Lavikainen, A., Irshadullah, M., **Umhang, G.**, Oudni-M'rad, M., Acosta-Jamett, G., Rehbein, S. and Saarma, U., 2017. New mitogenome and nuclear evidence on the phylogeny and taxonomy of the highly zoonotic tapeworm *Echinococcus granulosus sensu stricto*. *Infection, Genetics and Evolution*, sous presse.

- Knapp, J., Millon, L., Mouzon, L., **Umhang, G.**, Raoul, F., Said Ali, Z., Combes, B., Comte, S., Gbaguidi-Haore, H., Grenouillet, F. and Giraudoux, P., 2014. Real time PCR to detect the environmental faecal contamination by *Echinococcus multilocularis* from red fox stools. *Veterinary Parasitology* 201, 40-47.
- Knapp, J., **Umhang, G.**, Poulle, M.L. and Millon, L., 2016. Development of a real-time PCR for a sensitive one-step copro-diagnosis allowing both the identification of carnivore feces and the detection of *Toxocara spp.* and *Echinococcus multilocularis*. *Applied Environmental Microbiology* 82, 2950-2958.
- *Knapp, J., Combes, B., **Umhang, G.**, Aknouche, S. and Millon, L., 2016. Could the domestic cat play a significant role in the transmission of *Echinococcus multilocularis*? A study based on qPCR analysis of cat feces in a rural area in France. *Parasite* 23, 1-7.
- *Laurimaa, L., Suld, K., Moks, E., Valdmann, H., **Umhang, G.**, Knapp, J. and Saarma, U., 2015. First report of the zoonotic tapeworm *Echinococcus multilocularis* in raccoon dogs in Estonia, and comparisons with other countries in Europe. *Veterinary Parasitology* 212, 200-205.
- Umhang, G.**, Woronoff-Rhen, N., Combes, B. and Boue, F., 2011. Segmental sedimentation and counting technique (SSCT): an adaptable method for qualitative diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in fox intestines. *Experimental Parasitology* 128, 57-60.
- Umhang, G.**, Raton, V., Comte, S., Hormaz, V., Boucher, J.-M., Combes, B. and Boué, F., 2012. *Echinococcus multilocularis* in dogs from two French endemic areas: No evidence of infection but hazardous deworming practices. *Veterinary Parasitology* 188, 301-305.
- Umhang, G.**, Lahoreau, J., Nicolier, A. and Boue, F., 2013. *Echinococcus multilocularis* infection of a ring-tailed lemur (*Lemur catta*) and a nutria (*Myocastor coypus*) in a French zoo. *Parasitology International* 62, 561-563.
- Umhang, G.**, Richomme, C., Boucher, J.M., Guedon, G. and Boue, F., 2013. Nutrias and muskrats as bioindicators for the presence of *Echinococcus multilocularis* in new endemic areas. *Veterinary Parasitology* 197, 283-287.
- Umhang, G.**, Richomme, C., Boucher, J.M., Hormaz, V. and Boué, F., 2013. Prevalence survey and first molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in France. *Parasitology Research* 112, 1809-1812.
- Umhang, G.**, Chihai, O. and Boue, F., 2014. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in a hyperendemic European focus, the Republic of Moldova. *Parasitology Research* 113, 4371-4376.
- Umhang, G.**, Comte, S., Raton, V., Hormaz, V., Boucher, J.M., Favier, S., Combes, B. and Boue, F., 2014. *Echinococcus multilocularis* infections in dogs from urban and peri-urban areas in France. *Parasitology Research* 113, 2219-2222.
- Umhang, G.**, Knapp, J., Hormaz, V., Raoul, F. and Boue, F., 2014. Using the genetics of *Echinococcus multilocularis* to trace the history of expansion from an endemic area. *Infection, Genetics and Evolution* 22, 142-149.
- Umhang, G.**, Richomme, C., Hormaz, V., Boucher, J.M. and Boue, F., 2014. Pigs and wild boar in Corsica harbor *Echinococcus canadensis* G6/7 at levels of concern for public health and local economy. *Acta Tropica* 133, 64-68.
- Umhang, G.**, Forin Wiart, M.-A., Hormaz, V., Caillot, C., Boucher, J.-M., Poulle, M.-L. and Boue, F., 2015. *Echinococcus multilocularis* detection in the intestines and feces of free-ranging domestic cats (*Felis s. catus*) and European wildcats (*Felis s. silvestris*) from northeastern France. *Veterinary Parasitology* 214, 75-79.
- Umhang, G.**, Comte, S., Hormaz, V., Boucher, J.M., Raton, V., Favier, S., Raoul, F., Giraudoux, P., Combes, B. and Boue, F., 2016a. Retrospective analyses of fox feces by real-time PCR to identify new endemic areas of *Echinococcus multilocularis* in France. *Parasitology Research* 115, 4437-4441.
- Umhang, G.**, Lahoreau, J., Hormaz, V., Boucher, J.-M., Guenon, A., Montange, D., Grenouillet, F. and Boue, F., 2016. Surveillance and management of *Echinococcus multilocularis* in a wildlife park. *Parasitology International* 65, 245-250.
- ***Umhang, G.**, Bastien M., Renault C., Faisse M., Caillot C., Boucher J.-M., Hormaz H., Poulle M.-L. and Boué F. Development of a flotation/sieving method to detect *Echinococcus multilocularis* and *Toxocara spp.* eggs by real-time PCR in soil samples. *Parasite*, in Press.
- Umhang, G.**, Karamon K., Hormaz V., Knapp J., Cencek T. and Boué F. A step forward in the understanding of the presence and expansion of *Echinococcus multilocularis* in Eastern Europe using microsatellite EmsB genotyping in Poland; *Infection, Genetics and Evolution*, in Press.
- ***Umhang, G.**, Grenouillet, F., Hormaz, V., M'Rad, S., Valot, B., Oudni-M'Rad, M., Babba, H. and Boué F. Investigating the genetic diversity of *Echinococcus granulosus sensu stricto* with new microsatellites Soumis à *Parasitology* en avril 2017.

Valot, B., Knapp, J., **Umhang, G.**, Grenouillet, F. and Millon, L., 2015. Genomic characterization of EmsB microsatellite loci in *Echinococcus multilocularis*. *Infection, Genetics and Evolution* 32, 338-341.

Zait H., Kouidri M., Grenouillet FE., **Umhang G.**, Millon L., Hamrioui B., Grenouillet F. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus sensu stricto* and *Echinococcus canadensis* in humans and livestock from Algeria. *Parasitological Research*, 2016, 115(6):2423-2431.

* : indique les articles non détaillés dans le manuscrit

Liste des articles scientifiques nationaux sur le sujet :

- *Boue, F., Combes, B., Giraudoux, P. and **Umhang, G.**, 2010. *Echinococcus multilocularis* chez le renard et les carnivores domestiques : vers une nouvelle donne épidémiologique ? Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, (hors série), 21-23.
- Combes, B., Comte, S., Raton, V., Raoul, F., Boue, F., **Umhang, G.**, Favier, S., Dunoyer, C., Woronoff-Rehn, N. and Giraudoux, P., 2013. Expansion géographique du parasite *Echinococcus multilocularis* chez le renard en France. Bulletin Epidémiologique, Santé Animale et Alimentation, (57), 16-18.
- Grech-Angelini, S., **Umhang, G.**, Richomme, C., Maestriani, O., Peytavin de Garam, C., Boucher, J.M., van Cauteren, D., Grenouillet, F., Casabianca, F. and Boue, F., 2015. Échinococcose kystique en Corse : identification d'*Echinococcus canadensis* chez le chien. Bulletin Epidémiologique, Santé Animale et Alimentation, (69), p 27.
- Umhang, G.**, Richomme, C. and Boue, F., 2012. L'hydatidose porcine en Corse : épidémiologie et caractérisation moléculaire. Bulletin Epidémiologique, Santé Animale et Alimentation, (48), 6-9.
- Umhang, G.**, Hormaz, V., Peytavin, C., Boucher, J.M., Itié-Hafez, S., Danan, C. and Boue, F., 2014. Epidémiologie et surveillance d'*Echinococcus granulosus* à l'abattoir : résultats du plan de surveillance 2012. Bull. Epidémiologique, Santé Animale et Alimentation, (62), 8-12.
- ***Umhang, G.**, Richomme, C. and Boue, F., 2014. Surveillance d'*Echinococcus* spp. en France : la faune sauvage sentinelle. Bulletin Epidémiologique, Santé Animale et Alimentation, (61), 2-4.
- Umhang, G.**, Knapp, J., Hormaz, V., Raoul, F. and Boue, F., 2016. Proposition d'un scénario spatio-temporel de l'expansion d'*E. multilocularis* en France grâce à la génétique. Bulletin Epidémiologique Santé Animale et Alimentation, (76), 14-18.
- ***Umhang, G.**, Danan, C. and Boue, F., 2016. *Echinococcus granulosus* : révision taxonomique pour un ténia zoonotique. Point Vétérinaire, (366), 62-63.
- ***Umhang, G.**, Danan, C. and Boue, F., 2016. Hydatidose et *Echinococcus granulosus* : nouveaux éléments épidémiologiques. Point Vétérinaire, (366), 56-61.

* : indique les articles non détaillés dans le manuscrit

Tables des matières

1. Introduction générale	20
2. Les échinocoques	22
2.1. Morphologie et cycle	22
2.1.1. Morphologie générale	22
2.1.1.1. Le stade adulte	22
2.1.1.2. Le stade œuf	22
2.1.1.3. Le stade larvaire	23
2.1.2. Le cycle général des échinocoques	23
2.2. Taxonomie et phylogénie du genre <i>Echinococcus</i>	25
2.3. Particularités morphologiques et diversité génétique d' <i>E. multilocularis</i> et d' <i>E. granulosus s.l.</i>	27
2.3.1. <i>Echinococcus multilocularis</i>	27
2.3.2. <i>Echinococcus granulosus sensu lato</i>	28
2.3.2.1. Evolution de la taxonomie du groupe	28
2.3.2.2. Description du stade adulte	30
2.3.2.3. Description des espèces d' <i>E. granulosus s.l.</i> et de leur diversité génétique	30
2.4. Cycles parasitaires et distribution géographique des échinocoques	31
2.4.1. Les espèces non européennes : <i>E. shiquicus</i> , <i>E. oligarthrus</i> , <i>E. vogeli</i> , et <i>E. felidis</i>	31
2.4.2. <i>E. multilocularis</i>	32
2.4.3. <i>E. granulosus sensu lato</i>	33
2.4.3.1. <i>E. granulosus sensu stricto</i>	33
2.4.3.2. <i>E. equinus</i>	34
2.4.3.3. <i>E. ortleppi</i>	35
2.4.3.4. <i>E. canadensis</i>	35
2.5. Aspects médicaux et potentiel zoonotique	36
2.5.1. Les espèces néotropicales : <i>Echinococcus vogeli</i> et <i>Echinococcus oligarthra</i>	36
2.5.2. <i>Echinococcus shiquicus</i>	37
2.5.3. <i>Echinococcus multilocularis</i>	37
2.5.4. <i>Echinococcus granulosus sensu lato</i>	38
3. Techniques de diagnostic et/ou de dépistage chez l'animal	39
3.1. Présentation	39
3.2. Dépistage chez l'hôte définitif	39
3.2.1. Analyses du contenu intestinal	39
3.2.2. Analyses coprologiques	40
3.2.2.1. Détection de copro-antigènes	40

3.2.2.2.	Détection de copro-ADN	41
3.2.3.	Autres approches de dépistage	41
3.3.	Chez l'hôte intermédiaire	42
3.3.1.	Diagnostic <i>post-mortem</i>	42
3.3.2.	Diagnostic <i>pre-mortem</i>	42
3.4.	Cibles PCR : caractéristiques et applications	43
3.4.1.	Les cibles PCR spécifiques d'espèces.....	43
3.4.2.	Les cibles PCR à spectre parasitaire large	43
3.4.3.	Les PCR multiplex	43
3.5.	Lutte contre <i>Echinococcus spp.</i>	44
4.	Objectifs principaux	45
5.	Surveillance et épidémiologie moléculaire d' <i>E. multilocularis</i>	46
5.1.	Investigations sur la présence d' <i>E. multilocularis</i> en France	46
5.1.1.	Définition des zones historiques d'endémie	46
5.1.2.	Expansion vers l'ouest de la zone d'endémie d' <i>E. multilocularis</i> en France	47
	Encart 1 : Mise au point et validation de la technique de de sédimentation et de comptage par segments (SSCT) pour le dépistage de l'infestation par <i>E. multilocularis</i> chez le renard	48
5.1.3.	Surveillance d' <i>E. multilocularis</i> par le biais d'investigations chez les rongeurs aquatiques	49
	Encart 2 : Protocole de diagnose parasitaire par biologie moléculaire à partir du stade larvaire	51
5.1.4.	Identification de zones d'endémie d' <i>E. multilocularis</i> non précédemment détectées par analyses rétrospectives de fèces de renards	52
	Encart 3 : Mise au point d'un test PCR temps réel pour la copro-détection d' <i>E. multilocularis</i>	53
5.2.	Apport de l'épidémiologie moléculaire pour <i>E. multilocularis</i>	56
	Encart 3 : Caractérisation et utilisation du microsatellite EmsB	57
5.2.1.	Proposition d'un scénario spatio-temporel de l'expansion d' <i>E. multilocularis</i> en France	58
5.2.2.	Analyse de la diversité génétique d' <i>E. multilocularis</i> en Suède et au Danemark	63
5.2.3.	Exploration par la génétique des origines de l'expansion d' <i>E. multilocularis</i> en Pologne	66
6.	Surveillance et épidémiologie moléculaire d' <i>E. granulosus sensu lato</i>	74
6.1.	Surveillance et caractérisation d' <i>E. granulosus sensu lato</i> en France	74
6.1.1.	Introduction : contexte épidémiologique	74
6.1.2.	Actualisation des données de prévalence de l'infestation par <i>E. granulosus sensu lato</i> dans le Sud de la France	75
6.1.3.	Actualisation de la présence d' <i>E. granulosus sensu lato</i> en Corse	77
6.1.4.	Plan de surveillance nationale d' <i>E. granulosus sensu lato</i>	80
6.2.	Situations d'hyper-endémie	88
6.2.1.	En Europe : la République de Moldavie	89
6.2.2.	En Afrique du Nord : Algérie et Maroc	93

Encart 4 : Utilisation du papier FTA pour l'échantillonnage du stade larvaire d' <i>E. granulosus s.l.</i> en vue d'analyses moléculaires	95
7. Caractérisation des cycles parasitaires d' <i>E. multilocularis</i> et d' <i>E. granulosus</i>	98
7.1. Rôle des carnivores domestiques dans l'épidémiologie d' <i>E. multilocularis</i>	98
7.1.1. Rôle du chien	98
7.1.1.1. Surveillance épidémiologique	98
7.1.1.2. Intérêt des différentes approches de dépistage coprologique chez le chien	100
7.1.2. Rôle du chat : prévalence et potentiel zoonotique	101
7.2. Cas particulier des animaux captifs : surveillance d' <i>E. multilocularis</i> dans un parc animalier	104
7.3. Caractérisation du cycle d' <i>E. canadensis</i> (G6-7) en Corse	108
8. Expérimentation de méthodes de lutte contre <i>E. multilocularis</i>	111
8.1. Vermifugation des renards en zone urbaine : résultats contrastés dans deux villes de taille moyenne	111
8.2. Régulation de la population vulpine	114
8.3. Lutte et traitement d'hôtes intermédiaires captifs	116
9. Discussion générale : bilan et perspectives	119
9.1. Principaux apports sur le plan des données épidémiologiques	119
9.1.1. Surveillance de l'infestation par <i>E. multilocularis</i>	119
9.1.2. Surveillance de l'infestation par <i>E. granulosus sensu lato</i> en France	121
9.1.3. Expertise à l'international	122
9.1.4. Caractérisation des cycles parasitaires	123
9.2. Développement de nouvelles méthodes de diagnostic et dépistage	125
9.3. Adéquation des travaux réalisés avec le rôle du LNR	127
9.4. Perspectives	129
9.4.1. Perspectives de surveillance de l'infestation par <i>E. multilocularis</i> et <i>E. granulosus</i>	129
9.4.2. Développement de méthodes d'analyses : de la parasitologie classique à l'épidémiologie moléculaire	132
10. Conclusion	134
Références bibliographiques	136

Liste des figures

Figure 1 : Stade adulte d' <i>E. multilocularis</i> avec présence d'un segment ovigère mature.	22
Figure 2 : Photo d'un œuf d' <i>Echinococcus spp.</i> au microscope (x400, crédit LNR <i>Echinococcus spp.</i>).....	23
Figure 3 : Schéma du stade larvaire d' <i>E. granulosus</i> d'après (Eckert, Deplazes, and Kern, 2011) à gauche et photographie de protoscolex (X400, crédit LNR <i>Echinococcus spp.</i>) à droite.....	23
Figure 4 : Représentation schématique des différents stades d' <i>Echinococcus spp.</i> au cours du cycle parasitaire d'après (Thompson, 2017).	24
Figure 5 : Relations phylogénétiques au sein du genre <i>Echinococcus</i> (a) d'après les séquences nucléotidiques de gènes mitochondriaux (Huttner et al., 2008; Nakao et al., 2007) et (b) d'après les séquences nucléotidiques de gènes nucléaires (Saarma et al., 2009). La translocation de taxons est indiquée par les lignes en pointillés d'après (Nakao et al., 2010b).	26
Figure 6 : Phylogénie du genre <i>Echinococcus</i> par l'analyse du maximum de vraisemblance de l'ADN génomique et d'exons. <i>T. mustelae</i> est utilisé comme outgroup. Les valeurs à chaque nœud correspondent aux proportions de bootstrap (%). L'échelle représente l'estimation du nombre de substitutions de nucléotides par site nucléotidique d'après (Knapp et al., 2011).	27
Figure 7 : Ver mature d' <i>E. multilocularis</i> . Les flèches indiquent la position du pore génital (d'après Eckert et al., 2011).	28
Figure 8 : Schéma du stade larvaire d' <i>E. multilocularis</i> (d'après Eckert et al., 2011).	28
Figure 9 : Ver mature d' <i>E. granulosus</i> . Les flèches indiquent la position du pore génital (d'après Eckert et al., 2011).	30
Figure 10 : Cycle parasitaire général d' <i>E. multilocularis</i> indiquant les hôtes principaux en Europe et les différents stades parasitaires.....	32
Figure 11 : Distribution géographique mondiale approximative d' <i>E. multilocularis</i> avant 2010 (Torgerson et al., 2010).	33
Figure 12 : Cycle parasitaire principal d' <i>E. granulosus s.s.</i>	34
Figure 13 : Cycle parasitaire principal d' <i>E. equinus</i>	34
Figure 14 : Cycle parasitaire principal d' <i>E. ortleppi</i>	35
Figure 15 : Cycle parasitaire principal d' <i>E. canadensis</i> G6-7 (à gauche) et G8-G10 (à droite).	36
Figure 16 : Distribution géographique supposée d' <i>E. granulosus s.l.</i> en 2009 (Rodriguez-Morales, 2015)	36
Figure 17 : Représentation de la distribution moyenne de la charge parasitaire pour les 53 intestins positifs pour <i>E. multilocularis</i> analysés par le LNR.	48
Figure 18 : Distribution des renards analysés dans les départements échantillonnés. Les renards infestés par <i>E. multilocularis</i> sont en rouge et ceux non infestés en vert.	49
Figure 19 : Localisation des fèces de renards collectées dans les six départements échantillonnés (cercle vert si négatif en qPCR pour <i>E. multilocularis</i> , cercle rouge si positif) dans le contexte des départements limitrophes enzootiques (triangle rouge pour renard ayant fourni un résultat positif, triangle vert pour renard ayant fourni un résultat négatif) d'après Combes et al. (2012). a Les deux départements témoins de la Côte d'Or (21) et du Doubs (25). b Département de l'Allier (03). c Département de la Seine-Maritime (76). d Départements de la Drôme (26) et des Hautes-Alpes (05).	55
Figure 20 : Structure des microsattellites EmsB chez <i>E. multilocularis</i> où chaque flèche indique la présence d'une copie du microsattellite et les traits entre les flèches correspondent à la séquence conservée entre les microsattellites.	57
Figure 21 : Distribution à travers les cinq zones des renards dont les vers ont été sélectionnés pour l'étude. La taille des cercles est proportionnelle au nombre de vers analysés (1 à 5). Les départements échantillonnés sont identifiés par leur numéro sur la carte de France encadrée.	58
Figure 22 : (a) Electrophorogrammes des loci d'EmsB pour les deux profils majoritaires P04 et P17. (b) Dendrogramme construit à partir des données EmsB, où les vers provenant d'un même renard et avec le même profil EmsB ont été regroupés. Deux échantillons d' <i>E. granulosus s.s.</i> ont été utilisés comme outgroup. Les valeurs p sont indiquées en rouge et ont été calculés avec 1000 répétitions.	59

Figure 23 : Dendrogramme basé sur la distance génétique entre les assemblages de profils des différentes régions.....	61
Figure 24 : Distribution des deux profils majoritaires P04 et P17. En rouge est indiqué la succession des étapes d'expansion d' <i>E. multilocularis</i> à travers les différentes régions.....	63
Figure 25 : Dendrogramme construit à partir des données EmsB des vers provenant de Suède et du Danemark. Deux échantillons d' <i>E. granulosus s.s.</i> ont été utilisés comme outgroup. Les valeurs p sont indiquées en rouge et ont été calculés avec 1000 répétitions.	65
Figure 26 : Localisation des différentes zones échantillonnées à travers la Pologne et leurs prévalences vulpines d' <i>E. multilocularis</i> (d'après Karamon et al., 2014)	67
Figure 27 : Dendrogramme construit à partir des données EmsB, où les vers provenant d'un même renard et avec le même profil EmsB ont été regroupés et leur nombre représentés par des astérisques. Deux échantillons d' <i>E. granulosus s.s.</i> ont été utilisés comme outgroup. Les valeurs p sont indiquées en rouge et ont été calculés avec 1000 répétitions.....	68
Figure 28 : Dendrogramme basé sur la distance génétique entre les assemblages de profils des différentes régions.....	71
Figure 29 : Répartition des départements en fonction des niveaux d'infestation pour <i>E. granulosus</i> observés lors de l'enquête nationale de 1989 (Soulé et al. 1989).	75
Figure 30 : Répartition géographique des départements concernés (en gris) par l'enquête de surveillance d' <i>E. granulosus</i> . Le nombre de cas positifs pour chaque espèce animale est indiqué ainsi que les génotypes d' <i>E. granulosus s.s.</i> observés.....	76
Figure 31 : Relations phylogénétiques entre les quatre variants observés chez les porcs et sangliers en Corse (G6/7A, G6/7B, G6/7C and G6/7D) avec les espèces du groupe <i>E. granulosus s.l.</i> à partir des séquences nucléotidiques des gènes mitochondriaux <i>cox1</i> , <i>nad1</i> , <i>nad3</i> et <i>atp6</i> . Les valeurs de bootstrap (%) sont indiquées à chaque nœud. <i>E. multilocularis</i> a été utilisé comme exogroupe.	78
Figure 32 : Répartition par département des prélèvements et des effectifs abattus en fonction des espèces animales.	82
Figure 33 : Localisation des élevages infectés par <i>E. granulosus sensu lato</i> (bovins y ayant vécu au moins six mois). Concernant les cas d'infestation par <i>E. canadensis</i> porcins en Corse, seule une localisation départementale a été possible.	85
Figure 34 : Réseau d'haplotypes mitochondriaux (<i>cox1+nad3</i>) obtenus à partir de 66 échantillons d' <i>E. granulosus s.s.</i> La taille des cercles indique approximativement le nombre d'individus (indiqué entre parenthèses lorsque différent de 1) et chaque mutation est représentée par une ligne et un point blanc.	90
Figure 35 : Réseau d'haplotypes mitochondriaux (<i>cox1+nad1</i>) obtenus à partir de 67 échantillons d' <i>E. granulosus s.s.</i> La taille des cercles indique approximativement le nombre d'individus (indiqué entre parenthèses lorsque différent de 1) et chaque mutation est représentée par une ligne et un point blanc.	96
Figure 36 : Lésions hépatiques fertiles d'échinococcose alvéolaire (cercle rouge) chez un <i>M. glareolus</i> piégé au sein du parc animalier (à gauche) et un <i>L. catta</i> (à droite) (Umhang et al., 2016c).....	106
Figure 37 : Dendrogramme construit à partir de données obtenues par le génotypage EmsB des échantillons d' <i>E. multilocularis</i> provenant des animaux captifs (ragondin et lémuriens) du parc ainsi que de la faune sauvage environnante (renards et rongeurs). Les valeurs de bootstrap (%) calculées avec 1000 répétitions sont indiquées à chaque nœud. Deux échantillons d' <i>E. granulosus s.s.</i> ont été utilisés comme exogroupe.	107
Figure 38 : Localisation des parcelles d'échantillonnage des fèces de renards. Les lignes pleines correspondent aux 10 parcelles de 1,5 km de côté de la zone traitée. Les lignes en pointillés correspondent aux 10 parcelles de 4 km de côté servant de contrôle et réparties autour de la zone traitée.	112
Figure 39 : Evolution de la prévalence d'infestation par <i>E. multilocularis</i> estimée à partir de l'analyse par corps-ELISA de fèces de renards à Annemasse (à gauche) et Pontarlier (à droite). Les zones traitées sont représentées par des cercles gris et les zones de contrôle par des carrés noirs avec les intervalles de confiance respectifs représentés par les barres verticales. Les périodes de distributions des appâts sont représentées par les flèches noires, les collectes de fèces par les triangles gris, la période de suivi de consommation des appâts par piège photo avec des rayures en diagonale et par observation directe par des rayures horizontales.	113

Figure 40 : Représentation de la zone d'étude avec les différentes parcelles dans les zones nord (gris clair) et sud (gris foncé). La présence de zones forestières est indiquée dans la plus sombre nuance de gris. Les deux tracés noirs correspondent aux circuits des comptages aux phares réalisés dans les deux zones. Chaque point noir correspond à un renard abattu dans le cadre de l'étude.	115
Figure 41 : Analyse par western blot des sérums de lémuriers en utilisant la protéine A/G comme conjugué. Bandelette 10 : contrôle positif (sérum d'un patient humain). Bandelette 12 et 15 : sérum de maki catta avec une échinococcose alvéolaire. Bandelette 18 : sérum de maki catta non infesté par <i>E. multilocularis</i>	117
Figure 42 : Représentation des départements concernés par la surveillance d' <i>E. multilocularis</i> en France.....	120
Figure 43 : Situation épidémiologique actuelle pour <i>E. multilocularis</i> dans le Cantal (15) et les départements voisins enzootiques (en rouge : 18, 71, 42, 69) ou non (en noir : 23, 03, 63, 19, 43, 46, 12, 48) d'après Combes et al. (2012).	130

Liste des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif de la taxonomie des espèces au sein du genre <i>Echinococcus</i> avec précision des précédentes nomenclatures en termes de génotypes et de souches pour <i>E. granulosus sensu lato</i>	25
Tableau 2 : Distribution géographique et hôtes principaux des espèces d'échinocoques non présents en Europe.	32
Tableau 3 : Sensibilité de la SSCT pour chaque segment ou paire de segments en comparaison avec la méthode SCT d'après Umhang et al. 2011. Les lignes SCT et SSCT indiquent le nombre de renards ayant fourni des résultats positifs avec chacune des techniques en fonction du segment ou de la paire de segments analysés. CI- et CI+ indiquent les bornes inférieures et supérieures de l'intervalle de confiance à 95 %.	48
Tableau 4 : Taux d'infestation par <i>E. multilocularis</i> dans les fèces de renards analysés par PCR temps réel pour les échantillons des deux départements témoins et ceux des quatre départements, sans données antérieures relatives à la présence du parasite.....	54
Tableau 5 : Détails de l'échantillonnage pour chacune des régions et départements. Les profils endémiques d'une seule région sont identifiés à l'aide d'un astérisque.....	60
Tableau 6 : Nombre de profils observés et extrapolés ainsi que la diversité génétique (indice de Simpson calculée sur la base de 23 vers, correspondant à la plus faible taille d'échantillon) pour chacune des régions. .	61
Tableau 7 : Description des échantillons d' <i>E. multilocularis</i> analysés provenant du Danemark et de Suède ainsi que des profils EmsB obtenus. H: Højer; G: Grindsted; VG: Västra Götaland, D: Dalarna, S: Södermanland.....	64
Tableau 8 : Comparaison des profils EmsB identifiés chez les vers provenant de Suède et du Danemark avec ceux précédemment identifiés en Europe. A : Allemagne, F : France, PL : Pologne, RT : République Tchèque, SL : Slovénie, SW : Suisse.....	65
Tableau 9 : Distribution du nombre de vers en fonction des profils EmsB et des zones d'échantillonnage.	69
Tableau 10 : Comparaison des profils EmsB obtenus en Pologne avec ceux précédemment identifiés en Europe.	70
Tableau 11 : Index de diversité génétique et nombre de profils EmsB observés et estimés dans chacune des zones.	71
Tableau 12 : Nombre de cas de <i>T. hydatigena</i> par espèce animale.	81
Tableau 13 : Nombre de cas et prévalence abattoir de l'infestation par <i>E. granulosus</i> s.s. chez les ovins au niveau départemental et national.	83
Tableau 14 : Nombre de cas et prévalence abattoir de l'infestation par <i>E. granulosus sensu stricto</i> chez les bovins au niveau départemental et national.	84
Tableau 15 : Nombre de cas et prévalence abattoir de l'infestation par <i>E. ortleppi</i> chez les bovins au niveau départemental et national.	84
Tableau 16 : Nombre de cas et prévalence abattoir de l'infestation par <i>E. canadensis</i> chez les porcins au niveau départemental et régional	85
Tableau 17 : Prévalences abattoir d' <i>E. granulosus</i> s.l. à l'échelle nationale (en cas pour 100 000) en fonction des espèces animales.	88
Tableau 18 : Prévalence de l'infestation par <i>E. granulosus</i> chez les bovins et les ovins en fonction du type d'élevage. N correspond au nombre d'animaux examinés et CI à l'intervalle de confiance à 95 %.	91
Tableau 19 : Prévalence de l'infestation par <i>E. granulosus</i> en fonction de l'âge pour les 1525 bovins et 5580 ovins. N correspond au nombre d'animaux examinés et IC à l'intervalle de confiance à 95 %.	91
Tableau 20 : Prévalence de l'infestation par <i>E. granulosus</i> selon la localisation hépatique ou pulmonaire chez les ovins et les bovins en fonction du type d'élevage. N correspond au nombre d'animaux examinés.....	91
Tableau 21 : Prévalence de l'infestation par <i>E. granulosus</i> chez les ovins et les bovins en fonction de la taille des kystes. Le nombre d'organes examinés est indiqué entre parenthèses.	92
Tableau 22 : Résultats des diagnostics par PCR à partir des échantillons prélevés sur papier FTA en abattoir...	95

Liste des abréviations

ADILVA : Association française des Directeurs et cadres de Laboratoires Vétérinaires publics d'Analyses
ADN : acide désoxyribonucléique
AESA : Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire ou EFSA en anglais
Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire
BDNI : base de données nationale d'identification
cox : cytochrome oxydase
CNR EA : Centre National de Référence de l'Echinococcose Alvéolaire
CERFE : Centre de Recherche et de Formation en Eco-éthologie
COFRAC : comité français d'accréditation
CUGN : Communauté Urbaine du Grand Nancy
Cq : cycles de quantification
DDPP : Direction Départementale de Protection des Populations
DGAI : Direction générale de l'Alimentation
ELIZ : Entente Interdépartementale de Lutte contre les Zoonoses
EVCI : Espérance de Vie Corrigée de l'Incapacité ou DALY en anglais
FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FDC : Fédérations Départementales des Chasseurs
FDGDON : Fédérations Départementales des Groupements de Défense contre les Organismes Nuisibles
FREDON : Fédérations Régionales de Défense contre les Organismes Nuisibles
GEDUVER : GEstion DURable des VERTébrés déprédateurs en milieu Rural
HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance
IC_{95%} : intervalle de confiance à 95 %
ICONZ : Integrated Control of Neglected Zoonoses
IgG : Immunoglobuline G
IST : Intestinal Scrapping Technique
LNR : Laboratoire National de Référence
LRFSN : Laboratoire de la Rage et de la Faune Sauvage de Nancy
LVD : Laboratoires Vétérinaires Départementaux
nad : nicotinamide adénine dinucléotide
ONCFS : Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage
OIE : Office International des Epizooties
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PCR : réaction de polymérisation chaîne
PMSI : programme de médicalisation des systèmes d'information
qPCR : PCR temps réel ou PCR quantitative
SCT : Sedimentation and Counting Technique
SSCT : Segmantal Sedimentation and Counting Technique
SVT : shaking in a vessel technique
UFC : université de Franche-Comté

1. Introduction générale

L'espèce humaine a acquis au cours de son histoire relativement récente sur la Terre un nombre impressionnant de parasites dont 300 espèces d'helminthes et plus de 70 espèces de protozoaires (Ashford and Crewe, 1998). Si beaucoup de ces espèces ne sont rencontrées que rarement chez l'Homme et de façon accidentelle, certaines parmi les plus courantes sont responsables des maladies humaines les plus graves dans le monde, ce qui leur confère un intérêt médical particulier et une importance majeure en santé publique (Cox, 2002). Les parasites affectent la santé de millions de personnes chaque année dans le monde en occasionnant les manifestations les plus diverses.

Les échinocoques sont les agents étiologiques des échinococcoses qui sont les maladies les plus graves causées chez l'homme par un cestode. Parmi les neuf espèces actuellement reconnues au sein du genre *Echinococcus*, le potentiel zoonotique est inconnu pour deux d'entre elles mais très invalidant pour les autres, avec une issue pouvant être fatale en l'absence de traitement. Selon les espèces d'échinocoques, ce risque zoonotique concerne aussi bien des populations pauvres en zones rurales, particulièrement celles liées au pastoralisme en Asie et en Afrique, que potentiellement des populations plus aisées de l'Europe de l'ouest, et cela même en zone urbaine. Ces différentes espèces ont dans leur globalité une répartition mondiale et font partie des parasites zoonotiques les plus répandus dans le monde (Craig et al., 2007), faisant des échinococcoses un problème majeur de santé. En raison des énormes coûts engendrés pour la santé publique et la santé animale, l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) ont classé les échinococcoses parmi les dix parasites transmis par les aliments ayant l'impact global le plus important (<http://www.fao.org/news/story/en/item/237323/icode/>). Si *Taenia solium*, le ver solitaire responsable de la neurocysticercose, est en tête, *E. granulosus* et *E. multilocularis* arrivent respectivement second et troisième devant des parasites tels que *Toxoplasma gondii* (responsable de la toxoplasmose congénitale) ou *Trichinella spiralis* (trichinellose). L'échinococcosose (regroupant *E. multilocularis* et *E. granulosus*) a également été classée par l'OMS parmi les 17 maladies tropicales négligées méritant le plus de considération.

A l'image de l'Europe de l'ouest, *E. multilocularis* et *E. granulosus* sont historiquement présents en France. Cependant, si la présence d'*E. granulosus* était décrite dans de nombreuses régions françaises avec des foyers importants dans le sud (Soule, Fabien, and Maillot, 1989), celle d'*E. multilocularis* serait quant à elle restreinte au nord-est du pays (Romig, Dinkel, and Mackenstedt, 2006) et à un foyer Auvergnat (Petavy and Deblock, 1983; Rey et al., 1977). Cependant en l'absence d'investigations et donc de données récentes, il est difficile de rendre compte de l'évolution de ces parasitoses en France au cours des vingt dernières années, alors même que des modifications des zones d'endémies et des prévalences sont constatées en Europe. Dans ce contexte et en vue d'adapter la lutte à la situation épidémiologique vis-à-vis de ces zoonoses d'intérêts, le ministère de l'Agriculture via la Direction générale de l'Alimentation (DGAI), a décidé la création d'un Laboratoire National de Référence (LNR) pour *Echinococcus spp.* en 2006. Le laboratoire de la rage et de la faune sauvage de Nancy (LRFSN) de l'Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire), étudiant déjà l'échinococcosose alvéolaire depuis environ 25 ans, a été nommé LNR en juillet 2006. Classiquement, aucune recherche spécifique et encore moins analyse officielle pour les échinocoques n'est réalisée en France chez l'animal, où les échinococcoses ne font pas partie des maladies réglementées de catégorie 1 ou 2. A défaut de gérer un réseau de laboratoires agréés, le rôle du LNR *Echinococcus spp.* consiste en la réalisation d'études de surveillance épidémiologique et de caractérisation des échinocoques en France au niveau animal afin de pouvoir disposer d'une vision globale permettant de proposer des méthodes de lutttes pertinentes. Cela nécessite également la mise au point de méthodes d'analyses plus performantes, et leur mise à disposition auprès des laboratoires vétérinaires départementaux (LVD) lorsque nécessaire.

Arrivé au laboratoire en tant que chargé de projet dans les mois suivant la désignation en tant que LNR, les travaux présentés dans cette thèse constituent une synthèse des principales études sur les échinocoques que j'y ai menées pendant dix ans en vue de la mise en œuvre de ces principales missions. L'objectif général du LNR et donc le mien était de définir la situation d'endémie actuelle de la France pour *Echinococcus spp.* en identifiant les espèces présentes, leurs zones de répartition géographique et leurs niveaux de prévalence. Pour cela il était nécessaire de disposer de techniques de diagnostic et de dépistage fiables et adaptées, complétées par des outils d'épidémiologie moléculaire permettant des investigations approfondies, afin de comprendre au mieux la situation parasitaire actuelle. Une évaluation de différentes méthodes de contrôle était également nécessaire dans la perspective de la lutte contre ces zoonoses.

L'état de l'art présenté dans ce manuscrit comporte une description générale des échinocoques avec une évocation plus approfondie d'*E. multilocularis* et d'*E. granulosus sensu lato (s.l.)* qui constituent les espèces d'intérêt qui sont traitées ici. En amont de la présentation de mes travaux, les objectifs principaux sont présentés afin de replacer les différentes thématiques qui seront abordées tout au long de ce manuscrit dans un contexte stratégique plus large. La description de mes travaux sera réalisée en mentionnant à chaque fois le contexte, l'échantillonnage, les méthodes utilisées et les résultats qui seront discutés directement à la suite. Une discussion générale permettra de faire la synthèse de mes travaux et d'en dégager des perspectives. De par mon positionnement au sein du LNR, la France est donc au centre des études de surveillance et d'épidémiologie présentées dans ce manuscrit. Toutefois, les collaborations internationales en Europe mais aussi en Afrique ont permis d'enrichir la diversité des situations épidémiologiques étudiées et d'accéder à une approche plus globale du monde des échinocoques. Les nouvelles données épidémiologiques rendues disponibles par d'autres auteurs postérieurement à la publication de mes travaux ont été intégrées dans la discussion de mes travaux lorsqu'elles étaient de nature à étoffer la discussion scientifique.

2. Les échinocoques

2.1. Morphologie et cycle

2.1.1. Morphologie générale

2.1.1.1. Le stade adulte

Le stade adulte des échinocoques est sous la forme d'un ver plat de couleur blanche présentant une partie antérieure, le scolex et une partie postérieure, le strobile composé de quelques segments ou proglottis (Figure 1). La courte taille du ver, de 2 mm à 1 cm, et le faible nombre de segments, sont des particularités du genre *Echinococcus* au sein de la famille des *Taeniidae*, où le stade adulte chez le genre *Taenia* peut atteindre plusieurs mètres et être constitué de plusieurs centaines de segments. Le scolex est l'organe d'attachement du ver et se compose de quatre ventouses au milieu desquelles se dégage un rostre doté d'une grande et d'une petite couronne de crochets. Ce scolex correspond principalement au protoscolex et ne va pas se développer une fois constitué, contrairement au strobile qui primitivement très peu développé, va s'allonger pour former un à cinq segments selon l'espèce concernée. Le ver étant hermaphrodite, dans chaque proglottis vont se développer progressivement les organes génitaux mâle et femelle (testicules, utérus, ovaies, vagin). Après fertilisation, le proglottis terminal renfermant les œufs se détache du ver pour rejoindre le contenu intestinal et être éliminé *via* les fèces. Si la fécondation croisée existe, l'autofécondation demeure extrêmement majoritaire. La morphologie du ver et sa taille sont les critères principaux d'identification macroscopique à ce stade parasitaire. Dans un second temps, l'observation microscopique des caractéristiques des crochets et la position antérieure ou postérieure par rapport au proglottis du pore génital latéral ainsi que la forme de l'utérus (sacciforme ou à sacculations latérales) permettent de compléter la diagnose au sein du genre *Echinococcus*.



Figure 1 : Stade adulte d'*E. multilocularis* avec présence d'un segment ovigère mature.

2.1.1.2. Le stade œuf

Les œufs ont une structure ovoïde de 30 à 40 μm de diamètre. Ils renferment un embryon hexacanthé (avec 3 paires de crochets) : l'oncosphère, qui correspond au premier stade larvaire. L'oncosphère est entouré par plusieurs enveloppes dont la capsule extérieure, qui disparaît rapidement une fois l'œuf dans l'environnement et surtout l'embryophore, une couche kératinisée très résistante qui confère son aspect strié à l'œuf (Figure 2). A ce stade parasitaire, aucune distinction morphologique ne peut être faite entre les genres de la famille des *Taeniidae*. Présent dans le milieu extérieur, il s'agit du seul des trois stades à ne pas nécessiter continuellement la présence d'un hôte. Lorsqu'ils sont libérés dans l'environnement, les œufs sont extrêmement résistants, pouvant survivre plus d'un an dans des conditions humides et à des températures basses (entre +4 et +15°C). Les œufs sont très sensibles à la dessiccation, ne pouvant survivre que quelques jours dès que l'humidité

descend en-dessous de 25 % (Lawson and Gemmell, 1983; Veit et al., 1995). Les œufs sont également sensibles aux températures chaudes, ne survivant pas plus de cinq minutes à plus de 60°C (Veit et al., 1995). Par contre, ils sont très résistants aux températures froides, notamment à la température classique de congélation (-20°C). Seule une exposition à des températures extrêmement froides (-70°C) pendant plusieurs jours permet de tuer les œufs.



Figure 2 : Photo d'un œuf d'*Echinococcus spp.* au microscope (x400, crédit LNR *Echinococcus spp.*).

2.1.1.3. Le stade larvaire

Le metacestode est constitué principalement d'une vésicule entourée d'une membrane laminaire acellulaire externe et d'une membrane germinative nucléée interne responsable du développement asexué par bourgeonnement (Figure 3). A l'intérieur des capsules bourgeonnantes, rattachées à la membrane germinative, se développent des protoscolex qui constitueront potentiellement les futurs vers. Parfois, des capsules se détachent de la membrane germinative et sont alors appelées vésicules filles. La structure et le développement de la phase larvaire diffèrent grandement au sein du genre.

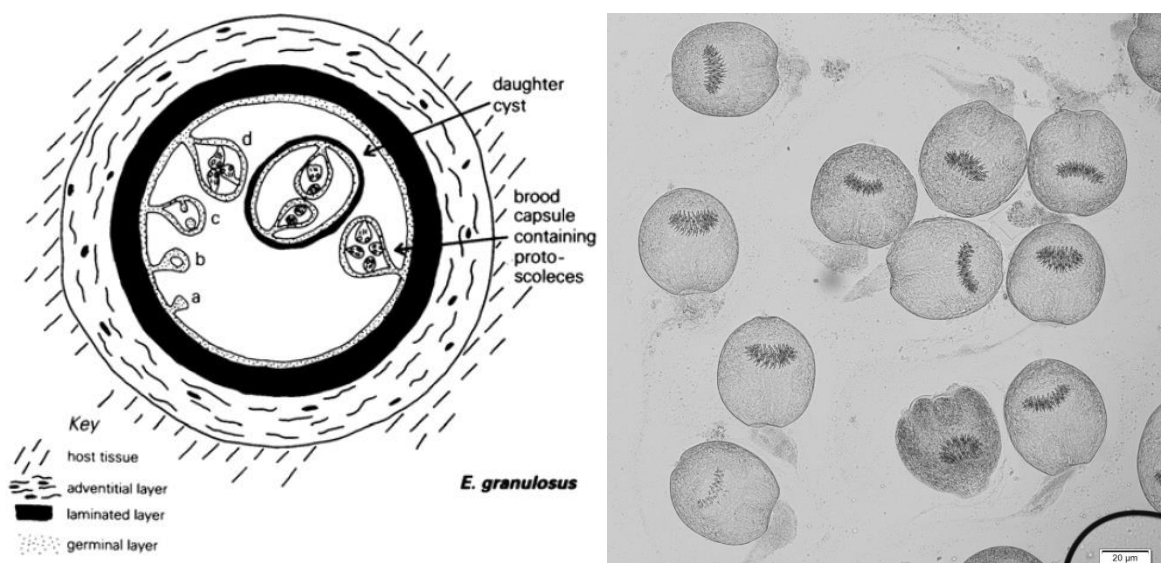


Figure 3 : Schéma du stade larvaire d'*E. granulosus* d'après (Eckert, Deplazes, and Kern, 2011) à gauche et photographie de protoscolex (X400, crédit LNR *Echinococcus spp.*) à droite.

2.1.2. Le cycle général des échinocoques

Les échinocoques nécessitent deux hôtes mammifères pour compléter leur cycle. Le stade adulte sous forme de ver est retrouvé dans l'intestin de l'hôte définitif, alors que le stade larvaire se localise dans les organes (principalement le foie) des hôtes intermédiaires. Les œufs présents dans l'environnement sont ingérés par les hôtes intermédiaires. L'oncosphère est alors libéré de l'embryophore sous l'action des enzymes de l'estomac et des intestins (Figure 4). L'oncosphère traverse la paroi intestinale par les mouvements de ses crochets et

possiblement aussi des sécrétions. Lorsqu'il rejoint le système sanguin, il est transporté passivement jusqu'au foie. Si la majorité des oncosphères ont tendance à y rester, d'autres peuvent être transportés jusqu'aux reins, à la rate, au cerveau ou d'autres organes. Le développement de la phase larvaire a une durée variable selon l'hôte et l'espèce parasitaire, la production de protoscolex pouvant prendre plusieurs mois. Le taux de fertilité est variable selon les espèces d'échinocoques et les hôtes intermédiaires attirés. Toutefois, un développement de kystes peut s'observer chez des espèces non-cibles avec ou sans production de protoscolex. Lors de la consommation des viscères parasités d'un hôte intermédiaire par un hôte définitif, les protoscolex vont être ingérés. Sous l'action de la pepsine dans l'estomac, les protoscolex vont se dévagner dans l'intestin en réponse à une acidification du pH, une exposition à la bile et une augmentation de la température. Chaque protoscolex va pouvoir se développer, en 4 à 6 semaines selon l'espèce parasitaire, en ver adulte mature. Les œufs produits dans le dernier proglottis seront alors éliminés dans l'environnement avec les fèces.

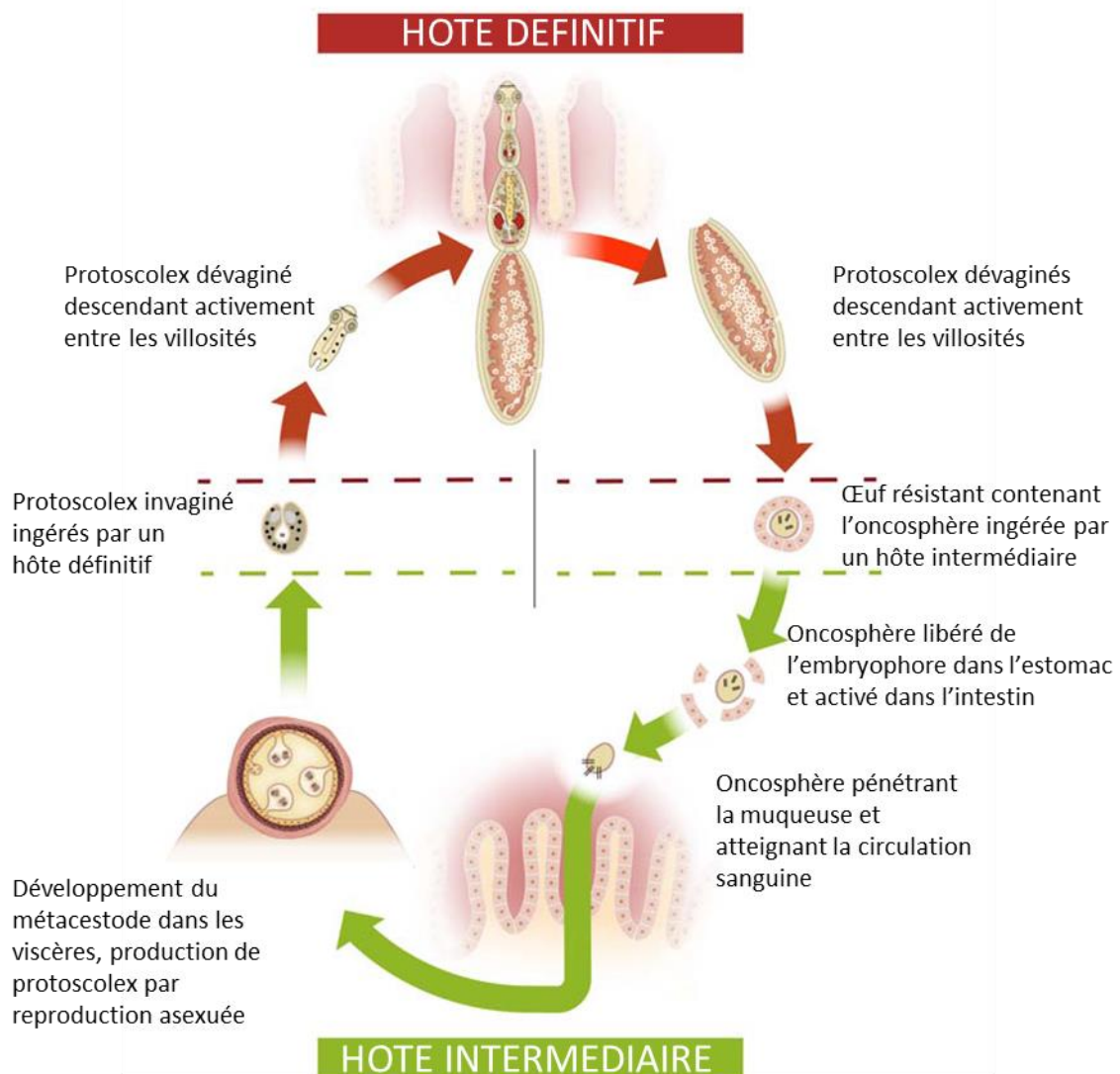


Figure 4 : Représentation schématique des différents stades d'*Echinococcus* spp. au cours du cycle parasitaire d'après (Thompson, 2017).

Les hôtes définitifs sont des carnivores domestiques ou sauvages, principalement des canidés alors que des félinés peuvent être infestés par certaines espèces d'échinocoques. Un large spectre d'espèces de mammifères, incluant l'homme, est capable de développer la phase larvaire du parasite. Toutefois, d'un point de vue épidémiologique, il est important de distinguer les hôtes intermédiaires qui jouent un rôle dans la perpétuation du cycle, et les hôtes aberrants ou accidentels. Ces derniers ne participent pas au cycle parce qu'il

n'y a pas de métacestode fertile (absence de protoscolex) et/ou parce qu'ils ne permettent pas de compléter le cycle en raison de l'absence de consommation de leurs viscères par un hôte définitif. L'homme appartient donc à ce groupe des hôtes aberrants pour toutes les espèces d'échinocoques même si le développement de protoscolex est possible.

2.2. Taxonomie et phylogénie du genre *Echinococcus*

Au sein du règne animal, le genre *Echinococcus* (établi par Rudolphi en 1801) fait partie de l'embranchement des Platyhelminthes, de la classe des Cestodes, de l'ordre des Cyclophyllidea et de la famille des Taenidae. Parallèlement à la reconnaissance de la distinction entre *E. granulosus* et *E. multilocularis* dans les années 1850 en Europe (Tappe, Kern, and Frosch, 2010), les espèces *Echinococcus oligarthra* puis plus tard *Echinococcus vogeli* ont été découvertes en Amérique du Sud (Tappe, Stich, and Frosch, 2008). Plus récemment, *Echinococcus shiquicus* a été découvert sur le plateau tibétain et le statut d'espèce a été reconnu pour *Echinococcus felidis* en Afrique (Huttner et al., 2008). Considéré jusqu'au début des années 2000 encore comme une seule espèce mais divisée en souches puis génotypes (G1 à G10) (Eckert et al., 2001), *E. granulosus* a été finalement reconnu comme un complexe de plusieurs espèces. Le genre *Echinococcus* est ainsi un petit groupe taxonomique regroupant actuellement un complexe de neuf espèces cryptiques valides : *E. multilocularis*, *E. vogeli*, *E. oligarthra*, *E. shiquicus* et le complexe d'espèces *E. granulosus sensu lato (s.l.)* composé d'*E. granulosus sensu stricto (s.s.)*, *E. equinus*, *E. ortleppi*, *E. canadensis* et *E. felidis* (McManus, 2013; Nakao et al., 2013; Thompson and McManus, 2002) (Tableau 1).

Tableau 1 : Récapitulatif de la taxonomie des espèces au sein du genre *Echinococcus* avec précision des précédentes nomenclatures en termes de génotypes et de souches pour *E. granulosus sensu lato*.

	Espèces	Génotypes	Souches	
<i>Echinococcus granulosus sensu lato</i>	<i>Echinococcus granulosus sensu stricto</i>	G1	mouton	
		G2	mouton de Tasmanie	
		G3	buffle	
	<i>Echinococcus equinus</i>	G4	cheval	
	<i>Echinococcus ortleppi</i>	G5	bovin	
	<i>Echinococcus canadensis</i>		G6	chameau
			G7	porc
			G8	cervidés américain
			G9	variant porc
	<i>Echinococcus felidis</i>		G10	cervidés de Fennoscandie
/			lion	
<i>Echinococcus multilocularis</i>	/	/		
<i>Echinococcus shiquicus</i>	/	/		
<i>Echinococcus vogeli</i>	/	/		
<i>Echinococcus oligarthra</i>	/	/		

Cette taxonomie actuelle résulte des observations de terrain et de laboratoire, notamment celles réalisées durant les 50 dernières années, et qui ont révélé une large diversité phénotypique au sein du genre. A partir des années 1980, le développement des nouvelles techniques de biologie moléculaire et plus particulièrement le séquençage, a permis d'accélérer considérablement l'établissement de la taxonomie actuelle. En effet, les techniques de biologie moléculaire se sont avérées indispensables pour identifier des espèces au sein du genre *Echinococcus* en raison du manque de caractères morphologiques de diagnose différentielle tant pour le stade adulte que larvaire, de descriptions taxonomiques inadéquates et d'un manque de preuves de ségrégation géographique ou écologique. De plus, la grande plasticité de développement larvaire chez les différents hôtes

intermédiaires et celle même incomplète chez les hôtes aberrants ont longtemps contribué à maintenir la confusion en matière d'identification des espèces concernées.

Le séquençage complet du génome mitochondrial a été d'une grande importance pour les études phylogénétiques au sein du genre *Echinococcus*. La comparaison des génomes mitochondriaux d'*E. granulosus s.s.*, d'*E. equinus* (tous deux considérés à l'époque comme respectivement les souches ovine et équine de la même espèce *E. granulosus*) et d'*E. multilocularis* a déclenché la révision taxonomique du genre. Ensuite, la phylogénie de l'ensemble des espèces du genre à partir des génomes mitochondriaux complets fut obtenue par Nakao et al. (2007) (Figure 5a), puis une analyse phylogénétique a été réalisée à partir de gènes nucléaires par Saarma et al. (2009) (Figure 5b) puis par Knapp et al. (2011) (Figure 6). Les résultats sont cohérents entre les différentes phylogénies même si celle de Saarma et al. (2009) diffère sur certains points, ce qui peut s'expliquer par l'absence d'exogroupe et par l'utilisation de deux gènes nucléaires contre trois pour Knapp et al. (2011). Les résultats confirment le bien-fondé de la révision taxonomique et la validité des espèces *E. granulosus s.s.*, *E. equinus* et *E. ortleppi*. De plus, ils confirment l'existence d'un groupe monophylétique regroupant les génotypes G6, G7 et G8 (G9 et G10 non utilisés). Les valeurs de divergence de nucléotides entre ces génotypes se sont avérées suffisamment faibles pour les regrouper au sein de la même espèce nommée *E. canadensis*.

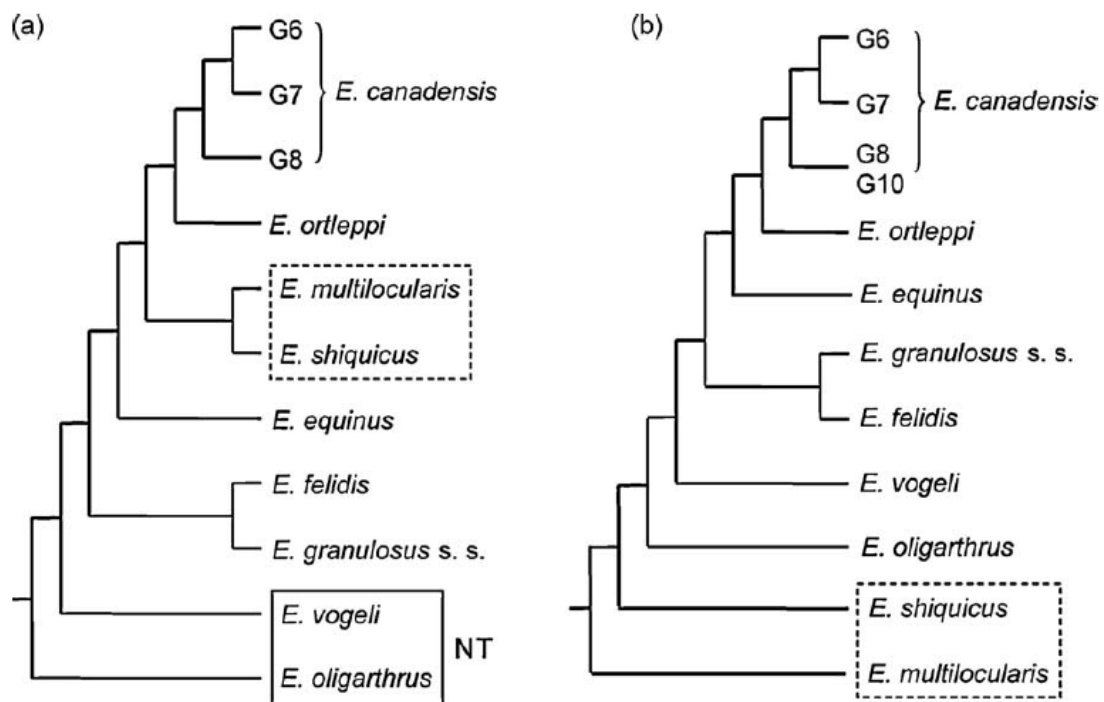


Figure 5 : Relations phylogénétiques au sein du genre *Echinococcus* (a) d'après les séquences nucléotidiques de gènes mitochondriaux (Huttner et al., 2008; Nakao et al., 2007) et (b) d'après les séquences nucléotidiques de gènes nucléaires (Saarma et al., 2009). La translocation de taxons est indiquée par les lignes en pointillés d'après (Nakao et al., 2010b).

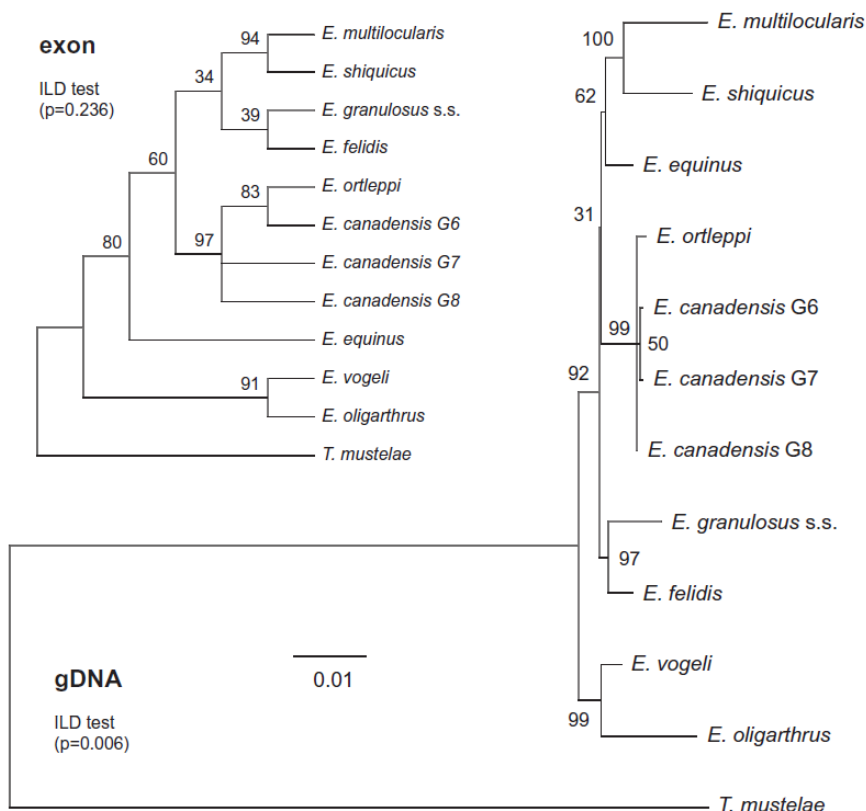


Figure 6 : Phylogénie du genre *Echinococcus* par l'analyse du maximum de vraisemblance de l'ADN génomique et d'exons. *T. mustelae* est utilisé comme outgroup. Les valeurs à chaque nœud correspondent aux proportions de bootstrap (%). L'échelle représente l'estimation du nombre de substitutions de nucléotides par site nucléotidique d'après (Knapp et al., 2011).

2.3. Particularités morphologiques et diversité génétique d'*E. multilocularis* et d'*E. granulosis s.l.*

Si la morphologie et le développement général des stades larvaire et adulte sont semblables au sein du genre *Echinococcus*, des particularités spécifiques existent. Il en est de même pour la diversité génétique, très faible pour *E. multilocularis* et évidemment plus grande au sein du complexe d'espèce *E. granulosis s.l.* Ces espèces seront les seules abordées ici car elles constituent les espèces d'intérêts majeurs dans le contexte de ce manuscrit.

2.3.1. *Echinococcus multilocularis*

Les vers d'*E. multilocularis* mesurent de 1,2 à 4,5 mm et sont composés de 4 à 5 segments. L'utérus est sacciforme et le pore génital est antérieur à la moitié des segments matures et gravides (Figure 7). Le stade larvaire est multivésiculaire et composé d'une structure de plusieurs petites vésicules intégrées dans un stroma plus ou moins dense de tissus conjonctif. La masse larvaire contient généralement une matrice semi-solide gélatineuse plutôt que du liquide. Le metacestode consiste en un réseau de protrusions cellulaires filamenteuses issues de la membrane germinative, qui sont responsables du développement invasif spécifique de l'espèce (Figure 8). De plus, la libération de cellules germinatives à partir de ces protrusions et leur distribution à travers l'organisme par les systèmes lymphatique et sanguin peut aboutir à de nouveaux foyers métastatiques caractéristiques d'*E. multilocularis*, nommés échinococcoses secondaires.

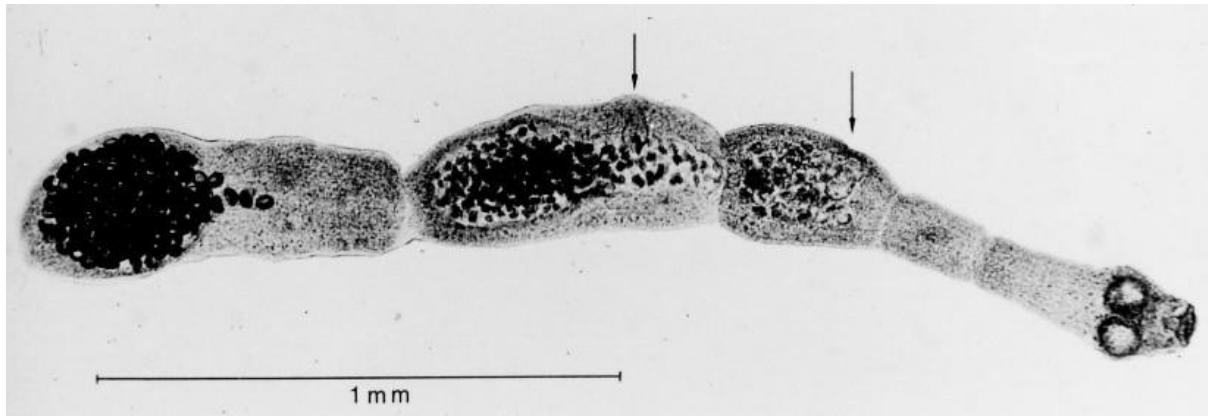


Figure 7 : Ver mature d'*E. multilocularis*. Les flèches indiquent la position du pore génital (d'après Eckert et al., 2011).

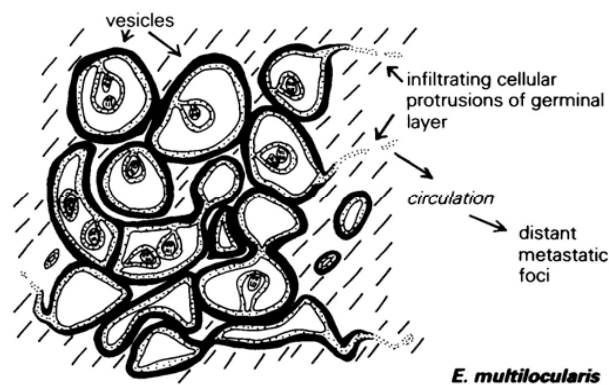


Figure 8 : Schéma du stade larvaire d'*E. multilocularis* (d'après Eckert et al., 2011).

La diversité génétique d'*E. multilocularis* a été initialement estimée par l'analyse de séquences partielles de deux gènes mitochondriaux : la sous-unité 1 de la cytochrome oxydase (*cox1*) et la sous-unité 1 du nicotinamide adénine dinucléotide (*nad1*) (Bowles, Blair, and McManus, 1992; Bowles and McManus, 1993). Deux génotypes géographiques M1 (Europe) et M2 (Chine, Alaska et Amérique du Nord) ont été identifiés mais à partir de seulement quelques sites de substitutions nucléotidiques. Cette classification a ensuite été également retrouvée par l'analyse de gènes nucléaires (Haag et al., 1997; Rinder et al., 1997). La diversité génétique au sein d'*E. multilocularis* apparaît donc relativement faible. L'utilisation des loci microsatellites U1snRNA puis surtout par la suite EmsB a toutefois permis de démontrer la présence d'un polymorphisme géographique (Bart et al., 2006a; Bretagne et al., 1996). L'utilisation de séquences mitochondriales plus longues de trois gènes (cytochrome b, *cox1*, *nad2*) a permis des analyses phylogénétiques plus complètes (Nakao et al., 2009). L'analyse des haplotypes a révélé une séparation géographique entre l'Europe, l'Amérique du Nord et l'Asie. La coexistence des haplotypes asiatiques et nord-américains notamment sur l'île Saint Laurent en Alaska et la mer de Behring suggère un scénario évolutif dans lequel chaque population de parasites dérive de refuges glaciaires où elles ont été maintenues et diffusées par un cycle impliquant des hôtes mammifères indigènes. En comparaison avec l'Europe et l'Asie, seulement quelques cas d'échinococcose alvéolaire ont été reportés en Amérique du Nord excepté l'Alaska, suggérant une pathogénicité moindre chez l'humain (Nakao et al., 2009).

2.3.2. *Echinococcus granulosus sensu lato*

2.3.2.1. Evolution de la taxonomie du groupe

De nombreux noms de sous-espèces d'*E. granulosus* ont été proposés, généralement basés sur la morphologie du stade adulte. Au début des années 1980, si un consensus existait autour d'*E. granulosus*, il apparaissait évident que cette dénomination regroupait un nombre substantiel de variants présentant des différences

morphologiques, de spécificité d'hôte, de paramètres biochimiques, de développement biologique et de distribution géographique. Ainsi, pour prendre en compte la réalité de cette diversité malgré l'absence de distinction taxonomique, un système informel de désignation de souches¹ intra-spécifiques a été progressivement adopté (Romig, Ebi, and Wassermann, 2015). Il visait à permettre de décrire les variants différenciant les uns des autres selon leur importance épidémiologique (Thompson and McManus, 2002). Ce système comprenait 11 souches, faisant référence généralement aux hôtes intermédiaires : mouton, mouton de Tasmanie, buffle, cheval, bovin, chameau, porc, variant du porc ou porc-homme, cervidé américain, cervidé de Fennoscandie et la souche lion. Initialement ce système de souches était basé sur des caractères non génétiques. Avec l'avènement de la biologie moléculaire, il fut possible d'utiliser des séquences génétiques pour définir et identifier ces souches. Une contribution majeure fut la publication des séquences partielles des gènes mitochondriaux *cox1* puis *nad1* pour 7 des 11 souches (Bowles et al., 1992; Bowles and McManus, 1993). Les données de séquences nucléotidiques obtenues correspondaient bien aux autres critères définissant les souches, ce qui a abouti à une nomenclature génotypique : G1/souche mouton, G2/souche mouton de Tasmanie, G3/souche buffle, G4/souche cheval, G5/souche bovin, G6/souche chameau, G7/souche porc. Cette nomenclature basée sur le numéro de génotype se substitua partiellement aux noms des souches. Bien que pour chaque souche d'*E. granulosus* définie précédemment seuls quelques échantillons caractérisés biologiquement ou par des critères épidémiologiques aient été génotypés, les termes de souche et de génotype devinrent progressivement synonymes (Romig et al., 2015). Par la suite, trois autres génotypes furent ajoutés : G8 pour la souche de cervidés américains (Bowles, Blair, and McManus, 1994), G9 pour la souche variant du porc ou porc-homme (Scott et al., 1997) et G10 pour la souche des cervidés de Fennoscandie (Lavikainen et al., 2003). Le manque de matériel biologique pour le séquençage n'a pas permis d'intégrer la souche lion dans ce système de génotype.

Après deux décennies d'accumulation de données épidémiologiques, biochimiques et géographiques sur les différentes souches d'*E. granulosus*, ainsi que grâce à l'évaluation phylogénétique de séquences mitochondriales et nucléaires de plus en plus longues (incluant le génome mitochondrial complet), les limites et contradictions du système de génotypes/souches devinrent apparentes et nécessitaient une révision taxonomique du genre *Echinococcus* (Romig et al., 2015). Les deux points majeurs étaient la paraphylie au sein d'*E. granulosus*, certains génotypes semblant avoir une descendance liée à *E. multilocularis* notamment, et également le fait que la distance génétique entre certains génotypes (G1 à G3 et G6, G7) les apparentait à des micro-variants du même taxon alors que d'autres (G4 et G5) étaient beaucoup plus distants. La première révision taxonomique éleva *E. granulosus equinus* Williams et Sweetman, 1963 (correspondant à la souche cheval, G4) au rang d'espèce et ressuscita *Echinococcus ortleppi* Lopez-Neyra et Soler Planas, 1943 (correspondant à la souche bovine, G5) sur la base de données écologiques, morphologiques et génétiques (Thompson, 1995; Thompson and McManus, 2002). Le nom *E. granulosus* fut laissé aux génotypes G1 à G3 alors que la classification des souches chameau, porc, cervidés et lion demeura non résolue. Cinq ans plus tard, une seconde révision taxonomique basée sur le génome mitochondrial complet éleva *E. granulosus canadensis* Webster et Cameron, 1961 au rang d'espèce en y incluant les génotypes G6 à G10 génétiquement très proches (Nakao et al., 2007). Puis finalement, *Echinococcus felidis* Ortlepp, 1937 put également être reconnu comme espèce sur la base de séquences mitochondriales obtenues à partir de vers adultes d'Afrique du Sud identifiés par Verster et conservés pendant 40 ans (Huttner et al., 2008). La taxonomie actuelle du complexe d'espèces *E. granulosus* dénommés *E. granulosus sensu lato* (*s.l.*) comprend ainsi actuellement cinq espèces : *E. granulosus sensu stricto*, *E. equinus*, *E. ortleppi*, *E. canadensis* et *E. felidis*. Néanmoins, cette redistribution taxonomique est toujours en cours en raison du regroupement de plusieurs génotypes/souches au sein de l'espèce *E. canadensis*.

¹ : Dans le contexte de la classification taxonomique d'*E. granulosus*, le terme souche (« strain ») est légèrement différent du sens biologique classique et correspond à un rang taxonomique inférieur à l'espèce qui se rapproche de la notion de variant.

2.3.2.2. Description du stade adulte

Le complexe d'espèces *E. granulosus s.l.* regroupe des espèces présentant des spectres hôtes différents avec des cycles parasitaires domestiques mais aussi sylvatiques. Les différences morphologiques pour le stade adulte et le stade larvaire au sein d'*E. granulosus s.l.* étant relativement mineures, seule une description globale sera réalisée. Le ver adulte varie entre 2 et 7 mm et est constitué de trois à quatre segments, voire jusqu'à six (Figure 9). Le pore génital est situé sur la partie postérieure du proglottis mature et gravide. L'utérus du proglottis gravide comporte des sacculations latérales contenant les œufs. Le stade larvaire est composé de vésicules uniloculaires remplies de liquide hydatique mais avec des communications possibles entre vésicules. Les kystes sont constitués d'une membrane germinative entourée d'une membrane laminaire rigide acellulaire d'épaisseur variable, elle-même entourée d'une membrane fibreuse produite par l'hôte en réaction au parasite. Les kystes ont une croissance concentrique avec une prolifération de la membrane germinative et des vésicules filles entièrement endogènes (Figure 3).



Figure 9 : Ver mature d'*E. granulosus*. Les flèches indiquent la position du pore génital (d'après Eckert et al., 2011).

2.3.2.3. Description des espèces d'*E. granulosus s.l.* et de leur diversité génétique

E. granulosus s.s. regroupe les génotypes G1, G2 et G3 qui ont démontré une très forte similarité de séquences entre eux en comparaison avec les autres génotypes/espèces. Cette nomenclature basée sur des génotypes a été définie dans les années 1990 uniquement sur la base de la publication de courtes séquences des gènes *cox1* et *nad1* (Bowles et al., 1992; Bowles and McManus, 1993). Actuellement, si la classification en génotypes au sein de cette espèce reste parfois utilisée, elle paraît désormais peu pertinente car les divergences de séquences mitochondriales entre « génotypes » apparaissent relativement faibles. De plus, la multiplication des séquences publiées démontre l'absence d'homologie avec un des trois génotypes alors qu'elles appartiennent bien au même cluster² (Nakao et al., 2013; Romig et al., 2015). Il apparaît donc plus raisonnable d'utiliser le nom d'*E. granulosus s.s.*, une distinction au sein de l'espèce pouvant être faite par l'utilisation des haplotypes mitochondriaux, qui s'avère utile pour les analyses phylogéographiques et de populations génétiques.

Il a été ainsi démontré par des analyses phylogéographiques récentes, une diminution progressive de la diversité génétique d'*E. granulosus s.s.* du Proche-Orient et Moyen Orient vers l'Europe et l'Asie orientale, et plus encore en Amérique du Sud où elle s'avère particulièrement faible. Cependant, les échantillons partagent un haplotype mitochondrial commun dans toutes ces zones (Casulli et al., 2012; Nakao et al., 2010a; Yanagida et al., 2012). Cela pourrait s'expliquer par la localisation du berceau de l'espèce aux Proche et Moyen Orient, puis un évènement de goulot d'étranglement (« bottleneck ») serait survenu, probablement causé par la domestication des moutons qui a indirectement sélectionné cet haplotype commun devenu alors majoritaire. La diversité génétique d'*E. granulosus s.s.* peut ainsi être suivie indirectement par l'histoire de la domestication des moutons.

² : le terme cluster désigne en génétique un groupe formé sur la base d'une forte similarité génétique.

La publication du génome mitochondrial complet par Le et al. en 2002 (Le et al., 2002) permit d'attribuer le rang d'espèce à *E. equinus* lors de la révision taxonomique d'*E. granulosus* (Thompson and McManus, 2002). En l'absence de critère morphologique spécifique, l'identification moléculaire est nécessaire car d'autres espèces d'*E. granulosus s.l.* peuvent également infecter les équidés (Boufana et al., 2014; Varcasia et al., 2008). Peu de données moléculaires sont actuellement disponibles même si elles deviennent plus nombreuses. Des études phylogéographiques seraient pourtant nécessaires afin de clarifier les relations génétiques entre des isolats d'un même espace géographique.

Initialement décrite par Ortlepp en 1934, *E. ortleppi* fut plus tard différenciée des souches équine et ovine par Thompson et al. (1984a) qui prédirent sa reconnaissance taxonomique actuelle. Du fait du faible nombre de cas diagnostiqués, la diversité génétique au sein de cette espèce est encore relativement mal connue. La première étude comparant des isolats provenant du sud et de l'est de l'Afrique avec d'autres de France et du Brésil a confirmé une microvariance bien plus faible que pour *E. granulosus s.s.*, sans parvenir à pouvoir expliquer la diversité génétique observée au niveau des haplotypes (Addy et al., 2016).

Les analyses phylogénétiques de l'ensemble du génome mitochondrial des génotypes G6, G7, G8 et G10 d'*E. canadensis* ont démontré qu'ils étaient très proches génétiquement, formant un cluster à part par rapport aux autres génotypes. Lors de la révision taxonomique ils furent ainsi regroupés au sein de la même espèce *E. canadensis* (Nakao et al., 2007). Le génotype G9, a été décrit à partir de lésions d'un patient polonais par Scott et al. (1997) qui demeure le seul échantillon pour ce génotype. Il semblerait sur la base d'analyses RFLP que ce génotype soit plutôt un microvariant du génotype G7 (Kędra et al., 1999), et n'ayant pas été décrit une seconde fois il n'apparaît plus distinctivement dans la taxonomie actuelle. Les particularités morphologiques, biochimiques puis moléculaires très semblables mises en évidence pour les génotypes G6 et G7 incitent désormais à fréquemment les décrire sous l'appellation mixte *E. canadensis* G6-7. Au niveau taxonomique G10 semble être plus proche de G6-7 que de G8 (Lavikainen et al., 2006; Moks et al., 2008; Nakao et al., 2013). Plus récemment, Lymbery et al. (2015) proposèrent de diviser ce cluster en trois espèces : *E. intermedius* (G6-7), *E. borealis* (G8) et *E. canadensis* (G10). Cela serait en cohérence avec la phylogénie mitochondriale et permettrait une reconnaissance formelle engendrant des conséquences importantes au niveau vétérinaire et de la santé publique. Dans l'attente de la potentielle validation taxonomique de ces trois espèces et à l'inverse d'*E. granulosus s.s.*, il apparaît nécessaire de juxtaposer au nom d'espèce *E. canadensis* le génotype concerné, afin de préciser au mieux le diagnostic (Nakao et al., 2013).

E. felidis a été longtemps considéré comme une sous-espèce d'*E. granulosus*, puis comme la souche lion. Le statut d'espèce ne lui fut reconnu que suite à sa caractérisation moléculaire à partir d'œufs provenant de fèces de lion d'Ouganda et de vers précédemment décrits comme la souche *E. felidis* (Huttner et al., 2008). Cette caractérisation récente et la difficulté d'accès aux échantillons, en raison de la nature et de l'environnement de ces hôtes, expliquent le peu de données actuellement disponibles.

2.4. Cycles parasitaires et distribution géographique des échinocoques

Les cycles parasitaires des échinocoques sont toujours basés sur la relation proie-prédateur entre mammifères carnivores et herbivores. Selon les espèces, les hôtes définitifs et surtout les hôtes intermédiaires varient avec une forte spécificité hôte/parasite reflétant une adaptation aux écosystèmes présents au cours de l'évolution parasitaire. Si des hôtes principaux permettent un maintien global des espèces parasitaires, d'autres espèces ont une participation mineure voire insignifiante aux cycles, mais peuvent notamment jouer un rôle majeur dans la transmission zoonotique dès lors qu'il s'agit d'espèces animales domestiques.

2.4.1. Les espèces non européennes : *E. shiquicus*, *E. oligarthrus*, *E. vogeli*, et *E. felidis*

E. multilocularis et *E. granulosus s.l.* (à l'exception d'*E. felidis*) sont les seules espèces présentes en Europe même si leur distribution est bien plus large. Les quatre espèces *E. felidis*, *E. shiquicus*, *E. vogeli* et *E. oligarthra*

ont des distributions géographiques plus restreintes en comparaison à *E. multilocularis* et *E. granulosus s.l.* (Tableau 2). De plus, ces quatre espèces ont des cycles sylvatiques qui impliquent parmi leurs hôtes des espèces de la faune sauvage potentiellement protégées, ce qui complique l'échantillonnage et donc les études épidémiologiques. La caractérisation précise des cycles parasites pour ces quatre espèces est souvent encore en cours.

Tableau 2 : Distribution géographique et hôtes principaux des espèces d'échinocoques non présents en Europe.

Espèces	Hôtes intermédiaires	Hôtes définitifs	Distribution géographique
<i>E. vogeli</i>	paca	chien des buissons (chien domestique)	Amérique du sud et centrale
<i>E. oligarthra</i>	agouti, paca	cougar, jaguar	Amérique du sud et centrale
<i>E. shiquicus</i>	pika	renard tibétain (chien domestique)	Plateau tibétain
<i>E. felidis</i>	à déterminer (phacochère, zèbre)	lion (hyène)	Afrique

2.4.2. *E. multilocularis*

Le cycle classique d'*E. multilocularis* est sylvatique et maintenu principalement par le renard roux (*Vulpes vulpes*) et par plusieurs espèces de micromammifères en fonction des écosystèmes (Figure 10). En zone d'endémie la prévalence chez le renard peut dépasser les 50%, alors que la prévalence chez les rongeurs varie énormément d'une zone à une autre : classiquement estimée entre 0 et 0,1 %, elle peut s'élever jusqu'à 10 % dans des zones très contaminées considérées comme « points chauds » (ou « hot spots »). D'autres espèces d'hôtes définitifs sauvages tels que le renard arctique (*Vulpes lagopus*), le chien viverrin (*Nyctereutes procyonoides*), le chacal (*Canis aureus*), le coyote (*Canis latrans*), le loup gris (*Canis lupus*), peuvent participer au cycle à des degrés moindres selon leurs distributions géographiques. Les carnivores domestiques, chiens et chats, peuvent participer à l'existence d'un cycle partiellement domestique mais considéré comme mineur, d'autant que le rôle du chat est incertain. La présence du stade larvaire d'*E. multilocularis* a été décrite chez de nombreux mammifères n'appartenant pas aux micromammifères, notamment les rongeurs aquatiques (ragondin, rat musqué, castor), les suidés, les primates qui sont considérés comme des hôtes accidentels ou aberrants.

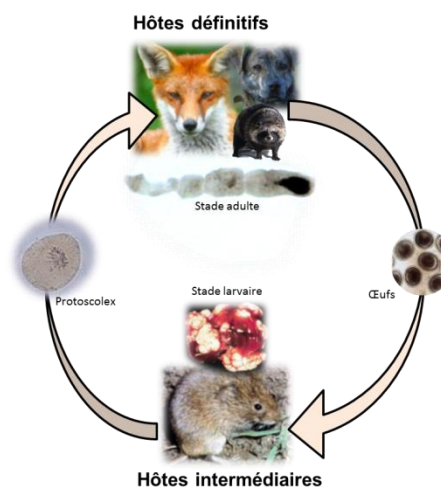


Figure 10 : Cycle parasitaire général d'*E. multilocularis* indiquant les hôtes principaux en Europe et les différents stades parasitaires.

E. multilocularis est globalement présent dans toutes les régions froides et tempérées de l'hémisphère nord (Figure 11). Cependant, la connaissance de sa distribution à une échelle plus fine est incomplète en l'absence de données pour de nombreuses régions notamment en Europe. Ainsi, si une expansion du parasite y est observée depuis les années 1980, il est difficile de se prononcer quant à la présence antérieure ou non du parasite. Toutefois, il a été observé en Europe une dispersion du parasite à partir du foyer historique autour des Alpes vers la plupart des pays du continent (Romig, 2009). Alors que la Fennoscandie semblait être épargnée, des infestations chez le renard ont été notifiées en Suède et sur l'île de Svalbard en Norvège (Fuglei et al., 2008; Osterman-Lind et al., 2011). L'augmentation des populations rurales de renards a coïncidé avec l'adaptation de cet animal au milieu urbain. La densité de population peut y être plus importante qu'en zone rurale en raison de l'abondance de nourriture anthropogène (Contesse et al., 2004). Si les prévalences chez le renard en zone urbaine peuvent être élevées, elles restent néanmoins inférieures à celles observées en zone rurale périphérique probablement en raison d'une consommation moindre de rongeurs (Deplazes et al., 2004; Jenkins, Romig, and Thompson, 2005).

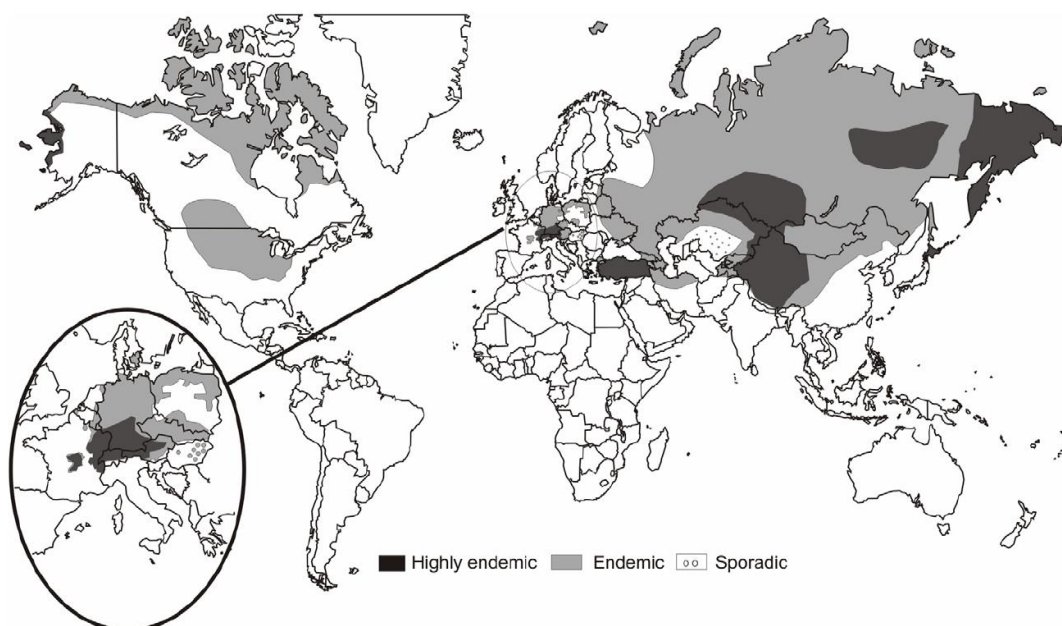


Figure 11 : Distribution géographique mondiale approximative d'*E. multilocularis* avant 2010 (Torgerson et al., 2010).

2.4.3. *E. granulosus sensu lato*

2.4.3.1. *E. granulosus sensu stricto*

Le cycle d'*E. granulosus s.s.* est domestique avec pour hôtes principaux le chien et le mouton (Figure 12). L'espèce ovine est la cause de la majorité des infestations chez les animaux de rente à travers le monde, atteignant des taux de prévalence de plus de 70% chez les ovins notamment en Afrique et en Asie. Il s'agit de la seule espèce d'*E. granulosus s.l.* présente en Australie et la seule parasitant les ovins en Amérique du Sud et du Nord (Cardona and Carmena, 2013). Un large spectre d'autres hôtes intermédiaires est décrit parmi les animaux de rente (bovins, porcins et caprins notamment) et les espèces herbivores sauvages avec des prévalences plus faibles que chez les ovins. Les kystes chez ces autres espèces ne sont généralement pas fertiles et ne participent donc que de façon très minoritaire voir insignifiante à la transmission du parasite. Toutefois, en Afrique et en Asie un taux de fertilité similaire chez les bovins à celui retrouvé chez les ovins laisse supposer un rôle épidémiologique non négligeable.

L'espèce *E. granulosus* s.s. est ainsi présente à travers tous les continents, potentiellement grâce aux mouvements anthropogéniques des moutons et des chiens, d'abord avec l'expansion du pastoralisme en Eurasie, puis avec l'expansion européenne et la colonisation en Afrique (Nakao et al., 2013).

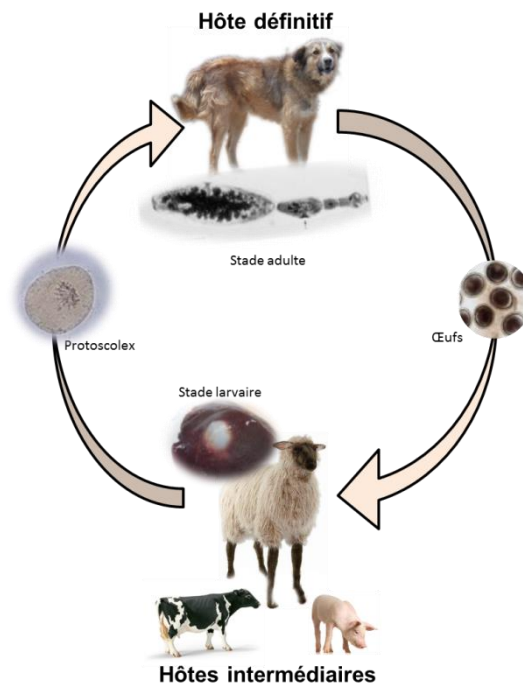


Figure 12 : Cycle parasitaire principal d'*E. granulosus* s.s.

2.4.3.2. *E. equinus*

E. equinus est présent en Europe (Royaume-Uni, Irlande, Allemagne, Italie, Espagne) et en Afrique du Nord (Tunisie et Egypte) par le biais d'un cycle domestique entre l'âne ou le cheval et le chien (Romig et al., 2015) (Figure 13). En parallèle, un cycle sylvaïque a été récemment décrit en Afrique (Namibie) entre le lion ou le chacal à chabraque (*Canis mesomelas*) et le zèbre (Wassermann et al., 2015). En dehors de cette distribution géographique reposant sur des cas confirmés, on peut supposer la présence d'*E. equinus* en Afrique du Sud et en Europe de l'est où des cas d'infestation par *Echinococcus* spp. sont identifiés sur des équidés (zèbre, cheval, âne) sans toutefois qu'une diagnose d'espèce ait été réalisée.

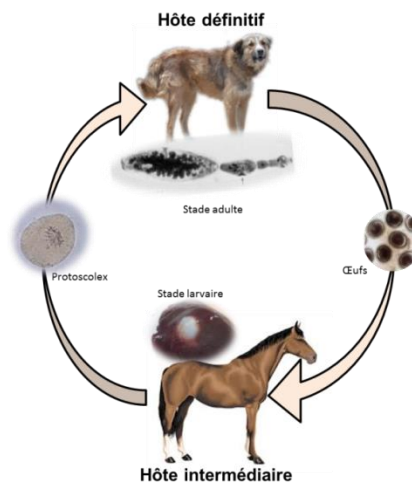


Figure 13 : Cycle parasitaire principal d'*E. equinus*.

2.4.3.3. *E. ortleppi*

E. ortleppi est quasi exclusivement inféodé aux bovins comme hôtes intermédiaires et au chien comme hôte définitif (Figure 14). En parallèle, des cas sporadiques ont été décrits à travers le monde chez le porc, la chèvre, le mouton, le chameau et le buffle. Les kystes se situent exclusivement dans les poumons avec un taux de fertilité extrêmement élevé. La période prépatente chez le chien est plus courte que pour *E. granulosus* s.s. ce qui doit être pris en compte dans le cadre de protocoles de vermifugation canine (Thompson, Kumaratilake, and Eckert, 1984b). Si cette espèce était auparavant commune en Europe centrale dans les années 1980, elle est désormais considérée comme absente ou n'est détectée que sporadiquement (Romig et al., 2006). Ailleurs, de rares cas ont été détectés en Afrique, en Inde, ou en Amérique du Sud (Romig et al., 2015).

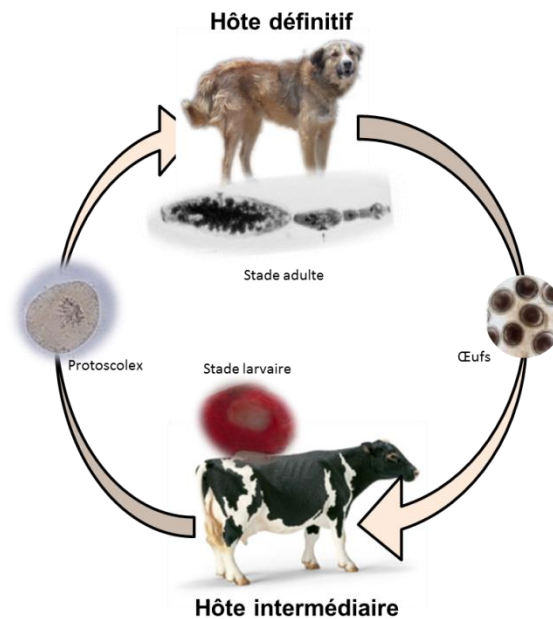


Figure 14 : Cycle parasitaire principal d'*E. ortleppi*.

2.4.3.4. *E. canadensis*

La taxonomie de cette espèce fait toujours débat, en raison du regroupement de souches/génotypes génétiquement très proches mais qui ont des hôtes parmi des espèces animales très différentes. Ainsi, si le chien est l'hôte définitif principal d'*E. canadensis* G6 et G7, les hôtes intermédiaires sont respectivement les camélidés et les suidés (principalement le porc mais aussi les sangliers), mais également aussi les caprins (Figure 15). Par contre pour *E. canadensis* G8 et G10, il s'agit de cycles sylvatiques ou semi-domestiques entre chiens, loups et cervidés (renne et élan) (Figure 15). Avec la disparition des chiens de travail, la présence d'*E. canadensis* en Fennoscandie est à nouveau très dépendante des loups, comme avant la domestication des chiens (Oksanen and Lavikainen, 2015). Ces deux génotypes ne sont d'ailleurs observés que dans les pays du nord et la Russie. A l'inverse, *E. canadensis* G6-7 est présent en Europe et en Amérique chez le porc, mais aussi en Afrique chez les camélidés et également dans une moindre mesure les ovins et bovins. En Europe, la prévalence est généralement faible (<5 %) alors qu'elle est plus élevée en Afrique (jusqu'à 60 %) (Cardona and Carmena, 2013).

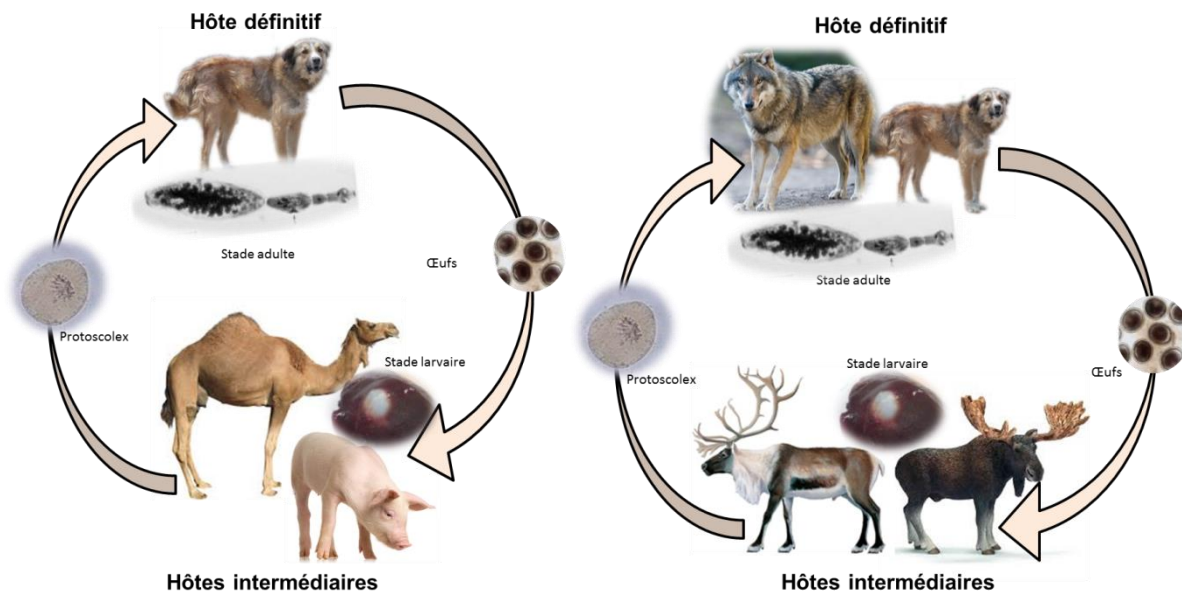


Figure 15 : Cycle parasitaire principal d'*E. canadensis* G6-7 (à gauche) et G8-G10 (à droite).

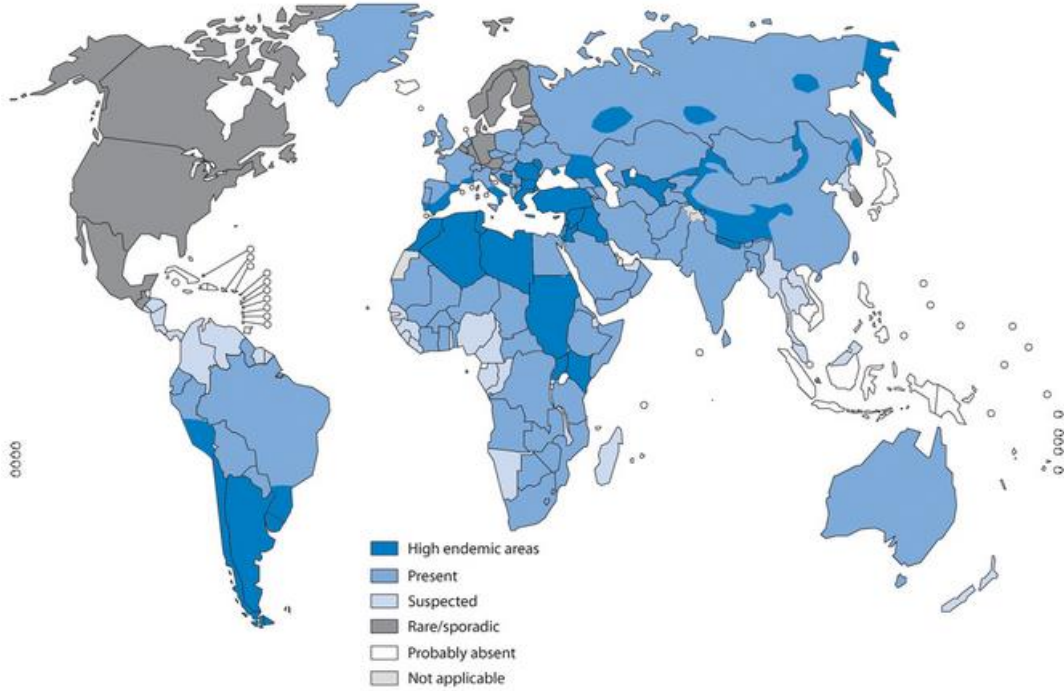


Figure 16 : Distribution géographique supposée d'*E. granulosus* s.l. en 2009 (Rodriguez-Morales, 2015)

2.5. Aspects médicaux et potentiel zoonotique

2.5.1. Les espèces néotropicales : *Echinococcus vogeli* et *Echinococcus oligarthra*

De ces deux espèces, *E. oligarthra* est la plus rare, seuls quatre cas humains ayant été rapportés actuellement chez deux patients au Brésil, un patient au Venezuela et un autre au Surinam (D'Alessandro and Rausch, 2008; Soares et al., 2013). Si une localisation hépatique a été observée chez un des patients, chez les autres il s'agissait d'une localisation cardiaque et orbitale, sans que ces localisations singulières ne soient liées à une infection concomitante ou secondaire d'une infestation. Le metacestode d'*E. vogeli* est polykystique,

contrairement à celui d'*E. oligarthra*, qui est à kyste unique. *E. vogeli* apparaît également comme l'espèce la plus pathogène pour l'homme au sein du genre *Echinococcus*. Un recensement récent des cas a permis d'évaluer le nombre de cas à plus de 170 (D'Alessandro and Rausch, 2008). Ce nombre a augmenté dans les dix dernières années au cours desquelles une centaine de cas ont été ajoutés. Si 12 pays sont concernés, 58 % des cas sont originaires du Brésil. Deux cas français ont été rapportés provenant de Guyane, l'un chez un chasseur (Knapp et al., 2009a) et l'autre chez un enfant (Debourgogne et al., 2017). Le nombre de cas d'échinococcose polykystique est largement sous-estimé, toutefois une surveillance médicale particulière au Brésil pourrait aider à tendre vers un recensement plus complet.

2.5.2. *Echinococcus shiquicus*

Le potentiel zoonotique d'*E. shiquicus* reste indéterminé, alors que de nombreux cas d'échinococcose kystique ou alvéolaire ont été diagnostiqués dans les populations tibétaines. Le passage du parasite chez le chien pourrait faciliter la transmission à l'homme si l'espèce s'avère zoonotique. Une attention particulière est désormais portée à *E. shiquicus* lors des programmes épidémiologiques sur le plateau tibétain, la détection des cas d'échinococcose par échographie ne permettant pas de caractériser l'espèce (Xiao et al., 2005).

2.5.3. *Echinococcus multilocularis*

E. multilocularis est l'agent causal chez l'homme de l'échinococcose alvéolaire. Le développement du métacestode est similaire à une tumeur avec croissance invasive et destructive des tissus de l'hôte induisant potentiellement une maladie grave avec un taux de létalité élevé. Initialement le développement larvaire est quasi-exclusivement localisé au niveau hépatique, il existe des formes exclusivement extra-hépatiques mais elles sont rarement (2-4%) observées (Bresson Hadni et al., 2014). Les lésions peuvent mesurer de quelques millimètres à 15-20 cm de diamètre. A partir du foie, le métacestode a tendance à se disperser vers les organes adjacents mais aussi à des organes plus distants par infiltration ou par formation de métastases causées par la diffusion de cellules germinatives dans le système lymphatique et sanguin.

Les études épidémiologiques ont démontré que la majorité des individus exposés au parasite manifestent une résistance à la maladie caractérisée par une séroconversion et/ou par la présence de lésions abortives, calcifiées et asymptomatiques (Gottstein et al., 2015). Chez les individus atteints d'échinococcose alvéolaire « classique », le développement du parasite est contrôlé partiellement par le système immunitaire, alors que chez les individus immunodéprimés, une hyper-prolifération incontrôlée du parasite est observée. Une période asymptomatique initiale de 5 à 15 ans caractérise les cas d'échinococcose alvéolaire et l'âge moyen du diagnostic chez les patients se situe entre 45 et 70 ans. Les cas asymptomatiques résultant d'un diagnostic fortuit sont en augmentation, représentant dorénavant un cas sur deux en France, du fait de l'augmentation de la réalisation du nombre de scanners et d'échographies (Bresson Hadni et al., 2014). Chez les patients symptomatiques, l'expression clinique est fonction de la localisation et de la taille de la masse parasitaire, se traduisant soit par une lésion volumineuse, soit par l'extension ou la compression des structures vasculaires ou biliaires. Classiquement, une hépatomégalie (20% des cas), des douleurs abdominales (25-30%), un ictère (20%) et dans les formes sévères et métastatiques, des atteintes pulmonaires, spléniques, cérébrales ou osseuses peuvent être observées (Bresson Hadni et al., 2014). Le diagnostic de l'échinococcose alvéolaire est basé sur les données cliniques et épidémiologiques, les techniques d'imagerie, principalement l'échographie abdominale, la sérologie, l'histopathologie et potentiellement la biologie moléculaire (Brunetti, Kern, and Vuitton, 2010). Le traitement nécessite une approche multidisciplinaire, où la chirurgie radicale suivie d'un traitement parasitostatique à l'albendazole est la méthode de choix dès lors qu'elle est possible. En cas de diagnostic plus tardif, le traitement à l'albendazole en continu est devenu la norme et la transplantation hépatique est réservée aux cas les plus extrêmes (Brunetti et al., 2010).

Il pouvait être attendu que l'échinococcose alvéolaire disparaisse en Europe à la fin du 20^{ème} siècle conséquemment à l'augmentation considérable des mesures sanitaires vis-à-vis des risques alimentaires, à la diminution des populations ayant une activité à risque liée à l'agriculture et à la progression de l'urbanisation.

En fait, le nombre de patients en Europe augmente dans les pays historiquement endémiques et des cas sont déclarés dans des pays où la maladie n'était pas déclarée avant la fin du 20^{ème} siècle (Vuitton et al., 2015). En 2010, une revue de la littérature a permis d'évaluer qu'environ 18 235 (IC_{95%} : 11 900-28 200) nouveaux cas d'échinococcose alvéolaire sont diagnostiqués par an, dont 91% des cas provenant de Chine, et donc 1606 cas hors de Chine (Torgerson et al., 2010). L'espérance de vie corrigée de l'incapacité³ (EVCI ou DALY en anglais) due à l'échinococcose alvéolaire pour la population mondiale a ainsi pu être estimée à 666 434 années perdues par an. En Suisse, l'augmentation de l'incidence constatée chez l'Homme depuis les années 2000 coïncide avec l'augmentation 10-15 ans auparavant des populations de renards, ainsi que cela est reflété par le tableau de chasse. Ce délai correspond à la période asymptomatique de l'infestation chez l'homme, ce qui renforce cette corrélation (Schweiger et al., 2007). En France, le registre des cas diagnostiqués est tenu par le Centre National de Référence de l'échinococcose alvéolaire (CNR EA) du CHU de Besançon. Ainsi de 1982 à 2013, 559 cas diagnostiqués ont été recensés (Grenouillet et al., 2013). Avec une moyenne de 23,6 nouveaux cas par an pour la période 2003-2012, l'incidence a presque doublé par rapport à la décennie précédente (Bresson Hadni et al., 2014). Si la majorité des cas font partie de la zone historique d'endémie connue, d'autres se situent cependant en dehors de ces zones.

2.5.4. *Echinococcus granulosus sensu lato*

E. granulosus s.l. est l'agent étiologique de l'échinococcose kystique ou hydatidose. Le stade larvaire est constitué par une structure kystique contenant le liquide hydatique au sein duquel se retrouvent les protoscolex générés par les cellules germinatives. Environ 80 % des patients ont un seul kyste, majoritairement retrouvé au niveau du foie. Toutefois, plusieurs kystes peuvent être observés, fertiles ou non, dans le foie et/ou les poumons ou bien encore d'autres organes (Brunetti et al., 2010). Les kystes peuvent grossir de 1 à 50 mm par an, ou ne pas évoluer voire se rompre ou bien même disparaître pour des raisons encore non clairement définies (Rogan et al., 2006). Les symptômes apparaissent généralement lorsque les kystes compriment des tissus voisins ou se rompent. Le diagnostic est réalisé par échographie ou par une méthode sérologique (ELISA et Western blot). L'âge des patients peut énormément varier (de 1 à 75 ans), toutefois la majorité des cas se situent bien avant 40 ans, donc chez des patients bien plus jeunes que dans le cas de l'échinococcose alvéolaire. Pour le traitement, un consensus a été obtenu vis-à-vis d'une approche basée sur la détermination du stade d'évolution basée sur les techniques d'imagerie, afin de choisir l'une des quatre options suivantes : traitement percutané, chirurgie, traitement antiparasitaire ou encore l'approche « watch and wait » pour des kystes inactifs sans complications (Brunetti et al., 2010). En zones d'endémie, l'incidence annuelle de l'échinococcose kystique varie de moins de 1 à 200 cas pour 100 000 habitants (Eckert et al., 2001). L'EVCI due à l'hydatidose au niveau de la population mondiale a été estimée à environ 285 407 années perdues par an (Budke, Deplazes, and Torgerson, 2006). En France, en l'absence de données animales récentes, il a été admis de considérer comme importée (infestation hors de France) notamment du Maghreb une très large majorité voire la totalité des cas.

Le complexe *E. granulosus s.l.* regroupe cinq espèces, mais celles-ci n'ont pas toutes le même potentiel ni le même impact zoonotique. *E. granulosus s.s.* est responsable d'environ 88 % des cas d'échinococcose kystique, avec une répartition mondiale (Alvarez Rojas, Romig, and Lightowers, 2014). *E. canadensis* est l'autre espèce contribuant significativement au nombre de cas humains (environ 11%) mais cela est dû quasi-exclusivement à des infestations par les génotypes G6 et G7. Seuls quelques rares cas ont été décrit pour *E. ortleppi* et *E. canadensis* G8 et G10. Aucun cas humain n'a été décrit pour *E. equinus*, considéré comme non zoonotique, alors que le potentiel zoonotique d'*E. felidis* demeure encore inconnu, même si la forte proximité génétique avec *E. granulosus s.s.* laisse suggérer une possibilité d'infestation humaine (Nakao et al., 2013).

³ EVCI : Unité utilisée pour mesurer à la fois la charge globale de la morbidité au niveau d'une population et l'efficacité des interventions en santé. Elle s'exprime en années de vie corrigée de l'incapacité (AVCI) qui correspond au nombre cumulé d'années en bonne santé perdues à l'échelle de cette population.

3. Techniques de diagnostic et/ou de dépistage chez l'animal

3.1. Présentation

Les méthodes de diagnostic/dépistage sont similaires pour un stade donné au sein du genre *Echinococcus* et notamment pour *E. multilocularis* et *E. granulosus s.l.* Elles sont principalement axées sur des méthodes de détection *post-mortem* chez les hôtes définitifs et intermédiaires. Toutefois la recherche des œufs ou plus largement de l'ADN parasite dans les fèces constitue une approche non-invasive de dépistage/surveillance de plus en plus répandue grâce à l'amélioration des techniques, notamment celles basées sur la biologie moléculaire. Les techniques de diagnostic/dépistage utilisées se distinguent essentiellement selon le stade parasite et donc le type d'hôte, définitif ou intermédiaire, concerné.

Ainsi, pour *E. multilocularis*, le cycle est quasi-exclusivement sylvatique entre renards et rongeurs. La prévalence de l'infestation vulpine étant toujours bien plus élevée (jusqu'à plus de 50 %) que celle observée chez les rongeurs (estimée globalement à <1 ‰), le renard est généralement considéré comme l'espèce cible dans une perspective de surveillance. De plus, son statut de nuisible permet le prélèvement par tir de nuit ou piégeage par les personnes autorisées, ce qui facilite la logistique d'accès aux prélèvements. En ce qui concerne *E. granulosus s.l.*, les cycles épidémiologiques étant principalement domestiques, la facilité d'accès aux viscères (foies, poumons) des animaux de rente lors de leur passage en abattoir et le fait qu'ils présentent des taux de prévalence nettement supérieurs (jusqu'à plus de 80 % en zone hyper-endémique) par rapport à ceux observés chez le chien (de 1 à 10 % en zone endémique) conditionne une surveillance ciblant les hôtes intermédiaires domestiques. Néanmoins, que cela soit pour *E. multilocularis* ou *E. granulosus s.s.*, les approches techniques ciblant l'autre catégorie d'hôte ne sont pas à négliger car elles demeurent très utiles à des fins épidémiologiques, afin de caractériser les cycles parasites et d'identifier d'éventuels hôtes secondaires, notamment ceux ayant un rôle zoonotique potentiel.

3.2. Dépistage chez l'hôte définitif

Les hôtes définitifs d'*E. multilocularis* et d'*E. granulosus s.l.* sont des carnivores, principalement des canidés, et regroupent des espèces sauvages et domestiques. L'infestation de ces hôtes définitifs est asymptomatique et cela, même pour des individus très fortement parasités. Le dépistage des infestations intestinales est basé sur l'identification directe du parasite par l'utilisation de techniques morphologiques, immunologiques ou moléculaires, généralement à partir d'intestins ou de fèces (Conraths and Deplazes, 2015). Ces techniques peuvent être théoriquement employées chez les différentes espèces d'hôtes définitifs, notamment le chien et le renard. Néanmoins, il est indispensable de prendre en compte la variation des périodes prépatentes, patentes, de la charge parasite et du développement des vers selon les espèces animales ciblées. La collecte et la manipulation de ces échantillons de fèces et d'intestins potentiellement parasités nécessite de prendre des précautions de biosécurité. Ainsi, une décontamination est généralement réalisée par le biais d'une surgélation à -70°C pendant plusieurs jours pour faciliter la manipulation lors des analyses (Veit et al., 1995).

3.2.1. Analyses du contenu intestinal

Ces analyses se réalisant *post-mortem*, leur faisabilité est conditionnée indirectement par les espèces animales cibles. Si de par leur statut de nuisible des cadavres de renards sont accessibles, il est plus rare de pouvoir disposer de cadavres d'animaux domestiques tels le chien ou le chat, à moins de se situer dans des zones géographiques où la régulation de ces populations est pratiquée, notamment celle de chiens errants. L'obtention de vers par ce biais permet de disposer d'un matériel génétique parasite pour des investigations en épidémiologie moléculaire, alors que les fèces échantillonnées dans l'ampoule rectale constituent un matériel de statut parasite intestinal connu (charge, stade de développement, polyparasitisme) qui se révèle très précieux pour la mise au point et l'évaluation de nouvelles méthodes de dépistage et de diagnostic.

Les méthodes de dépistage intestinal reposent sur l'identification morphologique des vers et sont polyspécifiques, permettant l'observation quantitative de tous les helminthes et de leurs stades de développement (prémature, mature et gravide) (Conraths and Deplazes, 2015). Concernant *E. multilocularis* et *E. granulosus s.l.*, les critères d'identification reposent sur la taille du ver, la position du pore génital, la forme de l'utérus et la longueur du segment mature (Thompson and McManus, 2002). De plus, *E. multilocularis* est généralement situé majoritairement dans la partie postérieure de l'intestin alors qu'*E. granulosus s.l.* se situe plutôt dans la partie antérieure.

La SCT (Sedimentation and Counting Technique) est considérée par l'OIE (Office International des Epizooties) comme la seule technique de référence pour les échinocoques avec une sensibilité estimée proche de 100 % (Eckert and Deplazes, 2001). Brièvement, cette technique consiste d'abord à inciser longitudinalement l'intestin pour retirer les gros débris et réaliser une première observation des helminthes visibles macroscopiquement. Après incision de l'intestin en plusieurs segments, ceux-ci sont ensuite transférés dans une bouteille contenant 1 litre de solution physiologique saline ou d'eau. Suite à un secouage énergique pendant quelques secondes, la muqueuse intestinale est ensuite décrochée par un pincement entre deux doigts au-dessus de la bouteille. Les segments intestinaux sont éliminés et le contenu liquide obtenu est ensuite laissé à sédimenter plusieurs fois en retirant à chaque fois le surnageant jusqu'à obtenir un culot clair. Le contenu obtenu est ensuite observé sous la loupe binoculaire à un grossissement d'environ 120x par petites portions de quelques millilitres de contenu dilué dans l'eau ou de la solution physiologique.

La technique de secouage dans un flacon dont l'acronyme international est SVT (« shaking in a vessel technique »), est une variante de la SCT. L'étape de sédimentation est remplacée par une filtration par le biais d'un flacon fermé par un filtre et secoué pour éliminer le surnageant (Duscher, Prosl, and Joachim, 2005). Cette technique peu répandue aurait une sensibilité égale à celle de la SCT, avec une même durée de manipulation. Après la SCT, la technique de grattage la plus courante est l'IST (Intestinal Scrapping Technique). Le racleage s'effectue à l'aide de lames de microscopes, à raison de généralement cinq lames pour chaque tiers de l'intestin. Cette technique est plus rapide mais sa sensibilité est évaluée à 78 % et 73 % en comparaison respectivement de la SCT et de la SVT respectivement (Duscher et al., 2005; Hofer et al., 2000).

3.2.2. Analyses coprologiques

La détection microscopique des œufs ou proglottis après concentration d'échantillons de fèces par des méthodes coprologiques classiques souffre généralement d'une faible sensibilité. De plus, l'impossibilité de distinguer morphologiquement les œufs du genre *Echinococcus* de ceux du genre *Taenia* complique encore cette approche. Il apparaît donc indispensable de pouvoir disposer d'autres méthodes permettant l'analyse non-invasive d'échantillons pour permettre d'estimer le taux d'infestation des populations de carnivores notamment domestiques en *pre-mortem* ou bien encore d'estimer la contamination environnementale par la collecte de fèces directement dans l'environnement.

3.2.2.1. Détection de copro-antigènes

La détection de copro-antigènes des échinocoques par une technique ELISA (copro-ELISA) a débuté dans les années 1990. Alors que des tests ont été initialement développés pour *E. granulosus*, des réactions croisées ont été observées avec *E. multilocularis* et ils ont généralement une spécificité qui se limite au niveau du genre *Echinococcus*. Des anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre des antigènes somatiques ou des produits d'excrétion/sécrétion ont été utilisés (Craig et al., 2015). La sensibilité de ces copro-ELISA est estimée entre 78 et 100 % pour *E. granulosus* chez le chien et 84% pour *E. multilocularis* chez le renard en comparaison avec un dépistage intestinal (Allan et al., 1992; Benito and Carmena, 2005; Buishi et al., 2005; Deplazes et al., 1999; Stieger et al., 2002). La sensibilité est corrélée avec la charge parasitaire, mais il est possible de détecter des infestations pendant la période prépatente et pendant quelques jours après la disparition des vers de l'intestin (Al-Sabi et al., 2007; Deplazes et al., 1992; Deplazes et al., 1999; Jenkins and Romig, 2000; Kapel et al.,

2006). Malgré l'utilisation d'anticorps monoclonaux, des réactions croisées peuvent être observées avec des parasites appartenant à d'autres espèces, notamment avec *Taenia hydatigena* (Craig et al., 2015).

Les copro-antigènes sont riches en carbohydrates et en glycoprotéines, ce qui leur confère une grande stabilité à la dégradation dans l'environnement. Cette caractéristique permet leur détection pendant une longue période après défécation et donc l'utilisation de fèces collectées dans l'environnement indépendamment de leur état de fraîcheur. Cependant, actuellement, aucun test n'utilise des anticorps monoclonaux hautement spécifiques du genre *Echinococcus* ni des anticorps polyclonaux dirigés contre des fractions antigéniques définies, ce qui compromet la reproductibilité de ces tests à grande échelle et au fil du temps (Conraths and Deplazes, 2015).

3.2.2.2. Détection de copro-ADN

Le principe du diagnostic par PCR (réaction de polymérisation chaîne) chez les hôtes définitifs repose sur la détection dans les fèces de copro-ADN parasitaire issu des œufs, des proglottis ou des cellules parasitaires (Mathis and Deplazes, 2006). Du fait de la forte résistance des œufs, la matrice fécale peut être collectée après plusieurs jours dans l'environnement puis être conservée à des températures négatives (-20°C ou -80°C) ou encore dans l'éthanol à 70° en vue de son analyse ultérieure (Conraths and Deplazes, 2015). Toutefois la présence d'inhibiteurs de la PCR au sein de la matrice fécale nécessite généralement d'utiliser des petites quantités (0,5 à 4g) voire ultérieurement une dilution des extraits d'ADN à amplifier. Une approche pour contourner la limitation de quantité de matrice fécale consiste à recourir au préalable à une méthode de concentration des œufs (Mathis, Deplazes, and Eckert, 1996). Après une première filtration (maille de 100 µm), les œufs sont re-suspendus dans une solution de chlorure de zinc (densité 1,42), avant deux filtrations successives (maille 40 et 20 µm) permettant ensuite d'observer les œufs au microscope pour une première sélection des échantillons à analyser. Si la distinction entre les genres *Taenia* et *Echinococcus* n'est possible que par PCR, cette approche permet également lors de l'observation microscopique une diagnose morphologique des autres œufs d'helminthes présents.

3.2.3. Autres approches de dépistage

L'arécoline est un alcaloïde utilisé comme antihelminthique. La purge à l'arécoline a été considérée pendant presque 100 ans comme la technique de référence pour la détection de l'infestation canine car permettant la mise en évidence directe « *in vivo* » des parasites, principalement *E. granulosus s.l.*, à partir des chiens eux-mêmes (Craig et al., 2015). La réalisation de la purge à l'arécoline (2 mg/kg) nécessite l'accord du propriétaire et est lourde au niveau logistique car elle requiert notamment le confinement de l'animal pendant le délai de 30 minutes à une heure requis pour l'expulsion des vers. L'examen microscopique basé sur la morphologie des vers ou la mise en œuvre d'un test moléculaire permet ensuite d'identifier le ver (Craig et al., 1995; de la Rue et al., 2011). Si la spécificité de cette technique est élevée (proche de 100%), sa sensibilité s'avère relativement faible (<40-75 % pour *E. granulosus* et 21 % pour *E. multilocularis*) en comparaison avec les méthodes de détection intestinale *post-mortem* et plus particulièrement pour les faibles charges parasitaires ou lorsque la purge n'est pas complète (Craig et al., 1995; Gemmell, 1973; Lahmar et al., 2007; Ziadinov et al., 2008). L'utilisation de la purge à l'arécoline est désormais considérablement limitée au vu du risque toxique potentiel pour les chiens et n'est plus autorisée dans de nombreux pays.

Le dépistage sérologique de l'infestation canine fut considéré comme une voie prometteuse et une alternative potentielle à la purge à l'arécoline (Craig et al., 2015). Pour *E. granulosus s.l.* la spécificité était supérieure à 90 %, quant à la sensibilité elle était généralement de 35-40 % seulement, valeur très faible, surtout en comparaison avec la sensibilité des techniques de détection des copro-antigènes (Craig et al., 1995; Gasser, Zhu, and McManus, 1998). Cette approche se révéla également inadéquate pour *E. multilocularis*, en raison de la faible corrélation entre la présence de vers et la détection de copro-antigènes. De plus, il est par ce biais impossible de distinguer chez le chien une infestation intestinale classique en tant qu'hôte définitif d'une

échinococcose alvéolaire larvaire, certes peu fréquente, mais dont la fréquence de diagnostic chez les chiens est en augmentation (Conraths and Deplazes, 2015; Staebler et al., 2006).

3.3. Chez l'hôte intermédiaire

3.3.1. Diagnostic *post-mortem*

Le diagnostic d'une infestation par un parasite du genre *Echinococcus* chez l'hôte intermédiaire est majoritairement réalisé *post-mortem*, par l'observation macroscopique de lésions pathognomoniques du stade larvaire lors de l'autopsie, car les signes cliniques sont généralement très discrets et ainsi très fréquemment négligés (Eckert and Deplazes, 2001). Typiquement, pour *E. granulosus s.l.*, le diagnostic est réalisé à l'abattoir lors de l'inspection visuelle des carcasses, par palpation et/ou incision. La méthodologie consiste en la recherche de kystes blancs sous pression, généralement uniloculaires, avec une localisation majoritairement hépatique et/ou pulmonaire. Pour *E. multilocularis*, ce diagnostic est généralement réalisé lors de l'autopsie de micromammifères, avec la recherche de kystes blancs multivésiculaires, principalement sur le foie.

Cependant, le diagnostic basé sur la mise en évidence des kystes à un stade précoce s'avère difficile, tout comme dans le cas de kystes atypiques ou calcifiés, conduisant à une diminution de la sensibilité de cette approche morphologique. Inversement, lors de la recherche d'*E. granulosus s.l.*, des kystes peuvent être observés qui sont en fait dus à des lésions parasitaires causées non pas par des échinocoques, mais par d'autres parasites, notamment *Taenia hydatigena* ou d'autres espèces du genre *Taenia* mais aussi par *Toxocara spp.* ou encore *Fasciola spp.* De plus, des lésions non parasitaires mais d'origine bactérienne ou induites par l'hôte lui-même, comme des granulomes ou des lésions congénitales, contribuent aussi à limiter la spécificité du diagnostic morphologique (Cardona and Carmena, 2013; Eckert and Deplazes, 2001). Toutefois l'utilisation de techniques complémentaires permet d'améliorer ce diagnostic. Le test PCR à partir de membranes kystiques et/ou de protoscolex représente actuellement la méthode de choix, car il est désormais d'une grande disponibilité, permet d'obtenir un résultat extrêmement fiable après séquençage et offre également des possibilités de caractérisation moléculaire associées. Plusieurs cibles moléculaires communes avec celles employées pour les hôtes définitifs peuvent être utilisées selon le niveau de spécificité d'amplification souhaitée (cf. détails dans 3.4 ci-dessous). L'histologie constitue une autre approche complémentaire au diagnostic morphologique par la mise en évidence de structures membranaires pathognomoniques des échinocoques et aussi potentiellement de protoscolex eux aussi caractéristiques du genre *Echinococcus*. Pour *E. multilocularis*, la détection par immunohistochimie d'antigènes spécifiques du métacestode (Em2) est également possible mais elle reste réservée à certains laboratoires spécialisés (Conraths and Deplazes, 2015).

3.3.2. Diagnostic *pre-mortem*

Le diagnostic sérologique chez des hôtes intermédiaires a longtemps été considéré comme une approche importante pour les études épidémiologiques mais aussi dans le cadre des programmes de contrôle de l'hydatidose (Craig, 1997; Lightowers, 1990). Il est ainsi possible de détecter une réponse IgG pendant plusieurs semaines chez des moutons infestés expérimentalement par *E. granulosus s.s.*, et qui s'avère spécifique puisque discriminante par rapport à des préparations antigéniques à base d'autres *Taenia* (Craig et al., 2015). Toutefois, en cas d'infestation naturelle, le niveau d'anticorps varie grandement, et une baisse de la sensibilité et de la spécificité est observée, malgré des améliorations dans la purification de l'antigène, autorisant au mieux une utilisation de tests sérologiques à l'échelle du troupeau (Ibrahim et al., 1996). La plus forte combinaison de sensibilité et de spécificité même si elle reste modeste, respectivement 62,7 % et 95,8 %, a pu être obtenue avec un test basé sur un antigène constitué par des extraits de protoscolex (Kittelberger et al., 2002). Toutefois, des techniques de diagnostic sérologique développées chez l'Homme comme le Western blot ont pu être transposés chez l'animal (Craig et al., 2015). De la même façon, le diagnostic par échographie s'est révélé très intéressant chez l'Homme, notamment pour le diagnostic de masse, et a ensuite été transposé à l'animal et plus particulièrement au mouton pour le diagnostic de l'échinococcose kystique. Chez les ovins la

taille détectable des kystes est comprise entre 0,9 et 6 cm (Dore et al., 2014). Des résultats faussement positifs peuvent être obtenus en échographie en raison d'une confusion avec *T. hydatigena*. L'utilisation de l'échographie chez les ruminants s'avère peu couteuse, pratique, avec une sensibilité et spécificité égales voire même supérieures à celles obtenues par la sérologie (Craig et al., 2015).

3.4. Cibles PCR : caractéristiques et applications

3.4.1. Les cibles PCR spécifiques d'espèces

L'identification moléculaire des échinocoques par PCR a débuté dans les années 1990 par l'amplification partielle de cibles répétées en tandem dans le génome nucléaire puis dans le génome mitochondrial d'*E. multilocularis* afin de mettre à profit le nombre multiples de copies par cellule pour augmenter la sensibilité (Bretagne et al., 1993; Dinkel et al., 1998). Un gain supplémentaire de sensibilité put être obtenu par la réalisation de PCR nichées (Dinkel et al., 1998; Monnier et al., 1996). Les premières PCR pour la détection d'*E. granulosus* furent développées une dizaine d'années après celles mises au point pour *E. multilocularis*. Une stratégie identique ciblant les séquences répétées nucléaires ou celles du génome mitochondrial fut employée (Abbasi et al., 2003; Cabrera et al., 2002; Stefanic et al., 2004). Ces PCR ciblaient initialement le génotype G1 d'*E. granulosus* s.s. Cependant, des études ultérieures ont mis en évidence un défaut de spécificité, car ce test permettait également l'amplification d'autres espèces du complexe *E. granulosus* s. l. (Boufana et al., 2008). Concernant le test permettant une détection plus large d'*E. granulosus*, regroupant les génotypes G1, G5, G6 et G7 (Dinkel et al., 2004), une réaction croisée avec *E. multilocularis* fut ainsi démontrée (Boufana et al., 2008).

3.4.2. Les cibles PCR à spectre parasitaire large

Avec l'avènement de la PCR, plusieurs couples d'amorces ont été utilisés pour l'amplification des échinocoques et l'obtention des premières séquences nucléotidiques. Ces couples n'étaient pas spécifiquement dessinés pour les échinocoques et permettaient l'amplification d'un large panel de parasites malgré la présence de mésappariements potentiels au niveau des amorces de PCR. Le génome mitochondrial fut principalement ciblé, étant donné qu'initialement ces couples d'amorces étaient utilisés à des fins phylogénétiques. Le génome mitochondrial évolue plus vite que le génome nucléaire, est haploïde et n'est pas soumis à des recombinaisons. Des séquences conservées au cours de l'évolution des gènes *cox1* et *nad1*, ont été utilisées pour la mise en place de la classification des génotypes d'*E. granulosus* (Bowles et al., 1992; Bowles and McManus, 1993). Ces deux couples d'amorces permettent l'amplification de toutes les espèces d'échinocoques mais aussi d'un panel très large de cestodes dont les espèces du genre *Taenia*, ainsi que des nématodes. Deux couples d'amorces ciblant deux autres gènes mitochondriaux (*atp6* et *nad3*) furent également souvent utilisés pour leur large spectre d'amplification. Ainsi, ces trois couples d'amorces sont régulièrement utilisés pour la caractérisation moléculaire d'*E. granulosus* s.l. ou encore dans le cadre de la diagnose des échinocoques pour l'identification d'une espèce parasitaire. Cette approche présente l'avantage d'obtenir après séquençage une séquence nucléotidique sans forcément avoir à cibler spécifiquement l'espèce ni même le genre parasitaire à identifier. Toutefois pour cette utilisation diagnostique, le large spectre d'amplification peut s'avérer problématique. En cas de multi-infection par des espèces parasitaires différentes, une seule séquence nucléotidique sera généralement obtenue, révélant uniquement la présence de l'espèce parasitaire présente en plus grande quantité (potentiellement peu ou pas pathogène) et masquant la ou les autres espèces présentes et potentiellement zoonotique(s).

3.4.3. Les PCR multiplex

L'approche par PCR multiplex a permis de tester en une seule réaction la présence de plusieurs espèces parasitaires à partir de couples d'amorces spécifiques d'une seule espèce chacun. Ainsi un test de PCR multiplex a été développé pour l'identification des œufs de *Taeniidae* à partir de fèces de carnivores (Trachsel,

Deplazes, and Mathis, 2007). La distinction des genres *Echinococcus* et *Taenia* étant impossible morphologiquement lors de l'observation microscopique des œufs, cet outil s'avère extrêmement utile pour le diagnostic coprologique. Un autre système de PCR multiplex a été développé pour *E. granulosus*, permettant l'amplification d'une séquence spécifique du genre *Echinococcus*, du complexe *E. granulosus s.l.* et des espèces *E. granulosus s.s.*, *E. equinus*, *E. ortleppi* et *E. canadensis* (Boubaker et al., 2013).

3.5. Lutte contre *Echinococcus spp.*

La lutte contre les échinocoques demeure la finalité des études épidémiologiques afin de réduire le risque zoonotique. Si une sensibilisation par la prévention peut être réalisée pour toutes les espèces du genre, seuls *E. multilocularis*, *E. granulosus s.s.* et dans une moindre mesure *E. canadensis G6/7* sont réellement concernés par la mise en place de programme de contrôle car ces espèces s'avèrent les plus répandues et sont responsables de la très grande majorité des cas humains. L'approche sera drastiquement différente selon qu'il s'agisse d'un cycle sylvatique tel que pour *E. multilocularis* ou à l'inverse d'un cycle domestique tel que pour *E. granulosus s.s.* et *E. canadensis G6/7*.

Des programmes de lutte contre l'échinococcose kystique ont déjà été menés avec succès sur des périodes de 10 à 20 ans dès les années 1960 notamment en Nouvelle-Zélande, en Tasmanie, à Chypre, en Uruguay et en Argentine (Craig and Larrieu, 2006). D'autres campagnes ont par contre échoué comme en Sardaigne mettant en avant la nécessité d'un investissement sur une longue période et l'implication de la population humaine. La vermifugation régulière des chiens, notamment les chiens errants, et la réalisation d'un abattage contrôlé systématique avec saisie et élimination des viscères parasités sont les deux leviers d'intervention en plus de la prévention pour casser le cycle parasitaire.

Pour *E. multilocularis*, le renard constitue l'espèce cible tant pour une action directe sur le parasite mais aussi en vue de la réalisation d'un suivi de l'évolution de la prévalence du parasite pour juger de l'effet de la stratégie de contrôle choisie. Deux options sont envisageables : la vermifugation des renards par distribution d'appâts contenant du praziquantel et la régulation des populations de renards. Plusieurs programmes de vermifugation ont déjà été menés et ont prouvés leur efficacité mais leur réalisation sur le long terme et leur échelle géographique de faisabilité ainsi qu'une analyse des coûts et bénéfices restent à évaluer. Des campagnes de régulations de populations renards ont été réalisées avec plus ou moins de succès, mais cela n'a jamais été effectué dans le cadre de la lutte contre l'échinococcose alvéolaire, laissant planer le doute sur un effet bénéfique ou non de ce type d'intervention d'un point de vue zoonotique.

4. Objectifs principaux

La présence en France des espèces parasitaires que sont *E. multilocularis* et *E. granulosus s.l.* est connue depuis plusieurs décennies. Le foyer historique d'endémie d'*E. multilocularis* dans l'est du pays est voisin des zones d'endémie historiques européennes en Suisse, en Allemagne et en Autriche. Quant à *E. granulosus s.l.*, il est historiquement présent sur tout le territoire français avec des régions très fortement endémiques dans le sud. Alors qu'une expansion était constatée en Europe pour *E. multilocularis* et qu'en parallèle la mise en place progressive de mesures sanitaires devait contraindre le maintien du cycle parasite d'*E. granulosus s.l.*, seules quelques très rares données ponctuelles et locales étaient disponibles quant à l'évolution de la présence de ces échinocoques en France.

Les objectifs principaux de mes travaux au sein du LNR *Echinococcus spp.*, alors fraîchement créé par la DGAI, visaient et visent toujours à remédier à ce déficit d'informations. Il s'est donc agi de réaliser des études de surveillance à large échelle géographique de ces espèces parasitaires afin de disposer d'une estimation actualisée de la répartition géographique respective d'*E. multilocularis* et *E. granulosus s.l.* et des niveaux de prévalence associés. En parallèle, il est nécessaire de pouvoir évaluer l'importance relative des différents cycles parasitaires impliqués, en identifiant les différentes espèces animales pouvant servir d'hôtes définitifs ou d'hôtes intermédiaires. Cela s'avère particulièrement important pour *E. multilocularis* dès lors que cela concerne les carnivores domestiques qui, par leur proximité avec l'homme, peuvent potentiellement jouer un rôle zoonotique important. Pour *E. granulosus s.l.*, suite à la révision taxonomique et à la disponibilité des outils moléculaires il s'agit de réaliser pour la première fois l'identification des espèces du groupe d'*E. granulosus s.l.* en France ainsi que d'identifier le rôle des espèces animales d'hôtes intermédiaires impliquées, pour aboutir à une compréhension optimale des cycles parasitaires actifs.

La réalisation d'études épidémiologiques portant sur les échinocoques nécessite d'utiliser des techniques de diagnostic/dépistage dédiées. Si les techniques de parasitologie classique notamment coprologiques ont longtemps été très utiles, le développement de nouvelles méthodes de diagnostic/dépistage notamment moléculaire est apparu nécessaire afin de disposer d'une meilleure sensibilité et d'une meilleure spécificité, d'un débit d'analyses plus important mais aussi d'une approche non invasive. Le développement et la disponibilité de ces outils doit permettre d'envisager de nouvelles perspectives dans la surveillance et l'épidémiologie d'*E. multilocularis* et d'*E. granulosus s.l.* Le développement et l'utilisation de nouveaux outils d'épidémiologie moléculaire doit quant à lui permettre l'obtention de données analytiques indispensables à la compréhension de la dispersion géographique des parasites ou de la réalisation des cycles parasitaires.

Sachant que la période de réalisation de ces travaux s'étend sur 10 ans, ce manuscrit se focalise sur les aspects qui ont abouti aux résultats les plus significatifs dans le contexte du LNR et/ou ceux pour lesquels ma contribution a été la plus importante. De plus, afin de suivre la logique de progression des études épidémiologiques menées, dont les objectifs de l'étude suivante découlent généralement des résultats de la précédente, chaque article a été présenté de manière complète (introduction, matériel et méthodes, résultats, discussion) afin de faciliter la compréhension. La description du développement de méthodes ayant servi à la réalisation des études épidémiologiques a été placé dans un encadré afin de différencier ces travaux des autres.

Les deux premières parties portant sur la description de mes travaux concernent respectivement la surveillance et l'épidémiologie moléculaire d'*E. multilocularis* et d'*E. granulosus s.l.* Ces espèces parasitaires ont été dissociées dans deux chapitres distincts en raison de la densité des travaux réalisés pour chacune d'entre elles, et ce bien que les objectifs des études épidémiologiques soient similaires. La troisième partie dévolue à l'exposé de mes travaux concerne la caractérisation des cycles parasitaires, et la quatrième l'expérimentation de différentes méthodes de lutte contre *E. multilocularis*. Enfin, une discussion globale conclut le manuscrit en présentant le bilan de ces travaux et les perspectives futures qui en résultent.

5. Surveillance et épidémiologie moléculaire d'*E. multilocularis*

La zone d'endémie connue d'*E. multilocularis*, historiquement située en Europe au nord de l'arc alpin, s'est considérablement accrue durant les trois dernières décennies. En France, seules des données concernant le foyer historique de l'est étaient disponibles jusque dans les années 2000. Il était donc nécessaire de disposer d'une observation la plus juste possible de la situation actuelle d'endémie. La nomination du LNR *Echinococcus spp.*, coïncidant avec mon arrivée au laboratoire en 2006, a entraîné la mise en place d'études de surveillance du parasite en collaboration avec différents partenaires nationaux et concernant notamment des zones géographiques encore non étudiées. Ces recherches se sont accompagnées du développement de nouvelles techniques de diagnostic/dépistage afin de disposer d'un panel de méthodes plus sensibles et plus spécifiques, permettant de cibler les différentes matrices biologiques correspondant aux trois stades du cycle parasitaire. L'acquisition de nouvelles données de surveillance a permis ensuite d'entreprendre des travaux d'épidémiologie moléculaire basés sur une analyse par microsatellites. La maîtrise de cet outil moléculaire au laboratoire a engendré la mise en place de collaborations internationales permettant au LNR de contribuer à la compréhension de l'épidémiologie moléculaire d'*E. multilocularis* en Europe.

5.1. Investigations sur la présence d'*E. multilocularis* en France

5.1.1. Définition des zones historiques d'endémie

Jusqu'aux années 2000, l'analyse d'intestins de renards avait permis de décrire une présence d'*E. multilocularis* se limitant à l'est de la France de la Lorraine à la Savoie en passant par la Franche-Comté et notamment le Doubs, qui constituait le foyer le plus important. La détection de campagnols et de renards infestés dans le Massif Central avait également permis d'ajouter un foyer auvergnat sans pouvoir démontrer l'existence d'un lien épidémiologique avec les autres zones d'endémie connues (Petavy and Deblock, 1983; Rey et al., 1977). Par la suite, le diagnostic de trois cas humains d'échinococcose alvéolaire dans les Ardennes chez des patients sédentaires a démontré pour la première fois la présence du parasite dans ce département (Depaquit et al., 1998). La découverte de ces cas pouvait laisser supposer une expansion de la zone d'endémie connue de cette parasitose.

La commercialisation d'un kit ELISA pour la détection de copro-antigènes d'*E. multilocularis*, basé sur un test initialement mis au point par Deplazes et al. (1999) constitua une opportunité pour la réalisation d'une étude à large échelle géographique. L'ELIZ⁴, l'université de Franche-Comté (UFC) et l'Anses LRFSN organisèrent une collecte de fèces de renards par les fédérations de chasseurs à travers plus de 30 départements du tiers nord-est de la France (Tolle et al., 2005). Lors des périodes hivernales de 2000 à 2004, plus de 5000 fèces furent collectées dans les zones de prairies. Le choix de se restreindre à ce type de paysage était basé sur la relation observée dans l'est de la France entre la prédominance de prairies, le risque de pullulation des micromammifères et l'augmentation de la prévalence de l'infestation vulpine par *E. multilocularis* (Giraudoux et al., 2003). Un manque de fiabilité (reproductibilité, spécificité, sensibilité) du kit ELISA commercial fut observé au fil des années. Cela entraîna l'arrêt de la production pendant 18 mois puis une nouvelle version stoppée au bout de six mois scella définitivement la disponibilité d'un kit ELISA commercial pour *E. multilocularis*. Ainsi, les résultats positifs obtenus en copro-ELISA se devaient d'être confirmés, pour cela une PCR ciblant le locus *snRNA U1* fut réalisée (Bretagne et al., 1993). Malheureusement, cette cible moléculaire s'avéra également peu spécifique compliquant l'interprétation des analyses. Toutefois, les résultats obtenus

⁴ **ELIZ** : Entente interdépartementale de lutte contre les zoonoses. Créée en 1973, cette entité est financée par les conseils généraux de la quarantaine de départements adhérents majoritairement situés dans la moitié nord-est de la France. Initialement chargée des mesures de prophylaxie contre la rage, depuis 2000 d'autres zoonoses, dont l'échinococcose alvéolaire, rentrent dans son champ de compétences, en faisant un partenaire privilégié du LNR *Echinococcus* de l'Anses LRFSN pour l'organisation logistique de terrain.

semblaient indiquer la présence d'échantillons positifs dans des zones où le parasite n'avait jamais encore été identifié. Si ces résultats se devaient d'être interprétés avec grande précaution, des investigations hors des zones historiques d'endémie parasitaire apparaissaient encore plus indispensables. La recherche du parasite dans les zones au statut endémique inconnu ou incertain suite à l'étude copro-ELISA constitua ainsi l'axe principal des travaux de surveillance que j'ai ensuite pu mener au sein du LNR et avec ses collaborateurs.

5.1.2. Expansion vers l'ouest de la zone d'endémie d'*E. multilocularis* en France

Combes, B., Comte, S., Raton, V., Raoul, F., Boué, F., **Umhang, G.**, Favier, S., Dunoyer, C., Woronoff, N., & Giraudoux, P. (2012). Westward spread of *Echinococcus multilocularis* in foxes, France, 2005-2010. *Emerging Infectious Diseases*, 18(12), 2059-2062.

Introduction :

La suspicion d'une expansion hors des zones historiques d'endémie en France a été renforcée par la présence de cas humains sédentaires dans des zones supposées non endémiques (Grenouillet et al., 2010). Plus globalement, une expansion de la répartition du parasite en Europe a été constatée ainsi que l'augmentation des populations de renards et de leur prévalence d'infestation par *E. multilocularis* dans les zones d'endémie connues (Deplazes et al., 2004; Romig et al., 2006). Une étude de surveillance de l'infestation par le parasite chez le renard en France a été coordonnée conjointement par l'ELIZ, l'UFC et le LNR *Echinococcus spp.* de l'Anses (Combes et al., 2012). Les Fédérations départementales des chasseurs (FDC) ont été les acteurs locaux de la collecte de cadavres de renards par des opérations de tir de nuit et de piégeage. Des sessions de formation ont été organisées par le LNR à destination des LVD afin de réaliser une sensibilisation épidémiologique pour *E. multilocularis* et de pouvoir réaliser le transfert de la technique SSCT validé par le LNR (Umhang et al., 2011)(encart 1) pour l'analyse des intestins.

Matériels et méthodes :

De 2005 à 2011, 44 départements de la moitié nord-est de la France ont été échantillonnés à raison d'environ 100 renards répartis de façon homogène par département. Après prélèvement, 3508 intestins ont pu être analysés par SSCT. Une confirmation de l'identification des vers comme appartenant bien à *E. multilocularis* était proposée par le LNR. Cela pouvait se faire par la transmission de photographies, qui lorsque le cliché était équivoque me permettait de rendre un avis fiable et rapide. Cependant, l'envoi de vers était demandé, ce qui a permis de réaliser une observation macroscopique sur des vers provenant de 234 renards.

Résultats et discussion :

Des vers d'*E. multilocularis* ont ainsi été identifiés dans 36 des 44 départements concernés, avec une prévalence très variable comprise entre 0 (IC_{95%} [0-5 %]) et 54 % (IC_{95%} [42-64 %]) (Figure 18). La prévalence de l'infestation des renards dans la zone historique d'endémie a pu être évaluée à 41 % (IC_{95%} : [37-44 %]). Pour cinq départements (Meurthe-et-Moselle, Moselle, Jura Doubs, Bas-Rhin) pour lesquels des données de prévalence étaient disponibles auparavant, la prévalence a quasiment triplé en 20 ans. L'augmentation de l'intensité de transmission d'*E. multilocularis* est aussi reflétée par la première description du parasite dans 25 nouveaux départements. Une expansion vers l'ouest de la zone d'endémie est observée, atteignant la Manche et le Calvados, et déplaçant ainsi le front de la zone d'endémie connue d'*E. multilocularis* en Europe de plusieurs centaines de kilomètres. Cette expansion concerne également l'agglomération parisienne. Si l'exposition en milieu urbain avait déjà été décrite en Suisse mais aussi en France à Nancy (Deplazes et al., 2004; Robardet et al., 2008), la densité de la population vulpine parisienne pourrait créer de nouvelles conditions de transmission à l'homme. Cette actualisation de la présence et de la prévalence de l'infestation par *E. multilocularis* en France appelle à une nécessité d'augmenter la prévention et à l'étendre sur tout le territoire. De plus, il apparaît indispensable de poursuivre ces travaux de surveillance épidémiologique particulièrement dans les départements frontaliers de ceux échantillonnés et pour lesquels aucune donnée de

Encart 1 : Mise au point et validation de la technique de de sédimentation et de comptage par segments (SSCT) pour le dépistage de l'infestation par *E. multilocularis* chez le renard

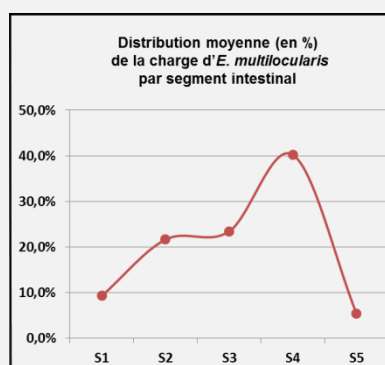
Umhang, G., Woronoff-Rhen, N., Combes, B., & Boué, F. (2011). Segmental sedimentation and counting technique (SSCT): An adaptable method for qualitative diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in fox intestines. *Experimental Parasitology*, 128(1), 57-60.

Les principaux freins à la mise en place d'études de surveillance à large échelle de l'infestation par *E. multilocularis* sont relatifs à la nécessité de la collecte d'échantillons représentatifs, en nombre suffisant, et de la disponibilité d'une méthode fiable et pouvant permettre l'analyse de tous les prélèvements collectés dans un temps raisonnable. En raison de l'absence de méthodes coprologiques robustes, la surveillance nécessitait le dépistage intestinal du parasite chez le renard. La mobilisation des fédérations de chasseurs et des laboratoires vétérinaires des départements adhérents à l'ELIZ a permis de disposer d'un réseau de collecte de renards par tirs de nuit et piégeage ainsi que d'analyses des intestins prélevés. Si la SCT constitue la méthode de référence, le caractère très chronophage de l'examen sous loupe binoculaire de tout le contenu intestinal était difficilement compatible avec le nombre d'échantillons requis pour une surveillance efficace, notamment en zone de faible endémie. L'ADILVA (Association française des Directeurs et cadres de Laboratoires Vétérinaires publics d'Analyses) a initié la recherche d'une méthode permettant le gain de temps requis en se basant sur la répartition préférentielle des vers dans la partie postérieure de l'intestin (Thompson and Eckert, 1983). Le LNR *Echinococcus spp.* a ensuite collaboré afin de réaliser la mise au point proprement dite puis la validation de cette technique SSCT (Umhang et al., 2011).

La démarche de mise au point de la SSCT a consisté à déterminer les zones préférentiellement infestées en divisant l'intestin en cinq segments de taille égale lors de la réalisation d'une SCT classique. A partir des 117 intestins de renards infestés par *E. multilocularis*, la meilleure sensibilité pour un segment unique a été obtenue pour le segment 4 (S4), avec la confirmation de la répartition intestinale postérieure d'*E. multilocularis* pour 94,3 % des échantillons (Tableau 3). Afin d'augmenter la sensibilité, l'analyse d'un second segment est ajoutée. La sensibilité maximale obtenue avec la combinaison de deux segments atteint alors 98,3 % (IC₉₅ % [93,4-99,7 %]) avec la combinaison des segments S4-S1 et S4-S2, certains intestins présentant parfois des vers uniquement dans la partie antérieure.

Tableau 3 : Sensibilité de la SSCT pour chaque segment ou paire de segments en comparaison avec la méthode SCT d'après Umhang et al. 2011. Les lignes SCT et SSCT indiquent le nombre de renards ayant fourni des résultats positifs avec chacune des techniques en fonction du segment ou de la paire de segments analysés. CI- et CI+ indiquent les bornes inférieures et supérieures de l'intervalle de confiance à 95 %.

Segment	S1	S2	S3	S4	S5	S1 + S2	S1 + S3	S1 + S4	S1 + S5	S2 + S3	S2 + S4	S2 + S5	S3 + S4	S3 + S5	S4 + S5
SCT															
SSCT	66	82	93	109	68	85	97	115	86	96	115	93	113	99	110
Sensitivity	56.4	70.1	80.3	93.2	58.1	72.6	83.8	98.3	73.5	82.9	98.3	79.5	97.4	85.5	94
CI-	46.94	60.81	70.82	86.55	48.64	63.5	74.59	93.35	64.4	73.64	93.35	70.83	90.96	76.51	87.62
CI+	65.55	78.02	86.17	96.79	67.06	80.29	89	99.7	81.03	88.3	99.7	86.17	98.9	90.38	97.35



L'estimation de la charge parasitaire pour les 53 intestins analysés par le LNR et ayant fourni un résultat positif a permis d'obtenir une visualisation de la répartition intestinale des vers et de vérifier que la combinaison de segments choisis était également adaptée pour les faibles (11 à 100 vers) et les très faibles (1-10) charges parasitaires (Figure 17).

Figure 17 : Représentation de la distribution moyenne de la charge parasitaire pour les 53 intestins positifs pour *E. multilocularis* analysés par le LNR.

Les prévalences vulpines d'*E. multilocularis* étant généralement comprises entre 0 % et 50 %, la majorité des échantillons analysés sont négatifs. La validation de cette technique SSCT permet ainsi un gain de temps considérable pour ces échantillons négatifs en limitant l'examen du contenu intestinal à 40 % de sa longueur en comparaison avec une SCT. Concernant les échantillons ayant fourni un résultat positif, deux approches peuvent être possibles : soit stopper l'analyse dès l'observation du premier ver pour une réponse qualitative, soit l'obtention d'une réponse quantitative en réalisant l'observation sur les 5 segments. Pour cette dernière approche, l'examen de seulement 20 % du contenu intestinal de chaque segment une fois le premier ver observé peut permettre une estimation rapide et fiable de la charge parasitaire. En comparaison des autres techniques de dépistage intestinal, la SSCT conserve la même spécificité car elle repose sur l'identification morphologique du stade adulte et une sensibilité plus forte ou similaire. Le gain de temps est ainsi l'avantage principal par rapport aux autres techniques notamment la SCT et la SVT qui nécessitent l'observation de l'intégralité du culot intestinal. Cette technique apparait donc parfaitement adaptée aux études de surveillance à large échelle géographique nécessitant l'analyse de nombreux échantillons et tout particulièrement dans des zones de faible prévalence ou au statut endémique inconnu.

Projet de cartographie de l'échinococcose alvéolaire

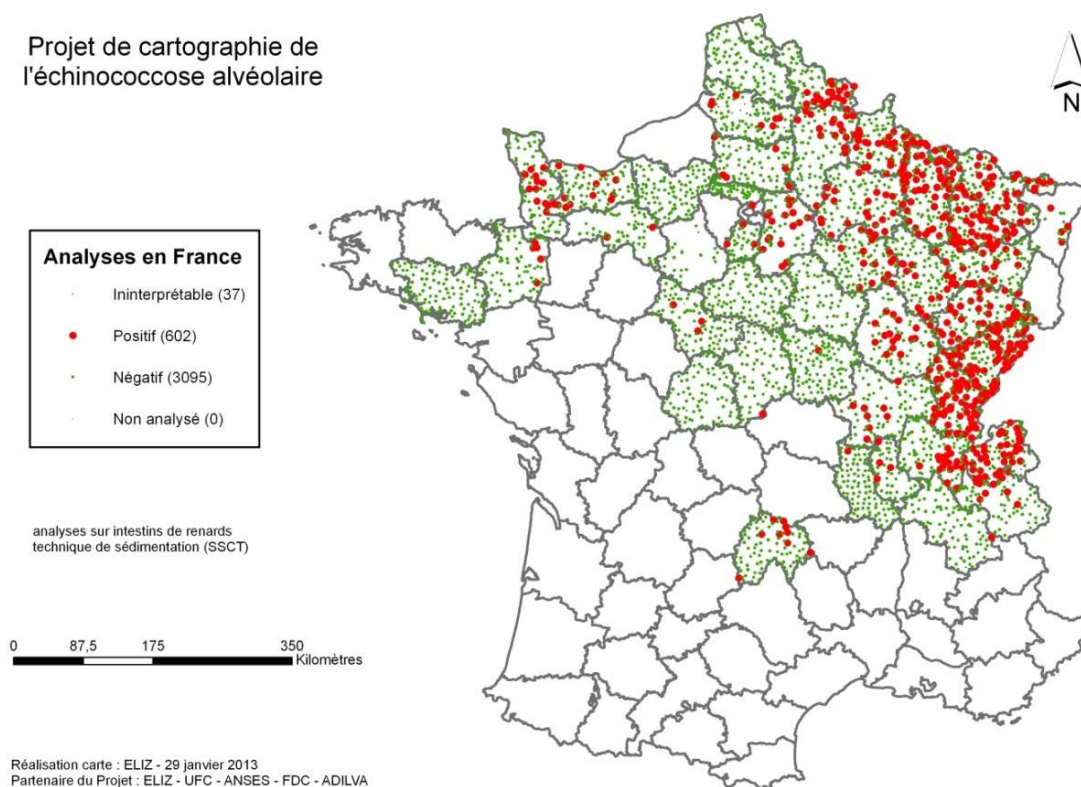


Figure 18 : Distribution des renards analysés dans les départements échantillonnés. Les renards infestés par *E. multilocularis* sont en rouge et ceux non infestés en vert.

surveillance épidémiologique particulièrement dans les départements frontaliers de ceux échantillonnés et pour lesquels aucune donnée de présence du parasite n'est actuellement disponible. Dans ce cadre, l'analyse d'intestins de renards en Ile-et-Vilaine en 2012 (Combes et al., 2013) a permis d'ajouter ce département à la zone d'endémie connue d'*E. multilocularis* en France. L'absence de résultats positifs pour *E. multilocularis* lors de l'analyse d'environ 100 intestins de renards dans le Morbihan en 2012 puis à nouveau en 2015 laisse supposer que la limite ouest actuelle de la zone d'enzootie se situerait dans l'Ile-et-Vilaine.

5.1.3. Surveillance d'*E. multilocularis* par le biais d'investigations chez les rongeurs aquatiques

Umhang, G., Richomme, C., Boucher, J.-M., Guedon, G., & Boué, F. (2013a). Nutrias and muskrats as bioindicators for the presence of *Echinococcus multilocularis* in new endemic areas. *Veterinary Parasitology*, 197 (1-2), 283-287.

Introduction :

Classiquement la surveillance de l'infestation par *E. multilocularis* à une large échelle géographique requerrait l'analyse d'intestins de renards comme l'illustre ce qui a été réalisé précédemment en France (Combes et al., 2012). Le développement des techniques moléculaires de PCR a permis d'envisager l'analyse d'autres types de prélèvements et le ciblage d'autres espèces. Ainsi, des investigations basées sur la recherche du stade larvaire chez des hôtes intermédiaires ont été facilitées. Les prévalences observées chez les micromammifères, hôtes intermédiaires principaux du cycle parasitaire, sont extrêmement faibles. Ces espèces animales ne pouvaient donc convenir dans une perspective de surveillance hors zone de très forte endémie car cela nécessiterait un effort d'échantillonnage extrêmement conséquent et lourd. De plus cela ne permettrait pas la mise en évidence de différence significative de niveaux d'endémie. Cependant, d'autres espèces telles les rongeurs aquatiques que sont le ragondin (*Myocastor coypus*) et le rat musqué (*Ondatra zibethicus*), dont la durée de vie est plus longue, pourraient éventuellement convenir à la surveillance du parasite. Ces espèces étant déjà reconnues comme hôtes intermédiaires en France, aux Pays-Bas en Belgique et en Allemagne (Borgsteede,

Tibben, and Van Der Giessen, 2003; Boussinesq et al., 1986; Frank and Zeyhle, 1981; Hanosset et al., 2008; Romig et al., 2011), la question s'est posée de la pertinence de leur utilisation dans le contexte d'investigations dans des zones de faible endémie ou potentiellement endémiques. Les populations en Europe de ces deux espèces invasives de rongeurs aquatiques originaires des Amériques ont considérablement augmenté dans les années 1970 et 1980 (Abbas, 1991; Anonyme, 2013). Elles sont actuellement considérées comme nuisibles de par leur impact négatif sur leur habitat et leur rôle dans l'introduction et la dispersion d'agents pathogènes (Barrat, Richomme, and Moinet, 2010). Etant très présentes dans le grand ouest de la France, des campagnes annuelles de piégeage y sont organisées afin de limiter leurs populations. En 2010, le LNR *Echinococcus spp.* a profité de la mise en place d'un programme mené par Le réseau des Fédérations Départementales des Groupements de Défense contre les Organismes Nuisibles (FDGDON) et des Fédérations Régionales de Défense contre les Organismes Nuisibles (FREDON) du grand ouest sur la GEstion DUrable des VERTébrés déPRédateurs en milieu Rural (étude GEDUVER) pour ajouter l'échinococcose alvéolaire à la liste des agents pathogènes zoonotiques recherchés chez ces espèces.

Matériels et méthodes :

La zone d'étude était constituée de douze départements de la Basse Normandie, de la Bretagne et des Pays de la Loire. Trois départements (Manche, Calvados et Orne) étaient au moment de l'étude identifiés comme endémiques pour *E. multilocularis* (Combes et al., 2012), mais le parasite a également été retrouvé les années suivantes en Ille-et-Vilaine (Combes et al., 2013). Les sept autres départements (Finistère, Côtes d'Armor, Loire-Atlantique, Vendée, Maine-et-Loire, Mayenne et Sarthe) n'avaient jamais fait l'objet d'investigations auparavant pour ce parasite. Dans chaque département, cinq rivières ou étangs ont été sélectionnés aléatoirement pour le piégeage des rongeurs aquatiques de septembre à décembre 2010. Au total, 531 ragondins et 285 rats musqués ont été piégés. Lors de l'autopsie réalisée par les LVD, un prélèvement était réalisé dès lors que la présence de kystes sur le foie était observée. Au LNR ces kystes ont été traités selon le protocole mis en place pour ce type de lésions (encart n°2) permettant d'observer la fertilité du stade larvaire ainsi que de pouvoir établir le diagnostic de l'espèce parasitaire concernée.

Résultats et discussion :

Des lésions hépatiques ont été observées lors de l'autopsie dans les LVD sur 21 ragondins et 104 rats musqués. Après extraction de l'ADN à partir des lésions, le séquençage du fragment du gène *cox1* amplifié par PCR (Bowles et al., 1992) a permis de diagnostiquer 98 cas d'infestation par *T. taeniaeformis*, 11 cas par *T. polyacantha*, 12 cas par *T. mustelae*, un cas par *T. martis* et surtout quatre cas par *E. multilocularis*. Les infestations par *E. multilocularis* concernaient deux rats musqués et deux ragondins dont un présentant une co-infestation par *T. taeniaeformis*, ce qui avait auparavant été reporté uniquement pour *Arvicola terrestris* (Pétavy, Tenora, and Deblock, 2003). D'ailleurs, parmi les quatre cas positifs, des protoscolex ont été retrouvés seulement chez ce ragondin. Si ces deux espèces de rongeurs aquatiques sont considérées comme des hôtes intermédiaires et peuvent donc participer biologiquement au cycle parasitaire, elles semblent y jouer un rôle très minoritaire. En effet au niveau écologique, la prédation par des renards de rats musqués ou de jeunes ragondins s'avère très occasionnelle en raison de leur habitat aquatique et de leur taille. De plus, il est interdit en France de laisser les cadavres des animaux sur le bord de la rivière après piégeage, ce qui limite la consommation par des renards du foie des animaux piégés. Toutefois, en raison de leur régime alimentaire et de leur sensibilité vis-à-vis du parasite, ces deux espèces se révèlent être des bio-indicateurs pertinents pour la présence d'*E. multilocularis*, même dans des zones nouvellement endémiques et de faible prévalence chez le renard.

Encart 2 : Protocole de diagnose parasitaire par biologie moléculaire à partir du stade larvaire

La diagnose portant sur le stade larvaire des échinocoques était peu fréquemment réalisée au laboratoire avant mon arrivée. La réalisation d'études sur la présence du parasite chez les hôtes intermédiaires a nécessité la mise en place d'un protocole de diagnose spécifique à ce stade parasitaire. Il a été défini un processus d'analyse de ce type de lésions parasitaires, permettant non seulement de déterminer le statut d'infestation vis-à-vis des échinocoques mais aussi de pouvoir identifier l'espèce concernée dès lors qu'il s'agissait d'un autre genre parasitaire et plus particulièrement du genre *Taenia* dans le contexte épidémiologique du LNR.

Les organes concernés sont généralement le foie mais aussi les poumons, voire de manière plus sporadique d'autres organes. La première étape consiste à prélever à l'aide d'une seringue le liquide kystique lorsqu'il est présent (kystes non calcifiés ou caséeux) afin de réaliser une observation à la loupe binoculaire (grossissement x200) pour l'observation potentielle de protoscolex. Une incision au scalpel est ensuite réalisée dans le kyste, permettant un prélèvement de membrane ainsi qu'une observation macroscopique de la structure membranaire. A partir de là, un statut macroscopique du kyste peut être réalisé en classant la structure de la lésion parmi quatre catégories : calcifiée, caséuse, stérile (présence de liquide mais absence de protoscolex) et fertile (présence de protoscolex dans le liquide kystique). L'observation d'une structure alvéolaire ou d'une double membrane peut ainsi déjà orienter le diagnostic vers respectivement une échinococcose alvéolaire ou une hydatidose, alors que la présence de protoscolex est caractéristique du genre *Echinococcus* et témoigne de la fertilité du métacestode.

Une extraction d'ADN (manuelle sur colonne ou sur l'automate iPrep) est ensuite réalisée à partir d'un fragment de membrane kystique. En cas de présence de protoscolex et/ou de membrane germinative, ces matrices seront privilégiées afin d'optimiser la quantité d'ADN extraite. L'identification par PCR de l'espèce parasitaire concernée est réalisée en utilisant le couple d'amorces JB3-JB4,5 ciblant une partie du gène *cox1* (Bowles et al., 1992). Le large spectre d'amplification de cette réaction PCR permet l'identification de l'espèce parasitaire présente, après analyse de la séquence de 396 pb obtenue, sans se limiter à un diagnostic de présence/absence des échinocoques.

Dans le cas de la diagnose d'*E. granulosus s.l.*, une seconde cible PCR à large spectre d'amplification est utilisée pour obtenir des données supplémentaires de séquences nucléotidiques (cf. 3.4.2.). Il s'agit généralement d'une réaction ciblant une portion du gène *nad1* voir *nad3* ou encore *atp6*.

La prévalence apparente de l'infestation par *E. multilocularis* dans toute la zone échantillonnée est de 0,7 % (IC_{95%} : [0,08–2,5]) pour les rats musqués et de 0,4 % (IC_{95%} : [0,05–1,35]) pour les ragondins. A l'échelle départementale, la prévalence chez les ragondins atteint 2,9% (IC_{95%} : [0,1–14,9]) dans l'Orne (n=35), 4,0 % (IC_{95%} : [0,1–20,3]) dans la Manche (n = 25) et 6,5 % (IC_{95%}: [0,8–21,4]) chez les rats musqués dans le Calvados (n=31). Les faibles prévalences obtenues sont cohérentes avec les faibles prévalences observées chez les renards dans ces départements. Entre 10 et 30 km séparent les lieux de piégeage des rongeurs aquatiques infestés par *E. multilocularis* et les lieux de tir des renards positifs. Ces distances sont compatibles avec celles connues pour correspondre au territoire d'un renard (Artois, 1989; Henry, 2004) et ces résultats soulignent le fait que l'ensemble de ces trois départements doit être considéré comme contaminé par des œufs d'*E. multilocularis*. La détection d'un cas d'infestation chez un ragondin dans l'Orne démontre la possibilité d'utilisation des rongeurs aquatiques à des fins de surveillance même dans des régions de très faible endémie. Toutefois, l'absence de résultats positifs chez les rongeurs aquatiques dans les neuf autres départements échantillonnés ne peut être considérée comme une preuve inconditionnelle de l'absence du parasite. En effet, l'absence d'identification de cas en Ille-et-Vilaine, pourtant identifiée comme endémique quelques années plus tard par le dépistage d'intestins de renards, laisse supposer une probabilité de détection plus aléatoire chez les rongeurs aquatiques en situation de très faible endémie. Un diagnostic d'infestation par *E. multilocularis* peut facilement être réalisé sur ces animaux par un examen morphologique du foie, potentiellement complété par un diagnostic moléculaire. En tant que nuisibles, ces deux espèces de rongeurs aquatiques sont régulièrement la cible de campagnes de piégeage qui peuvent aisément être mutualisées avec une surveillance du parasite lorsque cela est pertinent d'un point de vue épidémiologique.

5.1.4. Identification de zones d'endémie d'*E. multilocularis* non précédemment détectées par analyses rétrospectives de fèces de renards

Umhang G., Comte S., Hormaz V., Boucher JM., Raton V., Favier S., Raoul F., Giraudoux P., Combes B., Boué F. Retrospective analyses of fox feces by real-time PCR to identify new endemic areas of *Echinococcus multilocularis* in France. *Parasitology Research*, 2016a, 115, 4437-4441.

Introduction :

L'expansion de la zone d'enzootie d'*E. multilocularis* a été constatée en France à l'image de celle observée en Europe (Combes et al., 2012; Combes et al., 2013). Cette expansion s'est faite vers l'ouest jusqu'à l'Ille-et-Vilaine mais aussi vers le sud avec l'identification de renards infestés en Isère et en Savoie. En l'absence de données antérieures dans ces départements nouvellement décrits comme enzootiques il n'est pas possible de savoir si la colonisation de ces zones par le parasite est récente ou plus ancienne. Cependant, l'analyse de fèces par un test de détection de copro-antigènes d'*Echinococcus* (*multilocularis* et *granulosus s.l.*) au début des années 2000 (voir 5.1.1) n'avait pas mis en évidence le parasite en Isère et en Savoie, mais des fèces ayant fourni un résultat positif avaient été identifiées dans les Hautes-Alpes (Tolle et al., 2005). Toutefois, le manque de fiabilité de ce test copro-ELISA commercial ne permettait pas de pouvoir en déduire la présence certaine du parasite. Le développement récent de nouveaux outils moléculaires pour l'analyse de fèces a ouvert la possibilité d'obtenir rétrospectivement des données dans des départements qui n'ont pas été concernés par la recherche d'*E. multilocularis* dans les intestins de renards. Dans ce contexte, une étude a été menée à mon initiative dans le cadre de mes activités au LNR par l'analyse rétrospective de fèces de renards par PCR en temps réel dans quatre départements au statut enzootique inconnu pour *E. multilocularis* mais limitrophes de départements enzootiques.

Matériel et méthodes :

Les départements de l'Allier, de la Seine-Maritime, de la Drome et des Hautes Alpes ont été retenus car ils étaient concernés par l'étude réalisée au début des années 2000 pour analyse de fèces par copro-ELISA mais n'ont pas été inclus dans la zone d'étude par analyses d'intestins de renards (Combes et al., 2012). Deux départements enzootiques, le Doubs et la Côte d'Or, avec des taux de prévalence d'infestation parasitaire chez le renard par SSCT respectivement estimés à 53 % et 21 % (Combes et al., 2012) ont été ajoutés afin de pouvoir vérifier la pertinence de l'utilisation de la qPCR sur les fèces dans des territoires où la prévalence de l'infestation vulpine par le parasite est connue. Les fèces de renards avaient été collectées et géolocalisées par les agents de l'office national de la chasse et de la faune sauvage (ONCFS) et les fédérations de chasseurs des départements concernés entre décembre 2000 et mars 2004. La collecte avait été réalisée uniquement dans les zones avec plus de 35 % de prairies en se basant sur des données de paysage (CORINE land cover). Cela avait pour but d'optimiser la détection d'échantillons avec résultats positifs en se basant sur la relation observée dans l'est de la France entre la proportion de prairies, le risque de pullulation de rongeurs et l'augmentation de la prévalence chez les renards (Giraudoux et al., 2003). L'identification des fèces de renards a été réalisée en tenant compte de leur aspect, de leur taille, de leur odeur et de la présence de résidus alimentaire (notamment d'os de rongeurs). En cas de doute sur leur origine, les fèces étaient éliminées. Seuls ces prélèvements étant disponibles pour les quatre départements au statut endémique inconnu, ils ont donc été analysés en tenant compte du fait qu'il s'agissait d'un échantillonnage de convenance. La taille de l'échantillonnage théorique pour chaque département n'avait pas été choisie pour une détection optimale de faibles taux de prévalence, même si l'orientation de l'échantillonnage dans les zones de prairies devait partiellement tenter de compenser cela. Pendant plus de 10 ans entre la collecte et l'analyse moléculaire, les fèces ont été conservées congelées à -20°C au laboratoire. L'analyse par PCR temps réel (ou qPCR) a été réalisée en duplicat à partir de 500 mg de fèces selon Knapp et al. (2014) (encart 2). Le contrôle interne utilisé était un ADN plasmidique obtenu par construction artificielle et amplifié avec les mêmes amorces que pour *E. multilocularis*. Tous les résultats positifs ont été confirmés par le séquençage partiel du gène *cox1* par pyroséquençage (Umhang et al., 2015).

Encart 3 : Mise au point d'un test PCR temps réel pour la copro-détection d'*E. multilocularis*

Knapp J., Millon L., Mouzon L., **Umhang, G.**, Francis Raoul, R., Said Alia Z., Combes B., Comte S., Gbaguidi-Haore, H., Grenouillet F., & Giraudoux P. Real time PCR to detect the environmental faecal contamination by *Echinococcus multilocularis* from red fox stools. *Veterinary Parasitology*, 2014, 201, (1-2) 40-47.

Les fèces de renards constituent la matrice responsable de la contamination environnementale par *E. multilocularis*. La détection d'*E. multilocularis* dans les fèces est classiquement réalisée par observation d'œufs de *Taeniidae* après concentration par flottaison (Mathis et al., 1996), suivie d'une diagnose d'espèce par PCR (Trachsel et al., 2007). Par cette approche méthodologique, les taux fécaux d'infestation par *E. multilocularis* obtenues à partir de fèces de renards sont généralement très inférieurs à ceux obtenus par analyse d'intestins de renards sur une même zone et à une même période. Cette différence peut trouver différentes explications. D'un point de vue épidémiologique, on peut évoquer l'absence d'œufs pendant les 28 premiers jours de la période prépatente et l'émission discontinue d'œufs en fin d'infestation (Al-Sabi et al., 2007). Des raisons techniques contribuent également à cette différence, notamment le manque de sensibilité des étapes de filtration mais aussi des phénomènes potentiels d'inhibition des tests PCR.

Afin d'augmenter la sensibilité du diagnostic coprologique de l'infestation par *E. multilocularis*, le CNR EA de Besançon a développé en collaboration avec le LNR un test qPCR pour la détection et la quantification d'*E. multilocularis*, couplé à un contrôle interne afin d'évaluer la présence potentielle d'inhibiteurs (Knapp et al., 2014). Une cible moléculaire couplée à une sonde d'hydrolyse a été choisie sur un gène mitochondrial de la large sous-unité ribosomique (*rrnL*) qui présente un fort polymorphisme chez les échinocoques (Nakao et al., 2007). L'ADN est extrait à partir de 500 mg de fèces de renards à l'aide d'un kit dédié. Une souche d'un champignon pathogène de plante, *Geotrichum candidum*, est utilisée comme contrôle interne en ajoutant 200 spores au début de l'extraction d'ADN. Les échantillons considérés comme contenant des inhibiteurs sont testés après dilution ($1/10^{\text{ème}}$, $1/100^{\text{ème}}$, $1/1000^{\text{ème}}$). La limite de détection de cette cible qPCR a été estimée à 5×10^{-5} ng/ μ l, obtenue avec 38 cycles de quantification (Cq). Au-delà de 38 cycles, l'ADN est considéré comme détectable mais pas quantifiable. En considérant une efficacité d'extraction de 100 %, la détection d'un seul œuf (8 μ g d'ADN) est donc théoriquement possible. La confirmation expérimentale a été apportée par la détection d'un œuf (Cq : 37,6), de dix œufs (Cq : 34,0) et d'un segment ovigère (Cq : 28,0), lorsqu'ils ont été ajoutés à 500 mg de fèces. La spécificité a été testée à partir d'ADN d'*E. granulosus s.l.* et de *Taenia sp.* présents chez les canidés. Aucune des espèces de *Taenia* n'a pu être amplifiée alors que *E. equinus* et *E. ortleppi* ont pu l'être très tardivement. Ces deux espèces sont toutefois très rares en Europe et ne sont présentes que chez le chien et pas chez le renard. Cette technique de qPCR a été évaluée avec du matériel biologique fourni par le LNR et constitué de 57 fèces de renards prélevées dans le rectum lors de l'analyse de l'intestin par SSCT (Umhang et al., 2011). Deux fèces provenant des 28 intestins ayant fourni un résultat négatif ont été détectés comme positifs en qPCR, alors que seuls trois fèces provenant des 29 intestins ayant fourni un résultat positif n'ont pu permettre une amplification. Toutefois, cela ne concernait que des fèces provenant d'intestins avec des faibles charges observées au LNR (5 vers non gravides, 15 et 20 vers gravides), et de manière non systématique, car des détections pour des charges de 1 à 14 vers ont pu être observées. Une corrélation significative a pu être mise en évidence entre la charge parasitaire intestinale et la concentration d'ADN quantifiée dans les fèces, démontrant la pertinence de cette technique pour la détection d'*E. multilocularis* dans les fèces de renards. Des collectes de fèces de renards ont été réalisées en vue de comparer les prévalences fécales d'*E. multilocularis* par qPCR avec les prévalences obtenues dans les mêmes zones par SSCT. Les résultats négatifs obtenus pour 14 fèces de renards polaires collectées au Danemark ont confirmé son statut indemne supposé. La collecte de 50 fèces dans deux cantons de Saône-et-Loire considérés comme étant en zone de faible endémie (prévalence SSCT : 1,4 %, $IC_{95\%}$: [0-3,2 %]) a abouti à une estimation de la prévalence par copro-qPCR à 10,41 % ($IC_{95\%}$: [3,9-23,4 %]). En parallèle, la prévalence obtenue à partir de 50 fèces provenant d'une zone de forte enzootie dans un canton du Jura (prévalence SSCT : 71,2 %, $IC_{95\%}$: [59-83%]) a été de 42 %, ($IC_{95\%}$: [27-57 %]). Les différences entre les prévalences obtenues par SSCT et par copro-qPCR peuvent s'expliquer par des possibles variations au cours du temps (collecte de fèces 2-3 ans après l'échantillonnage de renards) et/ou par la possibilité d'analyse de plusieurs fèces provenant d'un même renard (quatre des cinq échantillons ayant fourni un résultat positif en Saône-et-Loire étant agrégés, avec moins d'un kilomètre de distance entre eux). Toutefois, l'estimation de la prévalence par copro-qPCR permet de confirmer sans équivoque les deux cantons de Saône-et-Loire comme correspondant à une zone de faible enzootie et le canton du Jura comme une zone de forte enzootie.

Cette approche, basée sur l'estimation de la contamination environnementale, s'avère plus adaptée pour évaluer l'exposition des hôtes intermédiaires et de l'homme que celle basée sur l'évaluation de la prévalence d'infestation des populations vulpines, réalisée généralement à une plus large échelle spatiale et temporelle.

Résultats et discussion :

Pour les deux départements témoins, 100 fèces ont été sélectionnées de manière aléatoire dans les zones de prairies retenues pour les analyses alors que pour les quatre autres départements toutes les fèces disponibles ont été retenues. Quatre fèces du département de la Côte d'Or ont été considérées comme inhibées en l'absence d'amplification du contrôle interne malgré des dilutions au 1/10^{ème} et au 1/100^{ème} de l'ADN extrait. La fréquence d'infestation des échantillons par le parasite dans les zones échantillonnées des deux départements témoins a été estimée à 4,2 % en Côte d'Or et à 12,0 % dans le Doubs (Tableau 4). Trois des quatre fèces ayant fourni un résultat positif en Côte d'Or étaient regroupées dans la partie sud-ouest où aucun renard infesté n'avait été précédemment identifié alors que la quatrième provenait d'une zone où un renard infesté avait été diagnostiqué (Figure 19a). Les fèces du Doubs à résultats positifs étaient réparties à travers tout le département, correspondant approximativement aux zones de plus fortes prévalences vulpines pour *E. multilocularis* (Figure 19b). Les taux d'infestation dans les échantillons estimés par copro-qPCR plus faibles en comparaison de ceux obtenus par analyse des intestins par SSCT peuvent s'expliquer par la nature de la matrice biologique utilisée pour chacune des deux méthodes et par des périodes d'échantillonnage différentes.

Aucun échantillon n'a fourni de résultat positif dans les départements de l'Allier et de la Drôme (Figure 19b et d). Ces deux départements sont limitrophes de départements à statut inconnu ou à très faible niveau d'enzootie, avec des prévalences d'infestation intestinale chez le renard inférieures à 2 % (Combes et al. 2012). Des taux d'infestation bien plus faibles ont été obtenus par copro-qPCR en comparaison avec les prévalences obtenues dans ces mêmes départements par SSCT malgré le fait d'avoir ciblé les zones de prairies où il était considéré que le parasite était plus présent. Cela souligne que s'il a été possible de détecter le parasite dans deux départements, l'échantillonnage de convenance utilisé ne permet pas d'affirmer avec certitude que le parasite est absent dans les départements où aucun échantillon positif pour *E. multilocularis* n'a été identifié par copro-qPCR. De futures études doivent y être menées en tenant compte lors de l'échantillonnage des faibles prévalences potentiellement attendues afin de préciser avec un meilleur degré de certitude la situation épidémiologique de ces zones pour *E. multilocularis*.

Tableau 4 : Taux d'infestation par *E. multilocularis* dans les fèces de renards analysés par PCR temps réel pour les échantillons des deux départements témoins et ceux des quatre départements, sans données antérieures relatives à la présence du parasite.

	Endemic control areas		No previously investigated areas			
	Côte d'Or (21)	Doubs (25)	Hautes-Alpes (05)	Drôme (26)	Allier (03)	Seine- Maritime (76)
No. analyzed	100	100	120	72	112	85
Inhibited	4	0	0	0	0	0
No. <i>E. multilocularis</i> positive	4	12	3	0	0	3
<i>E. multilocularis</i> prevalence (IC 95 %)	4.2 % [1.1– 10.3 %]	12 % [6.4– 20.0 %]	2.5 % [0.5–7.1 %]	0 % [0.0– 5.0 %]	0 % [0.0– 3.2]	3.5 % [0.7– 10.0]

L'ADN d'*E. multilocularis* a été identifié dans trois fèces des Hautes-Alpes (2,5 %) et de la Seine-Maritime (3,5 %) (Tableau 4, Figure 19c et d). La mise en évidence du parasite pour la première fois en Seine-Maritime était attendue en raison de sa présence dans les départements limitrophes de la Somme, de l'Oise et du Calvados, où la prévalence de l'infestation chez le renard est d'environ 10 % (Combes et al., 2012). Par contre,

l'identification de fèces à résultats positifs pour *E. multilocularis* dans les Hautes-Alpes repousse plus au sud la limite de la zone d'enzootie connue en France, précédemment située dans le foyer historique du Cantal (Petavy and Deblock, 1983; Rey et al., 1977) et au sud de l'Isère (Combes et al., 2012). Si le taux d'infestation obtenu par copro-qPCR dans les échantillons des Hautes-Alpes est faible, cela est concordant avec le faible niveau d'enzootie des départements avoisinants.

La limite sud de la zone d'enzootie d'*E. multilocularis* en Europe est considérée comme stable, au moins en Suisse et en Italie (Conraths and Deplazes, 2015). Guerra et al. (2014) ont proposé que l'absence de *M. arvalis* au-delà de cette limite constitue un facteur limitant pour la dispersion du parasite dans les Alpes. L'échantillon à résultat positif collecté au nord-ouest des Hautes-Alpes est situé dans une zone où une expansion géographique d'*Arvicola terrestris* a été observée durant les 25 dernières années (Halliez et al., 2015). Cette espèce de rongeur est connue pour jouer également un rôle clé dans la transmission d'*E. multilocularis* dans les zones de forte enzootie de l'Est de la France (Houin, Deniau, and Liance, 1980; Viel et al., 1999). *M. arvalis* est présent dans la partie nord-est du département où a été collecté le second échantillon à résultat positif. Néanmoins, ces espèces de rongeurs prairiaux ne sont pas présentes dans le sud du département où le troisième échantillon à résultat positif a été identifié. Dans cette partie du département, seul *Microtus duodecimcostatus* est considéré comme une espèce de rongeurs de prairies sensible à *E. multilocularis*. Cependant, comme dans la partie nord du département, des rongeurs forestiers tels que *Myodes glareolus*, *Microtus multiplex* et *Apodemus sp.* sont également des hôtes intermédiaires potentiels d'*E. multilocularis* (Quere and Le Louarn, 2011), en plus des marmottes (Callait, 2003). Toutefois, en raison du climat méditerranéen chaud et sec, la survie des œufs d'*E. multilocularis* pourrait constituer un facteur plus limitant pour le maintien du cycle parasitaire.

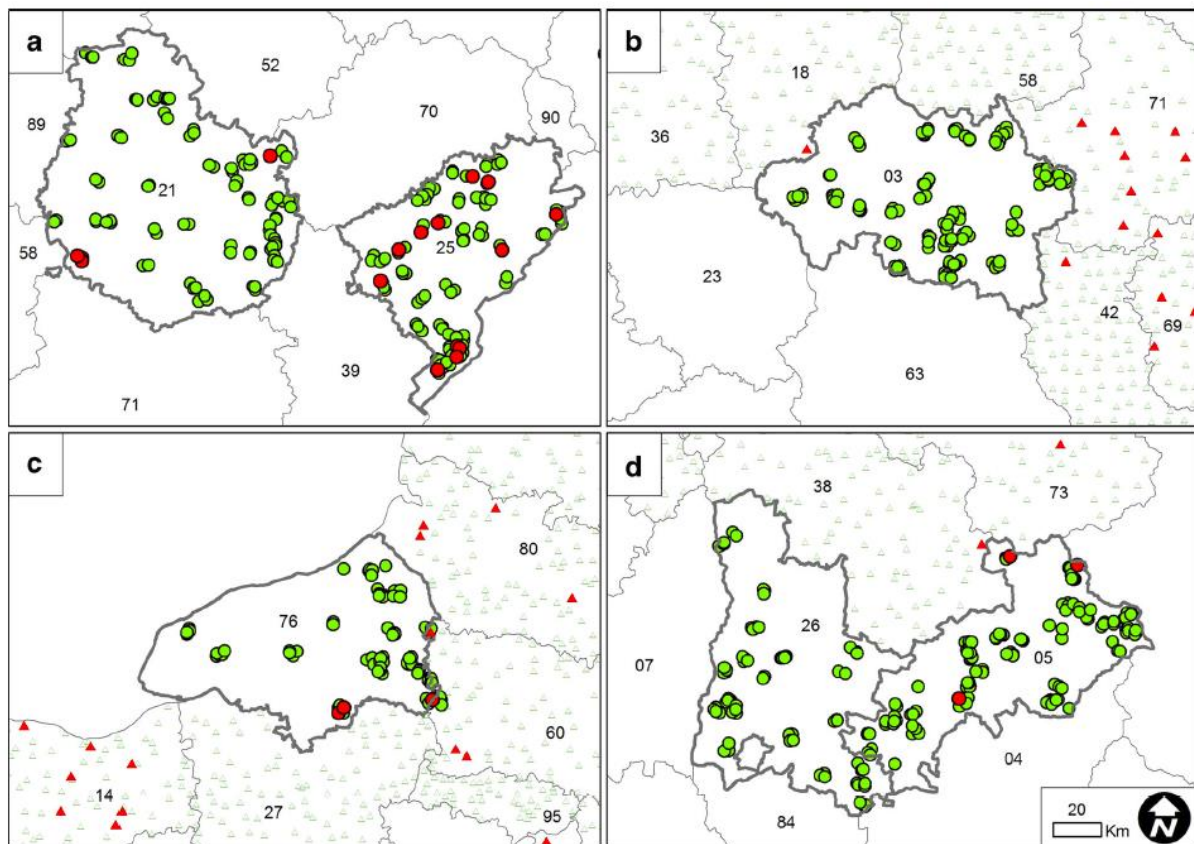


Figure 19 : Localisation des fèces de renards collectées dans les six départements échantillonnés (cercle vert si négatif en qPCR pour *E. multilocularis*, cercle rouge si positif) dans le contexte des départements limitrophes enzootiques (triangle rouge pour renard ayant fourni un résultat positif, triangle vert pour renard ayant fourni un résultat négatif) d'après Combes et al. (2012). **a** Les deux départements témoins de la Côte d'Or (21) et du Doubs (25). **b** Département de l'Allier (03). **c** Département de la Seine-Maritime (76). **d** Départements de la Drôme (26) et des Hautes-Alpes (05).

Cette étude rétrospective complète les données de surveillance d'*E. multilocularis* précédemment obtenues en France (Combes et al., 2012; Combes et al., 2013; Umhang et al., 2013b) et confirme non seulement une expansion vers l'ouest mais aussi vers le sud de la zone d'enzootie connue. Deux nouveaux départements enzootiques ont été mis en évidence, apportant également la preuve que le parasite y était présent dès le début des années 2000. Cette période est cohérente avec celle supposée de la colonisation du nord et de l'ouest de la France il y a plusieurs décennies déduites d'une analyse par microsatellite EmsB (Umhang et al., 2014d) (cf. 5.2.1). Face à l'observation de l'expansion d'*E. multilocularis* en France et au risque zoonotique associé, il apparaît indispensable de poursuivre la surveillance afin de pouvoir connaître la zone d'enzootie réelle du parasite en France. Actuellement, le statut pour *E. multilocularis* est inconnu pour environ 40 des 96 départements français. Ces derniers sont à défaut généralement considérés comme indemnes bien que certains soient limitrophes de départements endémiques. L'absence de données disponibles dans ces zones a pour conséquence une absence d'informations et de mesures préventives contre l'échinococcose alvéolaire à destination de la population mais aussi du secteur vétérinaire et médical.

L'expansion du parasite constatée dans les autres pays européens (Duscher et al., 2006; Karamon et al., 2014; Romig et al., 1999) démontre le besoin de mise en place d'un programme de surveillance à large échelle avec un protocole standardisé. Dans cette optique, cette étude démontre que l'utilisation de fèces de renards pour analyse par copro-qPCR a prouvé son efficacité pour identifier de nouvelles zones d'enzootie même avec des prévalences supposées faibles. L'utilisation d'une méthode non-invasive témoignant de la contamination environnementale à laquelle est exposé l'homme peut constituer un argument solide pour convaincre les décideurs. Cette approche peut sembler plus acceptable pour la population que d'abattre des renards.

5.2. Apport de l'épidémiologie moléculaire pour *E. multilocularis*

Le développement des outils moléculaires a permis des applications directes au diagnostic de l'infestation par *E. multilocularis*, en facilitant l'identification des trois stades parasitaires (œuf, métacestode, ver). L'augmentation des données moléculaires obtenues par différentes méthodes a démontré de très faibles variations génétiques au sein d'*E. multilocularis* (Bowles et al., 1992; Bowles, Blair, and McManus, 1995; Haag et al., 1997; McManus, 2006). Cela contraste notamment avec la très grande hétérogénéité constatée au niveau du panel d'hôtes intermédiaires et définitifs connus. L'exploration de la diversité génétique nécessitait donc le développement d'un outil moléculaire plus discriminant afin de pouvoir dépasser le stade de la simple diagnose d'espèce et de bénéficier des apports de l'épidémiologie moléculaire. Dans cette optique, la recherche de séquences microsatellites menée par l'UFC et le CHU de Besançon a permis de caractériser le microsatellite multilocus EmsB en 2006 (Encart 3). Les premières années, seule l'équipe de Besançon réalisait les analyses basées sur ce microsatellite. Par la suite, quelques équipes européennes (Italie et Allemagne) ont réalisé ponctuellement des analyses à l'aide de ce marqueur. A partir de 2010, la réalisation des analyses a été transférée de Besançon au LNR en raison de l'impossibilité pour Besançon de disposer d'un séquenceur pour réaliser de l'analyse de fragments et de la volonté du LNR de disposer de cette méthode. La disponibilité de cet outil au LNR a facilité la mise en place d'analyses à finalité épidémiologique. La collaboration étroite avec Besançon et le statut de quasi-monopole pour ce type d'analyse a conduit le LNR à l'analyses d'échantillons d'origines géographiques très diverses, ce qui a permis d'une part d'étoffer la collection de profils EmsB et d'autre part de progresser dans la compréhension de l'épidémiologie de l'infestation par le parasite, notamment concernant son expansion récente constatée en Europe.

Encart 3 : Caractérisation et utilisation du microsatellite EmsB

Valot B., Knapp J., **Umhang G.**, Grenouillet F., Millon L. (2015) Genomic characterization of EmsB microsatellite loci in *Echinococcus multilocularis*. *Infection, Genetics and Evolution*, 32, 338-341.

La recherche de séquences microsatellites à partir d'une librairie de fragments d'ADN génomique de protoscolex d'*E. granulosus* s.s. menée par l'UFC a permis d'identifier plusieurs microsatellites dont EmsB, qui a présenté un polymorphisme très important (Bart et al., 2006a). L'utilisation de ce microsatellite a démontré une très bonne reproductibilité, répétabilité, sensibilité et spécificité et ce marqueur a manifesté une très faible variabilité dans le temps (Knapp et al., 2007). La récente publication du génome d'*E. multilocularis* a offert la possibilité au CHU de Besançon en collaboration avec le LNR d'explorer plusieurs années après la structure de ce microsatellite (Valot et al., 2015). 40 copies du microsatellite (39 complètes et une partielle) ont été décrites, toutes localisées sur le chromosome 5 et réparties dans deux répétitions en tandem (Figure 20). Le génotypage de la souche JAVA ayant servi au séquençage du génome complet d'*E. multilocularis* a permis de vérifier que la hauteur des pics était en relation avec le nombre de copies. La caractérisation de la structure génétique du microsatellite EmsB obtenue dans cette étude laisse entrevoir des possibilités d'optimisation méthodologique de l'utilisation de cet outil. Ainsi, en vue d'une démocratisation de son utilisation, il apparaît désormais plus simple d'obtenir une construction synthétique de ce microsatellite permettant de servir de témoin dans d'autres laboratoires et de calibrer les analyses, tant l'amplification par PCR que la migration sur le séquenceur.

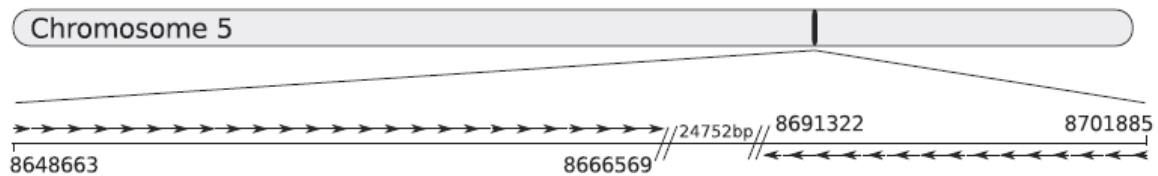


Figure 20 : Structure des microsatellites EmsB chez *E. multilocularis* où chaque flèche indique la présence d'une copie du microsatellite et les traits entre les flèches correspondent à la séquence conservée entre les microsatellites.

Le profil EmsB généré est caractérisé par la taille de chaque pic et par le nombre de copies amplifiées (hauteur des pics). Une normalisation des profils permet de s'affranchir de la quantité d'ADN utilisée en retirant les pics dont la hauteur est <10 % du pic le plus grand et en divisant ensuite la hauteur de chacun des pics restants par la somme de la hauteur de tous les pics retenus. La distance euclidienne entre les profils de chaque échantillon est calculée par la méthode des liens moyens et visualisée sur un dendrogramme. Une valeur seuil de distance génétique (0,08) a été calculée à partir de la variation observée pour une même souche, suite aux passages *in vivo* successifs chez des gerbilles en laboratoire. Les échantillons ayant une distance génétique entre eux inférieure à celle du seuil sont considérés comme appartenant au même profil EmsB (ou génotype).

L'utilisation de panels d'échantillons provenant d'Alaska, Chine, Japon et d'Europe a permis de mettre en évidence une discrimination au niveau continental (Bart et al., 2006a). De plus, la complexité du profil EmsB rendait possible la discrimination des échantillons à l'échelle régionale et même locale contrairement aux autres microsatellites classiques pour *E. multilocularis* (Knapp et al., 2007; Knapp et al., 2008). Le fort pouvoir discriminant du microsatellite (supérieur à la combinaison de dix microsatellites classiques) s'explique surtout par la grande variation de taille des amplicons (209 à 253 pb) obtenus à partir de chaque copie, ce qui confère la structure si particulière des profils. Un polymorphisme corrélé à l'origine géographique a ainsi pu être observé indépendamment du type d'hôte. De plus, la complexité du profil EmsB a rendu possible la discrimination des échantillons à l'échelle continentale, régionale et même locale, contrairement aux autres microsatellites classiques pour *E. multilocularis* (Knapp et al., 2007; Knapp et al., 2008). La dispersion spatiale et temporelle d'*E. multilocularis* en Europe a été étudiée par le biais du microsatellite EmsB par Knapp et al. (2009a). Le foyer historique au nord de l'arc alpin (Suisse, nord de l'Autriche, sud de l'Allemagne, ouest de la République Tchèque) a présenté la plus grande diversité et la plus grande richesse génétique en comparaison aux zones périphériques étudiées (Ardennes, Pologne et Slovaquie). Un système île-continent de transmission du parasite a été décrit avec une dispersion des profils EmsB gouvernée par des événements fondateurs du foyer historique vers les zones périphériques. Par la suite, l'observation de la faible diversité génétique d'*E. multilocularis* en Hongrie a démontré son appartenance aux zones périphériques d'endémie, tout en confirmant son lien avec le foyer historique européen (Casulli et al., 2009). A une échelle plus régionale, l'absence de correspondance entre les génotypes observés au nord de l'Italie avec ceux décrits en Europe soutient l'hypothèse d'un foyer autochtone (Casulli et al., 2009). Cet argument génétique est renforcé par l'enclavement des massifs où les renards ont été échantillonnés. Ce microsatellite certes complexe apparaît actuellement comme le seul outil moléculaire disponible pour l'épidémiologie moléculaire d'*E. multilocularis*.

5.2.1. Proposition d'un scénario spatio-temporel de l'expansion d'*E. multilocularis* en France

Umhang G., Knapp J., Hormaz V., Raoul F. & Boué F. (2014a) Using the genetics of *Echinococcus multilocularis* to trace the history of expansion from an endemic area. *Infection, Genetics and Evolution*, 22, 142-149.

Introduction :

A l'image de l'Europe, une expansion vers l'ouest de la zone d'endémie d'*E. multilocularis* a été constatée en France (Combes et al., 2012; Combes et al., 2013). Dans ce contexte, la réalisation d'une étude d'épidémiologie moléculaire basée sur l'utilisation du microsatellite EmsB apparaissait très pertinente pour la compréhension de ce phénomène d'expansion. Cet outil moléculaire avait permis précédemment de décrire la transmission du parasite en Europe sur la base d'un système île-continent régi par des événements fondateurs dans les zones périphériques en provenance du foyer historique (encart 3 et Knapp et al., 2009b). En France, l'utilité au niveau local du microsatellite EmsB avait été vérifiée dans les Ardennes, mais les autres zones d'enzootie n'avaient jamais été explorées. Une étude a donc été menée pour estimer la diversité génétique dans les zones historiques d'enzootie ainsi que dans les zones nouvellement identifiées comme enzootiques afin de proposer un scénario spatio-temporel de l'expansion d'*E. multilocularis* en France.

Matériels et méthodes :

Les échantillons d'ADNs nécessaires à l'étude ont été obtenus à partir des vers d'*E. multilocularis* qui ont été envoyés au LNR par les LVD pour confirmation de l'infestation des renards dans le cadre de l'enquête de surveillance menée chez cette espèce par l'ELIZ, l'UFC et le LNR (Combes et al., 2012; Combes et al., 2013) évoquée précédemment (cf. 5.1.2). Un maximum de cinq vers par renard a été retenu. Le panel final a été composé de 383 vers provenant de 128 renards, collectés entre 2007 et 2012 et provenant de 15 départements regroupés en cinq zones (Figure 21).

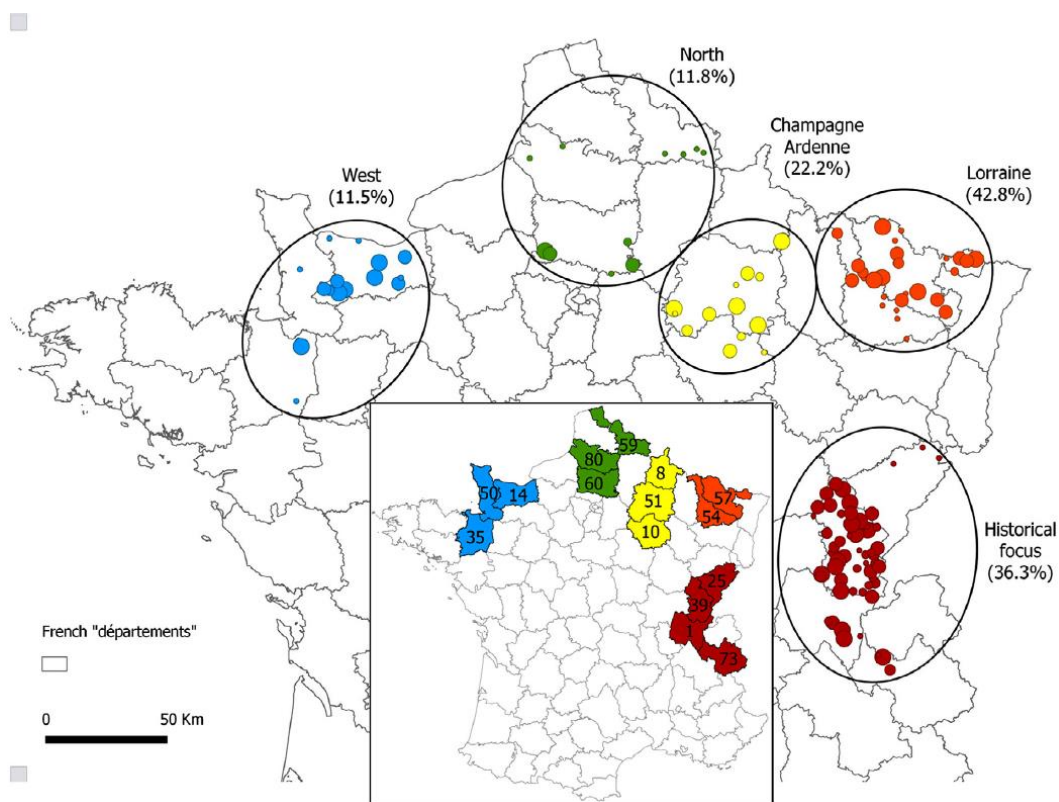


Figure 21 : Distribution à travers les cinq zones des renards dont les vers ont été sélectionnés pour l'étude. La taille des cercles est proportionnelle au nombre de vers analysés (1 à 5). Les départements échantillonnés sont identifiés par leur numéro sur la carte de France encadrée.

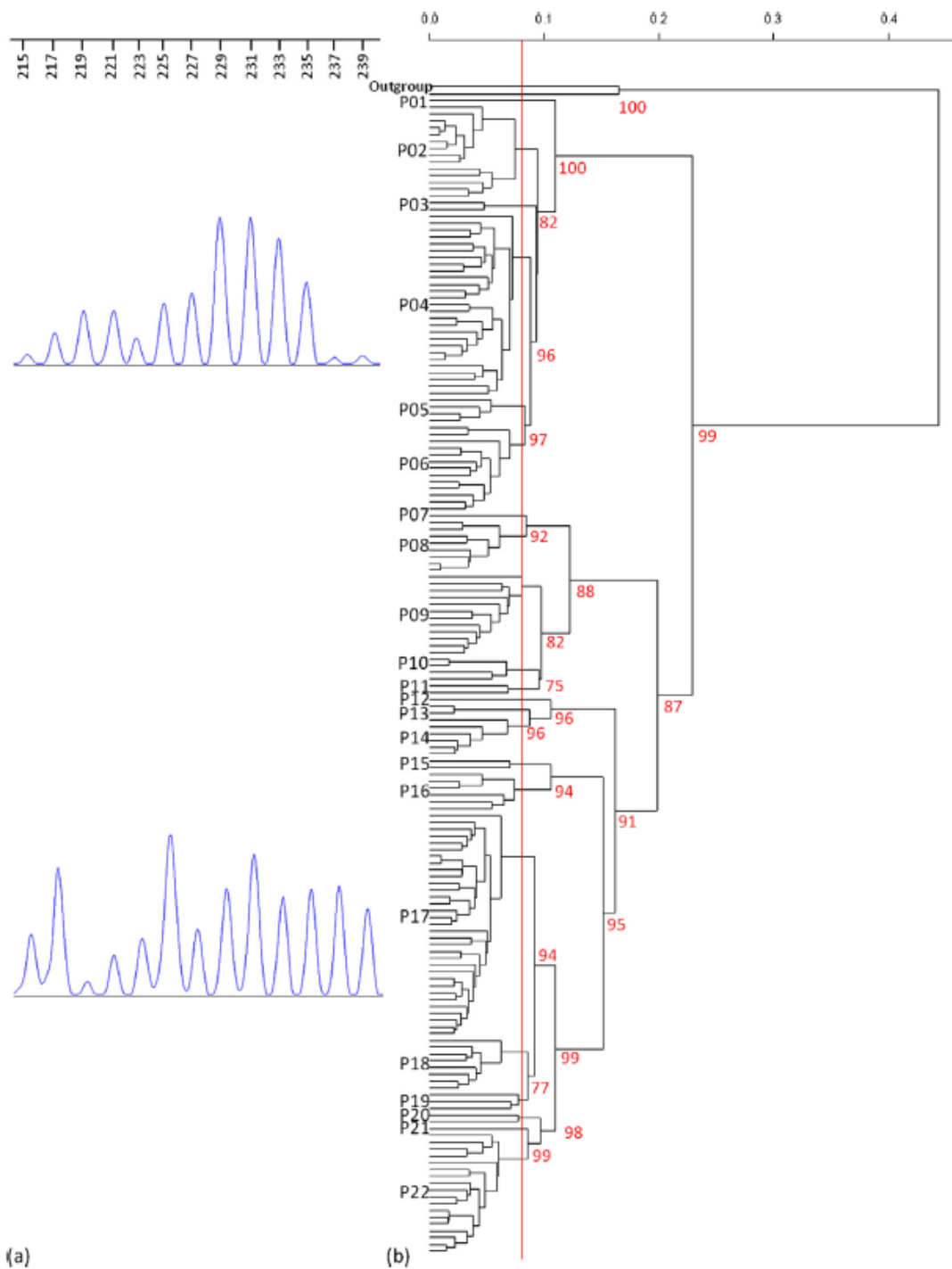


Figure 22 : (a) Electrophorégrammes des loci d'EmsB pour les deux profils majoritaires P04 et P17. (b) Dendrogramme construit à partir des données EmsB, où les vers provenant d'un même renard et avec le même profil EmsB ont été regroupés. Deux échantillons d'*E. granulosus* s.s. ont été utilisés comme outgroup. Les valeurs p sont indiquées en rouge et ont été calculés avec 1000 répétitions.

EmSB profiles	AREAS										No of worms (No of foxes)	No of départements with the profile					
	Historical focus			Lorraine			Champagne-Ardennes			North			West				
	Jura (39)	Savoie (73)	Doubs (25)	Ain (1)	Moselle (57)	Meurthe -et- Moselle (54)	Aube (10)	Ardennes (8)	Marne (51)	Nord (59)	Somme (80)	Oise (60)	Calvados (14)	Ille-et- Vilaine (35)	Manche (50)		
P01																5 (1)	1*
P02	2				34											40 (14)	3
P03					2											2 (2)	1*
P04	20	3	4	1	11	5		1	5				1			51 (29)	9
P05								2	9							15 (4)	3*
P06												1				30 (10)	3*
P07																1 (1)	1*
P08					5	3		5	4			12				20 (8)	3
P09				12	1	1		1				2				18 (12)	6
P10					1											13 (4)	2
P11	1				1	1										2 (2)	2
P12																1 (1)	1*
P13						1										6 (2)	1*
P14	3		3			2			6							8 (6)	3
P15	2															2 (2)	1*
P16	6	6						2								13 (6)	3
P17	36		1	9	13				5		1	2	10			79 (34)	9
P18	22									1						22 (8)	1*
P19	2			4												6 (3)	2*
P20	1												1			2 (2)	2
P21	1															1 (1)	1*
P22	46															46 (18)	1*
No of worms (No of foxes)	142 (44)	9 (3)	8 (4)	26 (8)	67 (20)	12 (7)	7 (3)	8 (2)	30 (9)	4 (4)	2 (2)	17 (6)	43 (12)	7 (3)	1 (1)	383 (128)	
Total of EmSB profiles	13 (15,58)	185 (59)			79 (27)	10 (12,96)	6 (6)	45 (14)	5 (6,91)	23 (12)			6 (7,96)	51 (16)			
Genetic diversity (estimation) (1-D) n = 23	5.13				3.82		4.65		2.77				2.5				

Tableau 5 : Détails de l'échantillonnage pour chacune des régions et départements. Les profils endémiques d'une seule région sont identifiés à l'aide d'un astérisque.

Résultats :

Au total, 22 profils EmsB différents ont été décrits, regroupant de un à 82 vers (Figure 22 et Tableau 5). En parallèle, des courbes d'accumulation de profils ont été réalisées pour chacune des zones, démontrant que l'asymptote était obtenue pour la Champagne-Ardenne et qu'elles y tendaient pour les autres régions. Cela démontre que l'effort d'échantillonnage a été suffisant et est représentatif pour les différentes zones. Les profils P04 et P17 sont les plus représentés, regroupant 33,9 % des vers. Ce sont les deux seuls profils présents dans les cinq zones d'étude, à l'exception du nord, où le profil P04 n'a pas été retrouvé. Deux profils (P08 et P09) sont présents uniquement en Lorraine, Champagne-Ardenne et dans le nord, alors que six profils seulement ont été détectés dans le foyer historique et une autre région : la Lorraine (P10, P11, P14), le nord (P16) et l'ouest (P02, P20). Les douze autres profils ne sont retrouvés que dans une seule région et sont généralement peu représentés. Un profil dominant est présent uniquement dans le nord (P08) et dans l'ouest (P06), représentant respectivement 52,2 % et 59,5 % des vers de la zone concernée. A partir de la richesse en profils de chacune des zones, l'extrapolation du nombre de profils attendus et l'estimation de la diversité génétique (indice de Simpson à partir de la taille minimum échantillonnées de 23 vers) ont été calculées (Tableau 5). Ces données suggèrent une forte richesse de profils dans le foyer historique, une richesse moyenne en Lorraine et une plus faible richesse dans l'ouest, le nord et la Champagne-Ardenne. Cela est légèrement différent concernant la diversité génétique qui est la plus élevée dans le foyer historique et diminue progressivement en Champagne-Ardenne puis Lorraine pour atteindre les valeurs les plus faibles dans le nord et l'ouest. L'analyse des assemblages de profils au sein de chaque région (diversité-β estimé par l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis) a été représentée sous la forme d'un dendrogramme (Figure 23). Le foyer historique et la Lorraine (10 profils communs) sont regroupés, tout comme la Champagne-Ardenne (3 profils communs) et le nord. Par contre, la région ouest est plus proche génétiquement du groupe formé par le foyer historique et la Lorraine que de celui groupant les deux autres régions.

Tableau 6 : Nombre de profils observés et extrapolés ainsi que la diversité génétique (indice de Simpson calculée sur la base de 23 vers, correspondant à la plus faible taille d'échantillon) pour chacune des régions.

Region	No. of worms	No. of observed profiles	Total no. of profiles estimated (Jackknife 1st order and std. error)	Simpson diversity
West	51	6	7.96 (1.39)	2.50
North	23	5	6.91 (1.35)	2.77
Champagne-Ardenne	45	6	6.00 (NA)	4.65
Lorraine	79	10	12.96 (1.71)	3.82
Historical focus	185	13	15.98 (1.72)	5.13

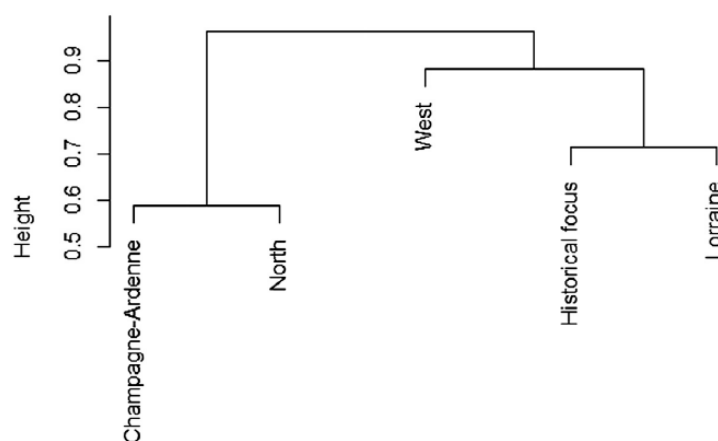


Figure 23 : Dendrogramme basé sur la distance génétique entre les assemblages de profils des différentes régions.

Discussion :

Le statut du foyer historique d'endémie en France a été confirmé par l'observation de la plus forte diversité génétique et de la plus grande richesse de profils. Les valeurs de ces deux paramètres génétiques diminuent dès lors qu'on s'éloigne de cette région. La présence de profils dominants dans le nord et l'ouest témoigne de la colonisation plus récente de ces deux régions. Néanmoins, bien que ces deux régions soient géographiquement proches, elles n'apparaissent pas liées génétiquement, ce qui milite en faveur de l'hypothèse d'une colonisation de ces régions par deux processus différents et qui pourraient être contemporains vu leur diversité génétique similaire.

Sur la base de toutes ces données fournies par la génétique, il est possible de proposer un scénario spatio-temporel de l'expansion d'*E. multilocularis* en France. A partir du foyer historique, l'expansion du parasite aurait débuté par la Lorraine pour atteindre la Champagne-Ardenne et finalement le nord. Une deuxième expansion à partir du foyer historique réalisée en parallèle serait à l'origine de la présence du parasite dans l'ouest (Figure 23). Néanmoins, la possibilité de la colonisation de la Lorraine, de la Champagne-Ardenne et du nord par des renards infestés provenant des pays frontaliers notamment du sud de la Belgique et du nord de l'Allemagne n'est pas à exclure. Si ces deux régions sont considérées comme enzootiques depuis les années 1990, les niveaux de prévalence chez le renard y sont faibles (Romig et al., 1999) et aucune donnée de profil EmsB n'est disponible. L'échelle de temps associée à la dispersion du parasite d'une zone à une autre peut être évaluée grâce au développement récent de modèles mathématiques. Des valeurs similaires de vitesse de dispersion du parasite, autour de 3 km/an, ont été obtenues par des études menées en Allemagne et aux Pays-Bas (Denzin et al., 2014; Takumi et al., 2008). L'identification dans l'ouest ou le nord du même profil EmsB que dans le foyer historique, distants de plusieurs centaines de kilomètres, démontrent que la colonisation du parasite est due à la migration de proche en proche de renards infestés il y a déjà plusieurs décennies. La détection très récente du parasite dans le nord et l'ouest s'expliquerait alors par une recherche plus active du parasite, qui était effectivement inexistantes auparavant, plutôt que par une migration récente.

Si la diversité génétique présente dans les régions étudiées diffère, la présence de profils communs démontre les interconnexions entre ces régions. La présence de ce gradient de diversité génétique et de profils communs entre les zones sont similaires à ceux décrits au niveau continental, avec une transmission basée sur un système île-continent. La France fait partie intégrante de ce système avec son foyer historique qui est rattaché au foyer historique européen, les autres régions faisant figure de zones périphériques. Cinq des profils (P01, P03, P04, P08, P09) identifiés dans cette étude ont ainsi été identifiés précédemment en Europe (Knapp et al., 2009a).

Les études de surveillance menée dans différents pays notamment en Europe sont désormais souvent associées à l'exploration de la diversité génétique et participent ainsi à la multiplication des données de profils EmsB. La mise en place d'une centralisation de ces données dans une base de données accessible publiquement apparaît nécessaire pour obtenir une vision la plus exacte possible de la transmission d'*E. multilocularis*. En France, l'intégration totale d'une analyse d'épidémiologie moléculaire par le microsatellite EmsB apparaît indispensable dans la perspective de nouvelles études de surveillance dans les départements échantillonnés précédemment et dans les départements périphériques, afin de mieux comprendre la dynamique d'expansion d'*E. multilocularis* à travers toutes les zones d'endémies actuellement identifiées.

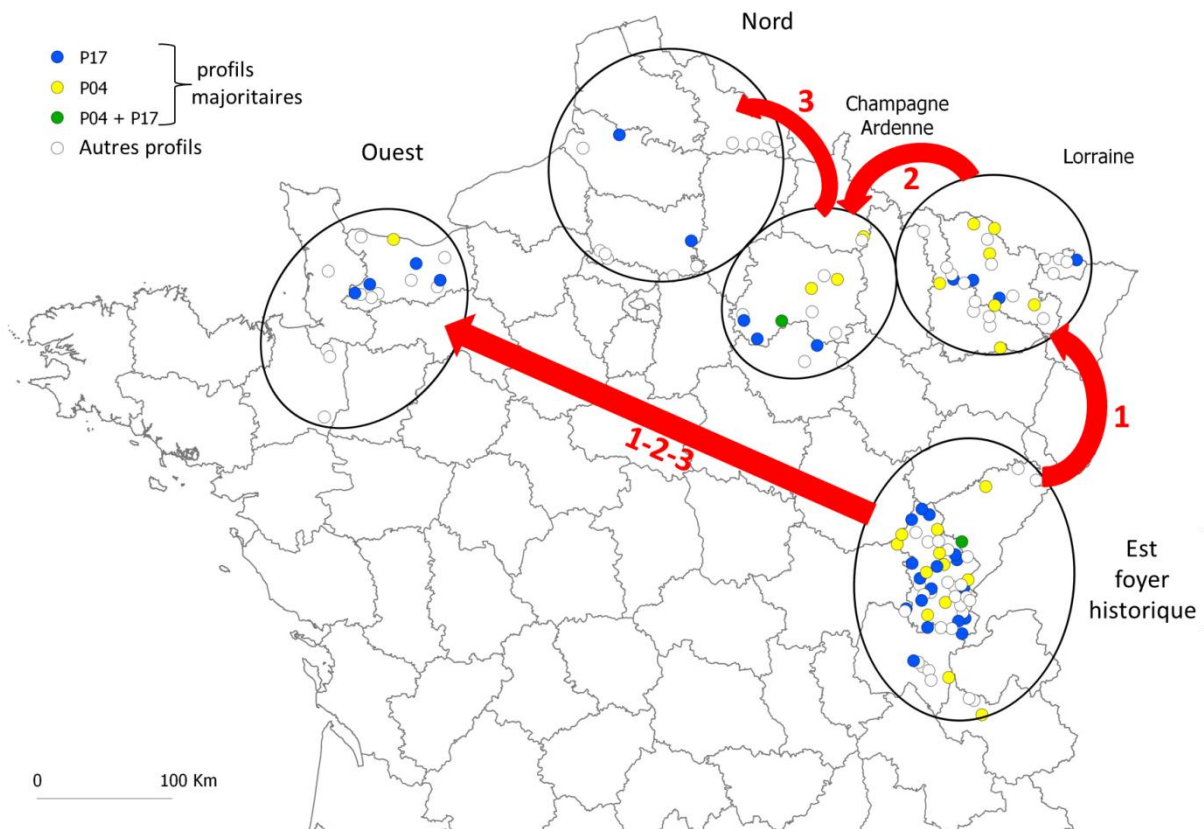


Figure 24 : Distribution des deux profils majoritaires P04 et P17. En rouge est indiqué la succession des étapes d'expansion d'*E. multilocularis* à travers les différentes régions.

5.2.2. Analyse de la diversité génétique d'*E. multilocularis* en Suède et au Danemark

Knapp J., **Umhang G.**, Enemark L.H., Juremalm M., Ågren E., Al-Sabi M. N.S, Wahlström Helene. Genetic diversity of *Echinococcus multilocularis* in red foxes from two Scandinavian countries: Denmark and Sweden. In preparation.

Introduction :

Au cours des dernières décennies, une expansion d'*E. multilocularis* de l'Europe centrale vers les pays voisins a été décrite (Romig, 2009). Le parasite a notamment été identifié dans des pays scandinaves, le Danemark puis la Suède. Au Danemark, la première mise en évidence du parasite a été réalisée en 2000 (Saeed et al., 2006), mais une surveillance n'a été mise en place qu'à partir de 2011 (Enemark et al., 2013). Des renards infestés ont été identifiés jusqu'à présent dans trois zones : la périphérie de Copenhague (2000), Hojer, (2011) et Grinsted (2014) (Wahlström et al., 2015). La surveillance d'*E. multilocularis* a été initiée en Suède dès 2000 à la suite de la première détection au Danemark, puis a été intensifiée lorsque le premier cas d'infestation vulpine fut découvert en 2011 (Wahlstrom et al., 2011; Wahlstrom et al., 2012). Actuellement le parasite a été identifié dans quatre régions en Suède : Västra Götaland, Södermanland, Dalarna and Kronoberg (Miller et al., 2016; Wahlstrom et al., 2011). La prévalence de l'infestation dans la population vulpine à l'échelle nationale en Suède et au Danemark demeure faible, avec respectivement environ 0,1 % et 1 % (Wahlstrom et al., 2012; Wahlström et al., 2015). Toutefois, dans certaines régions la prévalence peut atteindre 1 % en Suède et jusqu'à 30 % au Danemark. Il est actuellement impossible de savoir si la présence du parasite dans ces deux pays est ancienne ou si celui-ci n'a été que nouvellement introduit et si donc une évolution de sa présence pourrait impacter l'exposition humaine. Le génotypage par microsatellite EmsB a ainsi été choisi afin de tenter de mieux explorer la dynamique de la présence du parasite dans ces deux pays en se basant sur les précédentes études réalisées

en Europe (Casulli et al., 2009; Casulli et al., 2010; Knapp et al., 2008; Knapp et al., 2009b; Knapp et al., 2012; Umhang et al., 2014d).

Matériel et méthodes :

Des vers d'*E. multilocularis* isolés lors d'analyses par SCT (Eckert et al. 2001) à partir d'intestins de 9 renards collectés entre 2012 et 2014 dans le cadre de la surveillance au Danemark ont été utilisés. Pour la Suède, les vers des 7 renards trouvés infestés par *E. multilocularis* de 2011 à 2013 ont été inclus dans cette étude. Pour chacun des renards un minimum de cinq vers a été sélectionné pour le génotypage par EmsB réalisé classiquement par le LNR (Knapp et al., 2007; Umhang et al., 2014d). Une collection européenne de référence a été utilisée pour réaliser les comparaisons avec les profils obtenus des vers provenant de Suède et du Danemark. Cette collection était constituée de 1058 vers isolés à partir de 269 renards isolés en France (nombre de vers = 566; nombre de renards= 162), Suisse (84; 19), Allemagne (87; 18), Autriche (98; 22), Slovaquie (63; 14), Pologne (94; 20) et République Tchèque (66; 14) (Knapp et al., 2007; Knapp et al., 2008; Knapp et al., 2009a; Umhang et al., 2014d). Les analyses de raréfaction et de richesse ainsi que d'estimation de la diversité génétique ont été réalisées comme précédemment par Knapp et al. (2009a).

Tableau 7 : Description des échantillons d'*E. multilocularis* analysés provenant du Danemark et de Suède ainsi que des profils EmsB obtenus. H: Højer; G: Grinsted; VG: Västra Götaland, D: Dalarna, S: Södermanland.

Pays	Province	Année d'échantillonnage	Code du renard	Profils EmsB (nombre de vers)
Danemark	H	2012	DK1H	P4(1)
Danemark	H	2012	DK2H	P4(4)
Danemark	H	2012	DK3H	P4(2)
Danemark	H	2013	DK4H	P4(3)
Danemark	H	2013	DK5H	P4(5)
Danemark	H	2013	DK6H	P4(5)
Danemark	H	2014	DK7H	P4(6)
Danemark	G	2013	DK8G	P1(6)
Danemark	G	2014	DK9G	P5(6)
Suède	VG	2010	SE1VG	P6(5)
Suède	VG	2011	SE2VG	P6(1)
Suède	VG	2012	SE3VG	P6(7)
Suède	VG	2012	SE4VG	P6(2)
Suède	D	2011	SE5D	P2(1) ; P3(2)
Suède	S	2011	SE6S	P1(5) ; P2(2)
Suède	S	2013	SE7S	P1(2)

Résultats :

Un total de 65 vers provenant de 16 renards ont pu être génotypés : 38 vers provenant de neuf renard danois et 27 vers provenant de sept renards suédois (Tableau 7). Pour le Danemark, seul un ver fut écarté car fournissant un profil EmsB considéré comme aberrant, alors que sept vers provenant de deux renards le furent pour la Suède. A partir du dendrogramme (Figure 25), six profils EmsB différents ont pu être décrits dont un seul (P1) commun aux deux pays (13 vers provenant de deux renards de Suède et d'un du Danemark). Au Danemark, trois profils EmsB différents ont été identifiés. Tous les 26 vers échantillonnés sur les 7 renards de la région de Hojer présentant le même profil (P4). Deux profils différents (P1 et P5) ont été retrouvés pour la région de Grinsted. En Suède, quatre profils EmsB différents ont été décrits. Tous les vers des quatre renards

échantillonnés dans la région de Vastra Gotaland présentait le même profil (P6). Les profils P1 et P2 furent identifiés pour respectivement sept et deux vers provenant de deux renards prélevés dans la région de Sodermanland. Les profils EmsB P2 et P3 ont été obtenus pour respectivement un et deux vers du même renard originaire de la région de Dalarna.

Tous les six profils EmsB identifiés dans cette étude correspondaient à des profils précédemment décrits en Europe (Tableau 8). Les profils européens G05, G07 et G23 (Knapp et al., 2009a) correspondant respectivement aux profils P2, P3 et P4 décrits dans cette étude sont trois des plus importants profils en Europe, représentant 42,9 % du panel de la collection. La courbe de raréfaction obtenue pour la Suède et le Danemark atteint un plateau signifiant qu'un nombre suffisant de vers a été analysés pour décrire correctement la diversité génétique exprimée par le nombre de profils EmsB. Ces résultats sont cohérents avec les analyses d'estimation de richesse qui indiquent exactement le nombre de profils observés dans chacun des deux pays.

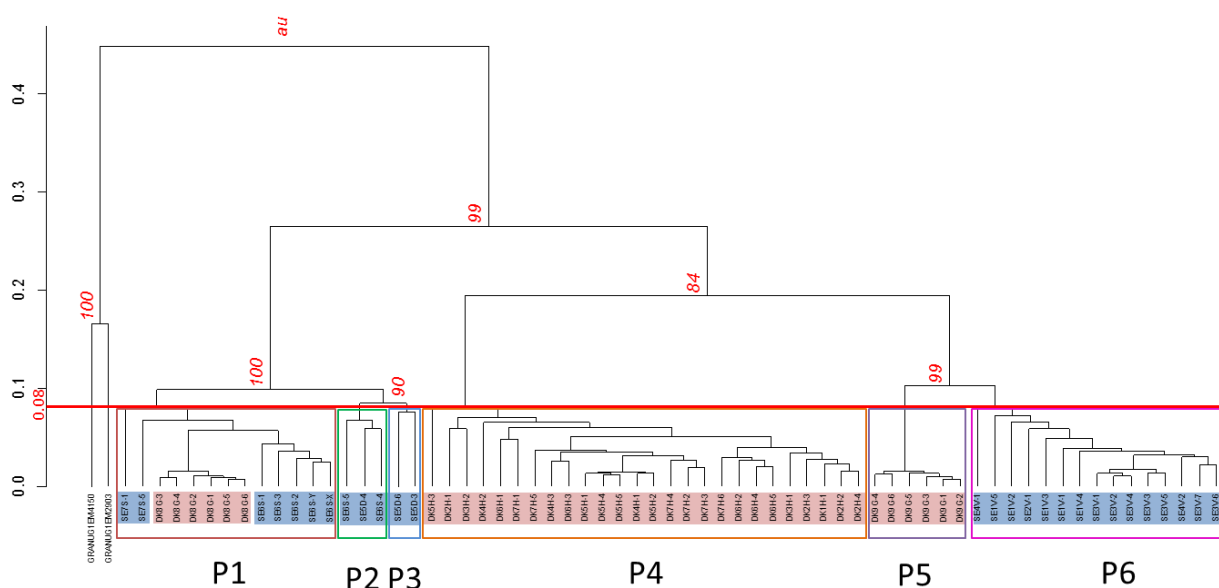


Figure 25 : Dendrogramme construit à partir des données EmsB des vers provenant de Suède et du Danemark. Deux échantillons d'*E. granulosus* s.s. ont été utilisés comme outgroup. Les valeurs p sont indiquées en rouge et ont été calculés avec 1000 répétitions.

Tableau 8 : Comparaison des profils EmsB identifiés chez les vers provenant de Suède et du Danemark avec ceux précédemment identifiés en Europe. A : Allemagne, F : France, PL : Pologne, RT : République Tchèque, SL : Slovénie, SW : Suisse.

Profil EmsB	Vers issus des renards de Suède (nombre de renards)	Vers issus des renards du Danemark (nombre de renards)	Correspondance avec la collection de référence européenne (nombre de renards)	Origine des correspondances
P1	7 (2)	6 (1)	88 (28)	Europe sauf SW
P2	3 (2)	0 (0)	45(26)	Europe sauf SW, SL
P3	5 (2)	0 (0)	130 (45)	Europe
P4	0 (0)	26 (7)	148 (64)	Europe
P5	0 (0)	6 (1)	48 (24)	F, A, RT
P6	15 (4)	0 (0)	121 (50)	Europe sauf PL

Discussion :

L'identification de six profils EmsB précédemment identifiés dans des pays européens (Knapp et al., 2007; Knapp et al., 2009a; Umhang et al., 2014d) suggère un lien épidémiologique entre la Suède et le Danemark avec le foyer historique européen. Ce résultat ne peut toutefois pas attester avec certitude de l'ancienneté ou du caractère récent de la présence du parasite dans ces pays, même si le faible nombre de profils identifiés en Suède et au Danemark s'apparente aux situations observées dans des zones nouvellement identifiées comme enzootiques (Knapp et al., 2009a; Umhang et al., 2014d). S'il s'agit d'une introduction récente, les facteurs de risque les plus probables d'introduction seraient la migration de renards ou le déplacement de chiens par le biais de voyages dans un pays d'enzootie. Au Danemark, aucune obligation de vermifugation des chiens n'existe et la migration de renards en provenance de l'Europe n'est entravée par aucune barrière artificielle ou naturelle. Au contraire en Suède, la migration de renards ne peut se réaliser qu'en provenance de la Norvège et de la Finlande qui sont deux pays où *E. multilocularis* est considéré absent (Oksanen et al., 2016). Par contre, l'obligation de vermifugation des chiens à l'entrée en Suède est moins stricte depuis 1995 et le risque d'introduction d'*E. multilocularis* par des chiens infestés est considéré comme ayant augmenté (Wahlstrom et al., 2011). L'identification d'un seul profil commun entre la Suède et le Danemark suggère que la présence du parasite dans ces deux pays ne peut être expliquée que par la transmission de l'un à l'autre même si une connexion potentielle n'est pas à exclure. Au niveau national, des profils généralement différents sont identifiés dans chaque région laissant penser à l'absence de connexion des foyers. La poursuite de ces analyses d'épidémiologie moléculaire dans le cadre de la surveillance du parasite chez le renard dans ces deux pays apparaît nécessaire afin d'améliorer la compréhension de la situation épidémiologique.

5.2.3. Exploration par la génétique des origines de l'expansion d'*E. multilocularis* en Pologne

Umhang G. , Karamon J., Hormaz V., Knapp J., Cencek T. & Boué F. Investigation of genetic diversity of <i>Echinococcus multilocularis</i> by EmsB microsatellite through low to high endemic provinces of Poland. <i>Infection, Genetics and Evolution</i> , In press.

Introduction :

Le premier cas vulpin décrit d'infestation par *E. multilocularis* en Pologne a été observé en 1994 (Malczewski et al., 1995). Une première étude de surveillance s'en est suivie de 1995 à 2000 sur 10 des 16 provinces du pays, aboutissant à la mise en évidence de taux de prévalence compris entre 0 et 7,3 % en fonction des provinces, à l'exception des 18 % de renards infectés dans la province de Warminsko-Mazurskie (WM) au nord-est du pays (Machnicka-Rowinska et al., 2002; Malczewski, Gawor, and Malczewska, 2008; Ramisz et al., 1997; Rocki, Malczewski, and Eckert, 1999). Au cours des années 2000, la prévalence vulpine du parasite a augmenté dans toutes les provinces jusqu'à y atteindre plus de 35 % dans certaines d'entre elles (Borecka et al., 2007; Borecka et al., 2008; Karamon et al., 2011; Pacoń et al., 2006). Une étude dans le cadre de la surveillance nationale mise en place de 2009 à 2013 a mis en évidence la présence du parasite dans 15 des 16 provinces polonaises avec des valeurs de prévalence comprises entre 2 et 50 % (Karamon et al., 2014). Toutefois, il apparaît une nette différence de la présence du parasite au niveau géographique avec des provinces de faible enzootie à l'ouest (de 2 à 5,7 %) et de forte enzootie à l'est (11,8 à 50,0 %). Depuis, les fortes valeurs de prévalence atteintes à l'est suite à une forte augmentation se sont maintenues alors que le niveau d'enzootie commence à augmenter lentement également à l'ouest (Karamon et al., 2015).

Cette évolution de la présence du parasite en Pologne nécessite une surveillance régulière mais incite également à tenter de l'expliquer. Seule une faible corrélation entre les niveaux de prévalence et la structure paysagère (zone d'agriculture et forestières) a pu être obtenue (Karamon et al., 2014). Si la population de renards a quadruplé durant les 10-15 dernières années au niveau national, pouvant contribuer aux fortes prévalences actuelles, cela ne peut pas être retenu comme un facteur absolu car cela aurait dû impacter indifféremment les provinces à l'est et à l'ouest. Afin de tenter de comprendre cette évolution de la présence d'*E. multilocularis* en Pologne, la disponibilité d'un panel de vers isolés chez des renards de tout le pays constituait un échantillonnage de choix pour explorer la diversité génétique du parasite. Le microsatellite EmsB

avait déjà permis de comprendre la transmission île-continent au niveau du foyer historique européen (Knapp et al., 2009a), mais également de mieux comprendre l'expansion du parasite en France par la proposition d'un scénario spatio-temporel (Umhang et al., 2014d) (cf. 5.2.1).

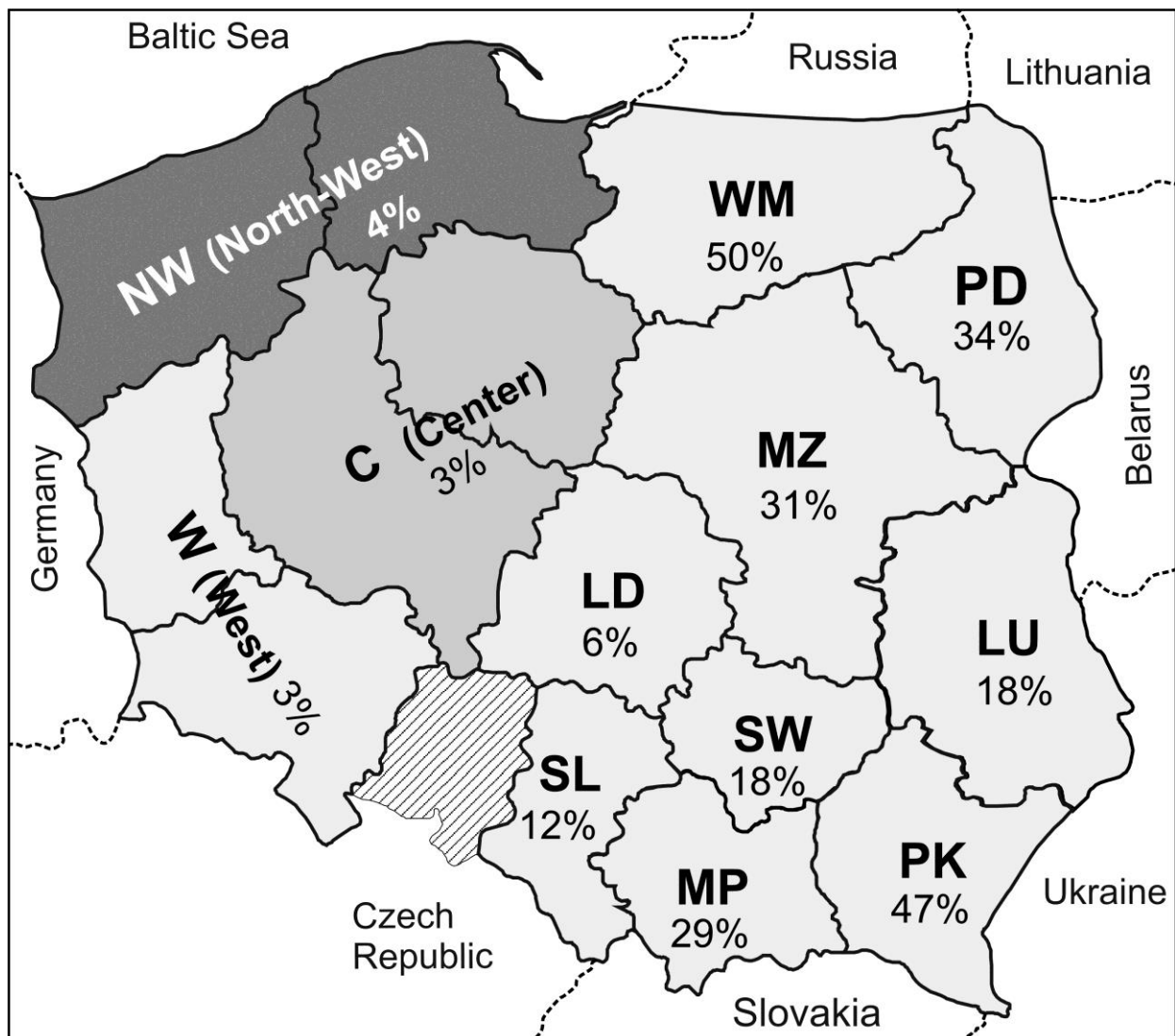


Figure 26 : Localisation des différentes zones échantillonnées à travers la Pologne et leurs prévalences vulpines d'*E. multilocularis* (d'après Karamon et al., 2014)

Matériel et méthodes :

La surveillance nationale d'*E. multilocularis* chez le renard réalisée de 2009 à 2013 (Karamon et al., 2014), a permis d'isoler 301 vers provenant de 87 renards prélevés dans les 15 provinces enzootiques du pays. Un maximum de cinq vers par renard a été pris en compte. Le faible nombre de renards infestés et donc de vers disponibles dans les provinces faiblement enzootiques a nécessité de les regrouper afin d'obtenir un nombre de vers et de renards estimé suffisant pour objectiver la diversité génétique présente tout en tenant compte de la proximité géographique des provinces entre elles ainsi que d'un niveau d'enzootie similaire. Trois groupes ont été créés: le groupe Nord-Ouest incluant les provinces de Zachodniopomorskie (ZP) et de Pomorskie (PM), le groupe Centre représentant les provinces Kujawsko-Pomorskie (KP), Wielkopolskie (WP), et le groupe Ouest regroupant les provinces de Lubuskie (LB) et Dolnośląskie (DS). Les neuf autres provinces du pays Łódzkie (LD), Śląskie (SL), Małopolskie (MP), Świętokrzyskie (SW), Podkarpackie (PK), Warmińsko-Mazurskie (WM), Mazowieckie (MZ), Podlaskie (PD), and Lubelskie (LU) ont été considérées individuellement en raison d'un nombre de vers élevé pour chacune d'entre elles (Figure 26).

Le protocole d'analyse a été le même que celui utilisé précédemment (Umhang et al., 2014d), (cf. 5.2.1). L'ensemble des profils EmsB obtenus à partir des vers a permis la réalisation d'un dendrogramme pour déterminer le nombre de profils EmsB ainsi que le nombre de vers pour chacun des profils. Une comparaison de chacun des profils EmsB identifiés en Pologne avec les échantillons précédemment génotypés en Europe a été réalisée. La base de données européenne regroupait 1094 échantillons d'*E. multilocularis* : France (nombre de vers = 592; nombre d'hôtes définitifs ou intermédiaires = 177), Suisse (84; 19), Allemagne (87; 18), Autriche (98; 22), Slovaquie (63; 14), Pologne (94; 20) et République Tchèque (66; 14), Estonie (10; 2) (Knapp et al., 2007; Knapp et al., 2008; Knapp et al., 2009a; Laurimaa et al., 2015; Umhang et al., 2014d; Umhang et al., 2016c). Les échantillons de Pologne précédemment génotypés ne concernaient que trois provinces situées dans le nord de la Pologne (WM), et la chaîne de montagnes des Tatras (MP et PK) (Knapp et al., 2009a). L'effort d'échantillonnage dans chaque zone a été estimé par la réalisation de courbes d'accumulation. La courbe atteignait l'asymptote quand l'échantillonnage était suffisant pour atteindre le nombre de profils EmsB de la zone. Si l'asymptote n'était pas atteinte, alors l'estimation du nombre de profils théoriques par zone a été évalué (Magurran, 2003). La diversité génétique (α) a été estimée à l'aide de l'indice de Simpson (1/D) en tenant compte du nombre minimum de vers échantillonnés (n=29). L'analyse de la diversité β (partage de profils EmsB entre zones) a été réalisée avec l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis (Legendre and Legendre, 1998).

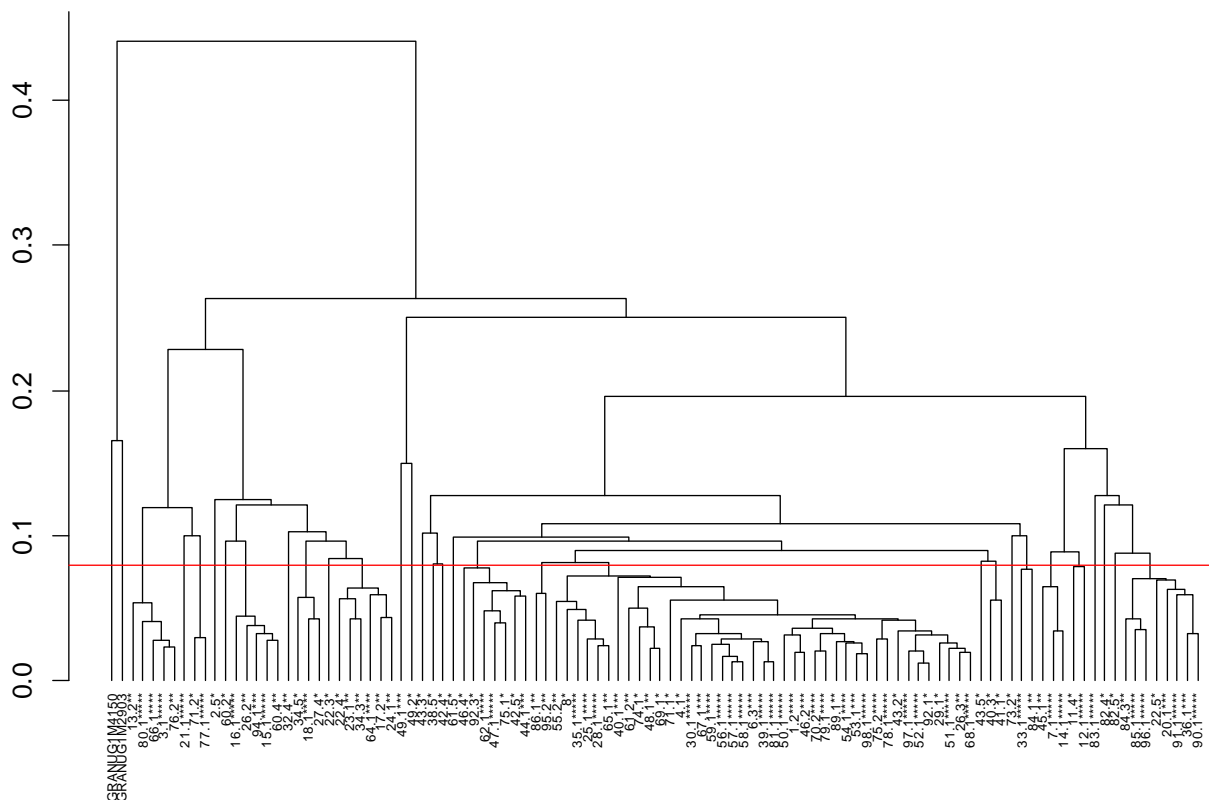


Figure 27 : Dendrogramme construit à partir des données EmsB, où les vers provenant d'un même renard et avec le même profil EmsB ont été regroupés et leur nombre représentés par des astérisques. Deux échantillons d'*E. granulosus* s.s. ont été utilisés comme outgroup. Les valeurs p sont indiquées en rouge et ont été calculés avec 1000 répétitions.

Résultats :

L'analyse microsatellite des 301 vers a permis de décrire 29 profils EmsB différents, dénommés Pol01 à Pol29 (Figure 27). Les profils Pol02 à Pol17, représentant 24,9 % des vers sont exclusivement originaires de la moitié Est du pays (provinces WM, MZ, PD, LU, PK, MP, SW and SL), alors que les profils Pol25, Pol27 et Pol28 (2,7 % des vers) uniquement de la moitié ouest (groupe Nord-Ouest, Ouest et Centre) et les 10 autres profils (72,4 % des vers) sont partagés entre les deux moitiés du pays (Tableau 9). Le profil Pol19 est le plus représenté avec 135 vers (44,9 % de l'échantillonnage quand les autres profils comptent de 1 à 9 vers), et il est présent dans

l'ensemble des 8 zones. Ce profil Pol19 est dominant dans toutes les zones à l'exception de la province MP. Les sept profils EmsB les plus représentés (au moins 10 vers : Pol01, Pol06, Pol10, Pol17, Pol19, Pol24, Pol29) sont généralement partagés par des zones voisines et absent des autres.

Tableau 9 : Distribution du nombre de vers en fonction des profils EmsB et des zones d'échantillonnage.

EmsB profile	Western half				Eastern half								Nb of worms	Nb of foxes	Nb of provinces with the profile	
	N-W ZP/PM	W LB/DS	C WP/KP	LD	WM	PK	PD	MZ	MP	LU	SW	SL				
Pol01		2	2		6		4	5						19	6	5
Pol02												5		5	1	1
Pol03								6						6	2	1
Pol04											1			1	1	1
Pol05										1				1	1	1
Pol06						8			5	2	2			17	5	4
Pol07												2		2	1	1
Pol08						5						1		6	3	2
Pol09									1					1	1	1
Pol10							4		3		4	2		13	6	4
Pol11					3									3	1	1
Pol12					1									1	1	1
Pol13					1									1	1	1
Pol14					1									1	1	1
Pol15					1									1	1	1
Pol16					1									1	1	1
Pol17					9	1	4	1						15	7	4
Pol18				2		2								4	2	2
Pol19	5	1	13	2	17	16	24	20		21	11	5	135	38	12	
Pol20	1				1								2	2	2	
Pol21	1				2								3	3	2	
Pol22	1							1					2	2	2	
Pol23				2								5	7	2	2	
Pol24	5	5			2								12	3	3	
Pol25	1	5											6	2	2	
Pol26										5			5	1	1	
Pol27			1										1	1	1	
Pol28			1										1	1	1	
Pol29		5		7		10			4			3	29	8	5	
Nombre de vers	14	18	17	13	45	42	36	33	13	29	18	23	301			
Nombre de renards	4	5	5	4	15	12	9	10	4	7	6	6				
Nombre de profils	6	5	4	4	12	6	4	5	4	4	4	7				

Dix-huit des 29 profils observés en Pologne avaient déjà été identifiés en Europe, notamment dans les mêmes provinces du nord de la Pologne précédemment échantillonnées (Tableau 10). Les profils Pol08 et Pol23 sont ceux qui ont le plus de correspondance avec les échantillons des différents pays européens mais ils ne sont que peu représentés en Pologne. A l'inverse, le profil majoritaire polonais Pol29 n'a été identifié que dans trois pays européens, dont déjà la Pologne. Parmi les 11 profils de Pologne non précédemment identifiés, dix ne concernent que quelques vers (1 à 6) ce qui confirme la faible fréquence de ces profils, alors que Pol01 (19 vers) est le troisième profil le plus représenté en Pologne. Les six autres profils les plus représentés en Pologne ont déjà été précédemment décrits mais ne constituent pas des profils majeurs. Les huit profils EmsB précédemment obtenus en Pologne en 2001-2005 (Knapp et al., 2009a) ont tous été à nouveau décrits en 2009-2013. Ces profils sont toujours globalement présents dans les mêmes zones géographiques (nord ou sud

du pays) sauf Pol18 qui est passé du nord au sud et Pol23 qui semble avoir disparu du nord tout en restant présent au sud mais sans être identifié dans la province PK comme précédemment. Le profil Pol19 est désormais majoritaire alors qu'il était présent au nord et au sud mais n'était que faiblement représenté auparavant.

Tableau 10 : Comparaison des profils EmsB obtenus en Pologne avec ceux précédemment identifiés en Europe.

	European countries and Polish provinces	animaux (DH/IH)	Echantillons	Nombre de vers dans cette étude
Pol01	aucun	/	/	19
Pol02	France	5	8	5
Pol03	aucun	/	/	6
Pol04	France	4	6	1
Pol05	aucun	/	/	1
Pol06	Suisse, Pologne (PK), France	5	11	17
Pol07	France	2	2	2
Pol08	France, Autriche, République Tchèque, Allemagne, Pologne (PK), Slovaquie	61	126	6
Pol09	aucun	/	/	1
Pol10	France	12	18	13
Pol11	aucun	/	/	3
Pol12	aucun	/	/	1
Pol13	aucun	/	/	1
Pol14	France	1	1	1
Pol15	France, POL (WM, PM)	7	18	1
Pol16	France, République Tchèque, Suisse	13	20	1
Pol17	France, Suisse, Pologne (PM, WM), Estonie, République Tchèque	16	33	15
Pol18	Pologne (PM), Estonie	2	4	4
Pol19	France, Estonie, Pologne (PM, WM, PK)	17	44	135
Pol20	France, Estonie	4	10	2
Pol21	France, Estonie, Allemagne, République Tchèque, Autriche, Pologne (WM, PM)	15	33	3
Pol22	aucun	/	/	2
Pol23	Autriche, République Tchèque, Suisse, France, Allemagne, Pologne (WM, PK, PM), Slovaquie	32	94	7
Pol24	France	3	7	12
Pol25	aucun	/	/	6
Pol26	France	6	12	5
Pol27	aucun	/	/	1
Pol28	aucun	/	/	1
Pol29	Slovaquie, France, Allemagne	19	31	29

Le nombre de profils observés est généralement en accord avec les estimations de richesse de profils et les courbes d'accumulation (Tableau 11), permettant de considérer comme correct l'échantillonnage des vers pour l'évaluation de la diversité génétique par le microsatellite EmsB, à l'exception des provinces du Nord-Ouest et WM. La différence entre le nombre de profils observés et estimés pour ces deux zones étant forte, il serait nécessaire de disposer d'un nombre de vers supérieur pour une estimation plus juste de la diversité génétique. A partir des différentes zones, quatre groupes différents émergent du dendrogramme obtenu par analyse de la diversité β (Figure 28). Le premier groupe est composé des provinces du sud (MP, LD, SL), le second de celles de l'ouest (groupe Ouest et Nord-Ouest), le troisième de celles du nord-est (PD, MZ, LU, WM) et le quatrième regroupe les provinces du Centre et du sud (PK, SW). Les deux derniers groupes sont très proches alors que les deux autres sont génétiquement plus éloignés des deux autres et entre eux. Un gradient de diversité génétique peut être observé à l'intérieur de ces groupes avec généralement des valeurs plus élevées pour les provinces frontalières et plus faible pour celles à l'intérieur du pays.

Tableau 11 : Index de diversité génétique et nombre de profils EmsB observés et estimés dans chacune des zones.

Areas or provinces	No. of worms	No. of observed profiles	No. of profiles estimated (std. error)	Index of genetic diversity
North-West	14	6	9.7 (1.9)	3.6
West	18	5	5.9 (0.9)	3.8
PK	42	6	7.0 (1.0)	3.5
SW	18	4	4.9 (0.9)	2.3
Center	17	4	5.9 (1.3)	1.7
SL	23	7	8.0 (1.0)	5.0
LD	29	4	5.0 (1.0)	2.8
MP	13	4	4.9 (0.9)	3.3
WM	45	12	17.9 (2.4)	4.2
MZ	33	5	6.9 (1.4)	2.3
PD	36	4	4 (NA)	2.1
LU	29	4	5.0 (1.0)	1.8

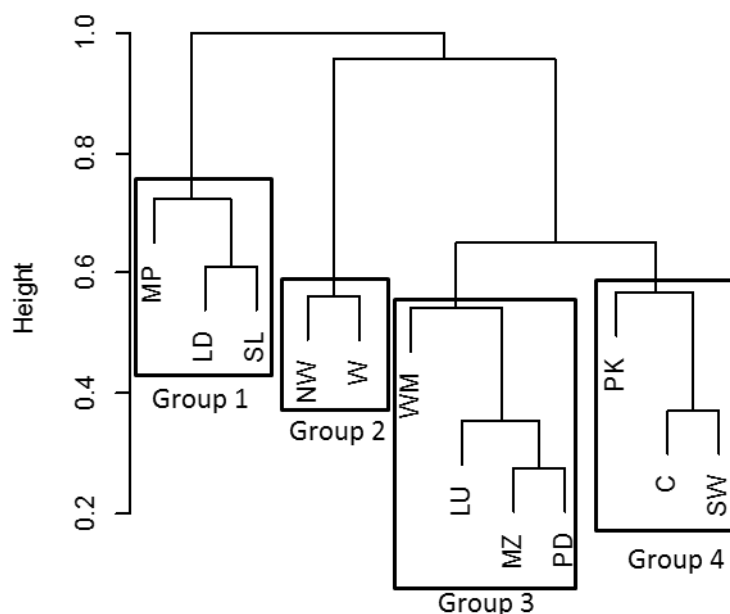


Figure 28 : Dendrogramme basé sur la distance génétique entre les assemblages de profils des différentes régions.

Discussion :

L'association du génotypage par EmsB à la surveillance d'*E. multilocularis* a déjà démontré qu'elle permettait d'obtenir des informations épidémiologiques pertinentes quant à dynamique de la circulation et de l'expansion au sein de pays européens (Casulli et al., 2009; Casulli et al., 2010; Umhang et al., 2014d). Le partage avec l'Europe de 18 des 29 profils observés en Pologne confirme à nouveau l'appartenance de la Pologne au foyer d'*E. multilocularis* d'Europe centrale (Knapp et al., 2009a). La précédente étude à l'échelle nationale ayant permis d'analyser la diversité génétique du parasite par le microsatellite EmsB avait déjà été réalisée dans un pays de l'Europe de l'Est, la Hongrie, et avait mis en évidence 14 profils EmsB (Casulli et al., 2010). Un profil dominant avait également été identifié (regroupant 55,5 % des vers) mais différent du Pol29. La présence d'un profil dominant pourtant peu représenté en zone historique d'enzootie européenne confirme le statut de la Pologne comme zone périphérique dans le système de transmission île-continent d'*E. multilocularis* en Europe (Knapp et al., 2009a). L'existence d'un unique profil dominant rarement identifié ailleurs peut être expliquée par un évènement fondateur lorsqu'un profil parasitaire envahit un nouveau territoire (Templeton, 2008).

Ce profil n'était pourtant dominant que dans une seule des trois provinces précédemment étudiées. Entre-temps, la prévalence vulpine d'infestation par *E. multilocularis* a fortement augmenté dans les provinces MP et PK, passant respectivement de 0,6 % à 28,6 % et de 7,2 % à 47,2 % (Karamon et al., 2014). La poursuite du génotypage par EmsB dans le cadre de la surveillance du parasite en Pologne apparaît utile pour étudier la progression du parasite en observant l'évolution de la distribution des profils EmsB et notamment le profil Pol19 devenu majoritaire. La distribution des six autres profils majoritaires démontre que chaque profil n'est pas dispersé à travers tout le pays mais présent que dans des provinces voisines, soulignant leurs connexions. La distance géographique n'est considérée que comme un facteur mineur parmi ceux susceptible d'intervenir dans la distribution génétique du parasite (Casulli et al., 2010; Knapp et al., 2009a). La distribution préférentielle des profils EmsB démontre un rôle écologique important du renard dans la dispersion du parasite car elle résulte de la dispersion des renards infestés. L'étude des facteurs climatiques (pluviométrie annuelle) et paysagers (proportions de zones forestières et agraires) avait démontré séparément leur absence de relation avec la différence de prévalence d'infestation du renard par *E. multilocularis* observée entre les deux moitiés du pays (Karamon et al., 2014), démontrant la nécessité d'une approche multifactorielle pour la compréhension des facteurs de risque de transmission du parasite.

Les connexions préférentielles entre certaines provinces voisines sont également mises en évidence par les quatre groupes du dendrogramme. Si des connexions peuvent également exister entre des provinces en dehors de ces groupes, elles semblent toutefois d'une importance moindre. Le gradient de diversité génétique observé dans ces groupes tend à montrer une influence des pays voisins, soulignant des influences multiples pour la circulation du parasite en Pologne. Les profils EmsB disponibles dans les pays voisins (Allemagne, République Tchèque, Slovaquie) ont été retrouvés dans les provinces frontalières correspondantes, tendant à confirmer ces influences étrangères. Les niveaux de prévalence dans ces pays frontaliers sont très variables et il en résulte donc des pressions d'infestation différentes, pouvant contribuer à expliquer les différences de prévalence en Pologne. Les faibles prévalences observées à l'ouest du pays coïncident avec celles observées au nord de l'Allemagne. L'absence de données de prévalence parasitaire dans les autres pays frontaliers (Biélorussie, Ukraine, République Tchèque et Russie baltique), à l'exception de la Lituanie et de la Slovaquie (Oksanen et al., 2016), empêche de préciser l'influence de ces pays, bien qu'il soit généralement supposé l'existence d'une forte prévalence. Toutefois une analogie peut être faite avec la récente analyse d'haplotypes de gènes mitochondriaux (*cob*, *cox1*, *nad2*) réalisée en Pologne (Karamon et al., 2017). Parmi les 15 haplotypes observés, un haplotype dominant est également présent à travers tout le pays, avec aussi une observation de l'influence probable des pays voisins à l'est et à l'ouest. Ainsi, un haplotype du clade asiatique a été plusieurs fois identifié dans le nord-est du pays, reflétant la réalité d'une expansion depuis l'Asie vers l'Europe comme le souligne également l'identification d'haplotypes asiatiques en Russie Occidentale (Konyaev et al., 2013). Le manque de données de profils EmsB provenant des pays d'Europe de l'est est très préjudiciable à la compréhension globale du foyer d'*E. multilocularis* d'Europe centrale alors que l'hypothèse de sa connexion avec les zones enzootiques de l'Ex-URSS avait déjà été posée il y a 30 ans (Frank, 1987). L'accumulation dans la base de données actuelle

de nouveaux échantillons provenant des pays de l'Europe de l'est apparait comme la prochaine étape dans les études d'épidémiologie moléculaire pour la compréhension de la dispersion du parasite en Europe et la potentielle prédiction des futures expansions.

6. Surveillance et épidémiologie moléculaire d'*E. granulosus sensu lato*

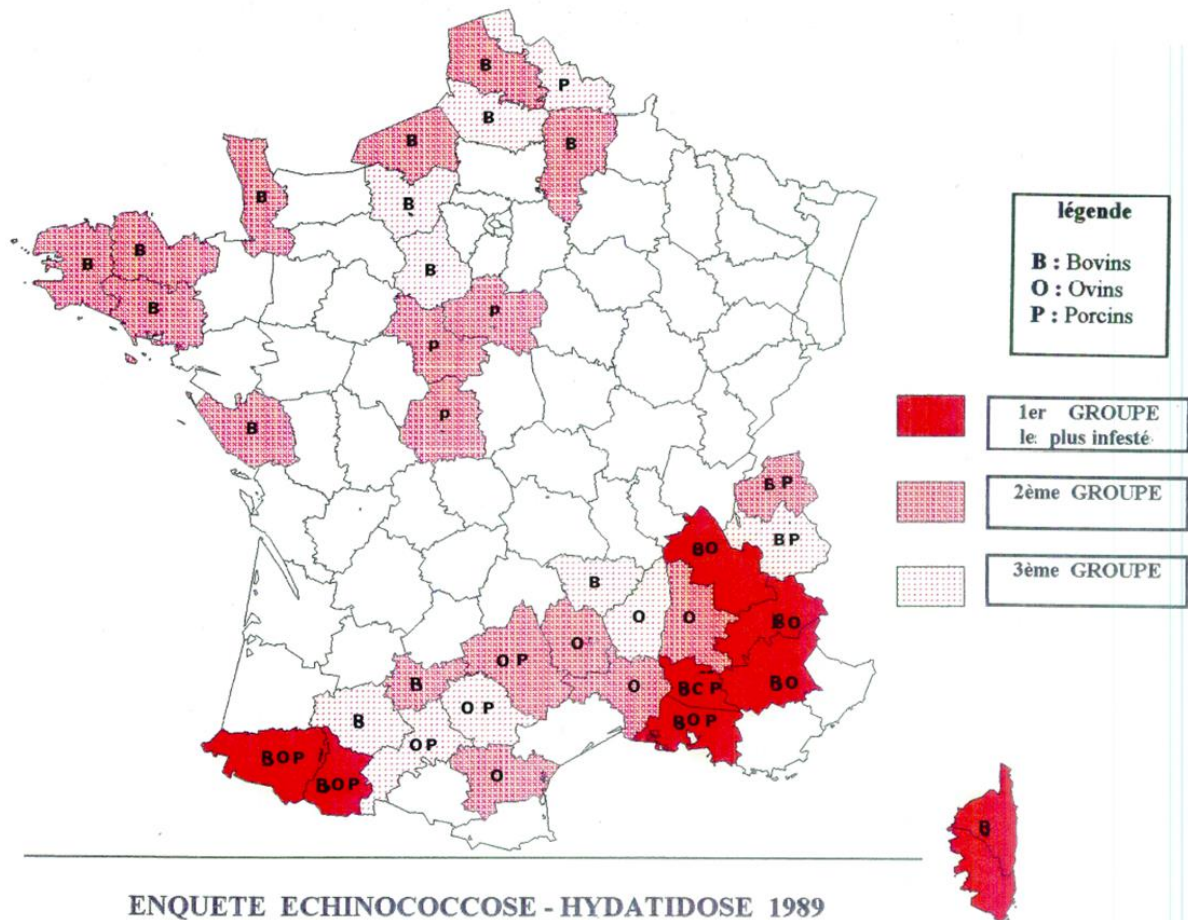
L'absence pendant près de vingt ans de données épidémiologiques concernant *E. granulosus* en France ans justifiait la mise en place d'études de surveillance par le LNR. L'évolution de la taxonomie du complexe d'espèces *E. granulosus s.l.* et la maîtrise des outils moléculaires de diagnostic permettaient de pouvoir obtenir plus d'informations sur les différents cycles parasitaires assurant le maintien supposé du parasite en France. Les résultats intéressants des premières enquêtes régionales réalisées à mon initiative ont permis d'aboutir à la mise en place d'une surveillance nationale du parasite en abattoir pendant un an. L'expertise épidémiologique et moléculaire du LNR acquises au cours de ces études a permis d'initier des collaborations internationales dans des zones d'hyper-endémie en Europe et en Afrique du Nord. Enfin, des travaux ont été réalisés afin de disposer d'un nouvel outil d'épidémiologie moléculaire permettant d'approfondir les informations acquises par une investigation plus fine de la diversité génétique.

6.1. Surveillance et caractérisation d'*E. granulosus sensu lato* en France

6.1.1. Introduction : contexte épidémiologique

Historiquement présent à travers toute la France, *E. granulosus* était d'abord confiné aux zones rurales d'élevage où la présence de chiens errants et la mauvaise gestion des viscères ainsi que la transhumance dans certaines régions ont permis le maintien du cycle parasitaire. Dans les années 1970-1980, la présence du parasite s'est ensuite étendue également en zone péri-urbaine et urbaine notamment en raison des coutumes d'abattage rituel hors abattoirs (Soule, 1994). Ces opportunités accrues de réalisation du cycle parasitaire ont entraîné une augmentation des cas humains d'échinococcose kystique dans les foyers les plus importants du sud-ouest, sud-est et de la Corse mais aussi dans d'autres régions telle que la région Parisienne où des cas isolés ont été signalés (Soule et al., 1989). Ainsi, l'incidence de l'échinococcose kystique, longtemps uniquement considérée comme une zoonose d'importation en provenance des pays du pourtour méditerranéen, a été estimée dans les années 1980 à 300 cas humains par an. Alors que 53 % avait pour origine l'Afrique du Nord, plus de 37 % représentaient désormais des cas autochtones à la Corse et à la région Provence-Alpes-Côte d'Azur (Soule, 1994).

Face à ces changements dans l'épidémiologie de l'infestation par *E. granulosus* en France, une enquête nationale en abattoir a été menée en 1989 par le ministère de la santé (Direction Générale de la Santé), le ministère de l'agriculture et de la forêt (service vétérinaire de la DGAI) et le ministère de l'intérieur (Bureau de la Prévention et de la Protection Sociale). Lors de l'inspection vétérinaire à l'abattoir, le nombre d'animaux présentant des kystes hydatiques devaient être reporté par département tout au long de cette année. Partant du principe que les cas d'infestation sur des jeunes animaux étaient rares, seuls les animaux adultes étaient concernés. Il s'agissait des bovins, ovins, caprins, et porcins. Les équidés avaient été écartés car déjà à cette époque il avait été observé que l'actuelle espèce *E. equinus* n'était pas zoonotique. Le diagnostic était basé uniquement sur des critères d'observation macroscopique sans distinction de la localisation hépatique et/ou pulmonaire des kystes et de leur fertilité. Les prévalences nationales en abattoir avaient été estimées à 0,13 % chez les bovins adultes, 0,42 % chez les ovins-caprins et 0,009 % chez les porcins (Soule et al., 1989). Des différences régionales ont pu être mises en évidence avec un large foyer ovin dans le sud (des Pyrénées-Atlantiques aux Hautes-Alpes), dans le nord et la Bretagne pour les bovins, alors que pour les porcins le sud et le Centre de la France étaient concernés (Figure 29). Quelques rares études régionales ont ensuite été réalisées, notamment en Midi-Pyrénées avec une prévalence estimée à 0,31 % chez les bovins (Bichet and Dorchies, 1998). Ainsi, lors de mon arrivée au laboratoire, le LNR ne disposait d'aucune donnée récente sur la présence d'*E. granulosus* en France. Il convenait donc de mener des études épidémiologiques permettant également d'acquérir les premières données moléculaires.



ENQUETE ECHINOCOCCOSE - HYDATIDOSE 1989

Figure 29 : Répartition des départements en fonction des niveaux d'infestation pour *E. granulosus* observés lors de l'enquête nationale de 1989 (Soulé et al. 1989).

6.1.2. Actualisation des données de prévalence de l'infestation par *E. granulosus sensu lato* dans le Sud de la France

Umhang, G., Richomme, C., Boucher, J. -M., Hormaz, V., & Boué, F. (2013). Prevalence survey and first molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in France. *Parasitology Research*, 112(4), 1809-1812.

Introduction :

Depuis 1989, seules quelques rares données sur la présence d'*E. granulosus* étaient disponibles en raison de l'absence d'obligation de déclaration des cas observés en abattoir. Seul le motif de présence de kystes est suffisant pour justifier de la saisie des organes parasités sans avoir à préciser un diagnostic plus précis. Ainsi aucun cas d'infestation par *E. granulosus* n'était reporté annuellement à l'AESA (Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire) par la France. Malgré cette absence de données, la France était toujours communément considérée comme endémique, avec le sud comme hautement endémique (Eckert et al., 2001). Toutefois au plan national, cette absence de cas a progressivement laissé supposer à une absence du parasite en France d'autant que les cas humains identifiés étaient quasi-exclusivement considérés comme des cas importés (infestation du patient hors de France). A mon initiative, le LNR *Echinococcus spp.* a décidé de pallier à ce manque de données pendant 20 ans par la mise en place d'une enquête de surveillance de la présence du parasite, qui a été réalisée en 2009-2010 dans le sud de la France (Umhang et al., 2013c).

Matériels et méthodes :

Le sud de la France a été choisi comme zone d'étude car il avait été observé précédemment comme la zone de plus forte endémie. Après avoir mené une enquête téléphonique auprès des vétérinaires responsables des abattoirs pour chacun des départements, j'ai sélectionné ceux qui avaient pu observer des suspicions de cas d'échinococcose kystique au cours des dernières années et pour lesquels la mise en place de la collecte de prélèvements était possible. Ainsi, 24 abattoirs de 10 départements ont été concernés par cette enquête d'un an (Figure 30). Au niveau des abattoirs, lors de l'inspection des carcasses tout kyste hydatidique ou kyste suspect situé sur les viscères (principalement foie, poumons) des bovins, ovins, caprins et porcins inspectés devait être collecté. Les kystes étaient ensuite conservés dans l'éthanol à 70° ou bien congelés jusqu'à expédition au LNR. Au laboratoire, les prélèvements étaient traités selon le protocole dédié afin de déterminer la fertilité et de réaliser le diagnostic parasitaire à l'aide d'une PCR ciblant le gène *cox1* (Bowles et al., 1992) puis le gène *nad1* (Bowles and McManus, 1993) en cas d'infestation par *E. granulosus s.l.* (cf. encart n°2). L'identification des séquences nucléotidiques était réalisée par comparaison avec des séquences de référence des espèces et génotypes d'*E. granulosus s.l.* et par la réalisation d'un BLAST dans GenBank.

Résultats et discussion :

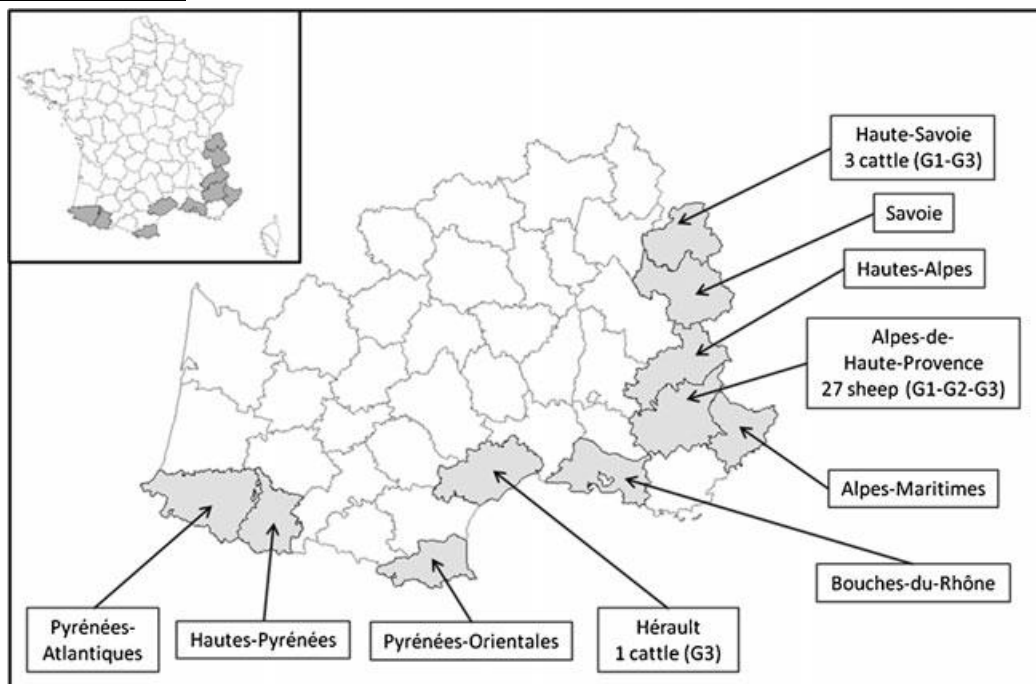


Figure 30 : Répartition géographique des départements concernés (en gris) par l'enquête de surveillance d'*E. granulosus*. Le nombre de cas positifs pour chaque espèce animale est indiqué ainsi que les génotypes d'*E. granulosus s.s.* observés.

Des kystes hydatiques provenant de 31 animaux ont ainsi pu être mis en évidence. Il s'agissait de 27 ovins abattus dans les Alpes-de-Haute-Provence, de trois bovins de Haute-Savoie et d'un bovin de l'Hérault (Figure 30). Seule l'espèce *E. granulosus s.s.* était concernée alors que les trois génotypes (G1, G2, G3) qui la composent dans l'ancienne taxonomie étaient représentés. Ces résultats indiquaient une prévalence apparente à l'abattoir d'*E. granulosus s.s.* de 4 cas pour 100 000 ovins abattus (IC_{95%} : [3-5]) et de 3 cas pour 100 000 bovins abattus (IC_{95%} : [1-7]). Comme seuls trois départements étaient concernés par des cas, les prévalences départementales sont plus élevées : 6 cas pour 100 000 chez les ovins dans les Alpes-de-Haute-Provence et respectivement 13 (IC_{95%} : [4-37]) et 25 (IC_{95%} : [4-141]) cas pour 100 000 chez les bovins en Haute-Savoie et dans l'Hérault. Si la présence du parasite a ainsi été confirmée dans le sud qui était considérée comme la plus forte zone d'endémie, les prévalences observées sont bien plus faibles que celles observées lors de l'enquête nationale de 1989 (Soule et al., 1989) : près de 40 fois chez les bovins et de 100 fois pour les ovins. A l'échelle régionale, le foyer ovin du sud-est semble persister alors que l'absence de cas dans les Pyrénées incite à réaliser une nouvelle étude sur une zone plus large avant de pouvoir conclure à la disparition de ce qui était un des foyers majeurs 20 ans auparavant. Cette étude a également permis de mettre en œuvre la première

caractérisation moléculaire d'*E. granulosus* en France. L'absence de disponibilité d'outils moléculaires lors des études précédentes et l'évolution de la taxonomie n'ont pas permis, même *a posteriori*, de caractériser avec certitude les espèces concernées au sein d'*E. granulosus s.l.* La présence d'autres espèces qu'*E. granulosus s.s.* pouvait être suspectée, notamment chez les bovins et porcins, au regard des prévalences élevées obtenues lors de l'enquête de 1989. L'absence de kystes fertiles chez les cas bovins et le fort taux de fertilité observé chez les cas ovins (81,4 %) est conforme à ce qui est relevé pour *E. granulosus s.s.*, pour lequel les bovins ne sont que des hôtes accidentels ne participant pas au cycle parasitaire entre chiens et ovins. L'exploration d'autres zones d'endémie apparaît donc indispensable suite à l'obtention de ces résultats afin de disposer d'une vision plus complète de la présence du parasite et des espèces concernées.

6.1.3. Actualisation de la présence d'*E. granulosus sensu lato* en Corse

Umhang, G., Richomme C., Hormaz V., Boucher J-M. & Boué, F. Pigs and wild boar in Corsica harbor *Echinococcus canadensis* G6/7 at levels of concern for public health and local economy. Acta Tropica, 2014, 133, 64-68.

Umhang G. Richomme C, Boué F. L'hydatidose porcine en Corse : épidémiologie et caractérisation moléculaire. Bulletin Epidémiologique, Santé Animale et Alimentation, 2012, (48), 6-9.

Introduction :

Dans la foulée de l'enquête dans le sud de la France, j'ai initié des contacts afin de réaliser la mise en place d'une étude similaire en Corse et pouvoir évaluer les espèces d'*E. granulosus s.l.* potentiellement présentes et estimer leur niveau de prévalence (Umhang et al., 2014f). L'île était précédemment considérée comme un foyer important d'infestation par *E. granulosus* en France avec une incidence de 10 cas pour 100 000 habitants et des prévalence chez les ovins de 46 % en 1960 et toujours encore de 15 % vingt ans plus tard (Deschiens, 1960; Dumon et al., 1981). Lors de l'enquête nationale de 1989, des infestations n'avaient été observées que chez les bovins en Corse, mais seuls des résultats partiels ne permettant pas de disposer d'une vision correcte de l'infestation avaient été obtenus de cette région (Soule et al., 1989). La proximité avec la Sardaigne, distante de 15 km, qui constitue un foyer très fortement endémique d'*E. granulosus s.s.*, amenait à penser que l'île puisse encore constituer un foyer enzootique pour cette espèce 20 ans plus tard. Au bilan, à l'image du constat fait pour la France continentale, localement les données de prévalence chez les animaux de rente comme chez l'Homme étaient très défaillantes.

Matériels et méthodes :

En collaboration avec les DDPP (Direction Départementale de protection des Populations) des deux départements de l'île, une enquête sur la présence de kystes hydatiques en abattoirs a été menée d'octobre 2009 à avril 2010. Les espèces animales concernées, le protocole de collecte des kystes à l'abattoir et d'analyse au laboratoire étaient identiques à l'enquête menée dans le sud de la France (Umhang et al., 2013c) (cf. 6.1.2. et encart n°2). Toutefois en Corse-du-Sud, seule une surveillance opportuniste basée sur plusieurs visites durant la période d'enquête a pu être réalisée dans les trois abattoirs existants de Cuttoli, de Bastelica et de Cozzano en Corse-du-Sud. La surveillance exhaustive réalisée dans l'unique abattoir de Haute-Corse (Ponte-Leccia) a permis l'examen de 5970 ovins, 2527 porcins, 2431 bovins et 1860 caprins. En parallèle, une surveillance de la présence de kystes hydatiques chez des sangliers tués à la chasse dans la région du Bozio en Haute-Corse a également été menée d'octobre 2010 à janvier 2011.

Résultats :

Au cours de cette enquête à l'abattoir, 180 porcs (dont 148 en Haute-Corse) ont été diagnostiqués comme présentant des kystes hydatiques tous localisés au niveau du foie. Aucune infestation des autres espèces d'animaux de rente n'a pu être observée. La présence d'au moins un kyste fertile a été relevée chez 30 % des porcs infestés. Parmi les 101 sangliers examinés, quatre présentaient des kystes hydatiques sur le foie dont un pour lequel des protoscolex ont été observés. L'analyse moléculaire des gènes mitochondriaux *cox1* et *nad1* a permis d'identifier *E. canadensis* G6-7 comme la seule espèce responsable des infestations chez les porcs et les

sangliers. Les séquences nucléotidiques de deux gènes mitochondriaux supplémentaires (*nad3* et *atp6*) ont été obtenues d'après Lavikainen et al. (Lavikainen et al., 2006) à partir de 19 échantillons provenant de sangliers et de porcs originaires des deux départements de l'île. Au final, l'observation de deux haplotypes pour *cox1* (correspondant aux séquences de référence des génotypes G6 et G7), d'un haplotype pour *nad1* (séquence mixte entre G6 et G7), de trois haplotypes pour *nad3* et de quatre pour *atp6* a abouti à l'identification de quatre variants génétiques : G6/7A, G6/7B, G6/7C and G6/7D. Ces variants se situent entre les génotypes G6 et G7 justifiant la désignation *E. canadensis* G6-7 désormais couramment employée dans la taxonomie d'*E. granulosus s.l.* (Figure 31).

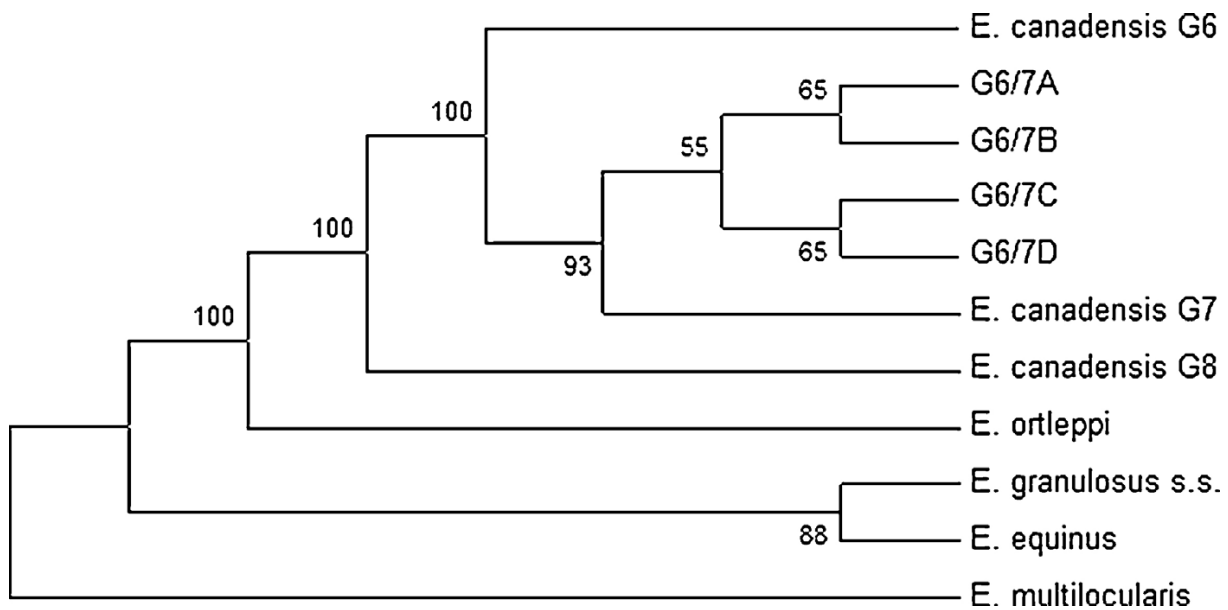


Figure 31 : Relations phylogénétiques entre les quatre variants observés chez les porcs et sangliers en Corse (G6/7A, G6/7B, G6/7C and G6/7D) avec les espèces du groupe *E. granulosus s.l.* à partir des séquences nucléotidiques des gènes mitochondriaux *cox1*, *nad1*, *nad3* et *atp6*. Les valeurs de bootstrap (%) sont indiquées à chaque nœud. *E. multilocularis* a été utilisé comme exogroupe.

La prévalence abattoir chez les porcs en Haute-Corse a pu être estimée à 5,9 % (IC_{95%} : [5,0–6,8]). Au moins un cas d'hydatidose porcine a été détecté dans 61,8 % des 89 cheptels passés à l'abattoir, représentant presque la moitié des communes échantillonnées (49,1 % ; n=55). Lorsque le parasite était présent, la prévalence dans les différentes communes du département variait de 0,4 à 80,0 %. Dans la majorité des 28 communes dans lesquelles aucun cas d'hydatidose n'a été observé parmi les porcs abattus, seuls quelques animaux (de 1 à 21, moyenne de 8,5) sont passés à l'abattoir durant la période de surveillance. Une prévalence similaire à celle des porcs a été observée chez les sangliers avec 4,0 % (IC_{95%} : [1,1–9,8]).

Discussion :

Les résultats obtenus dans cette étude permettent de disposer de données actualisées sur la présence d'*E. granulosus s.l.* en Corse. En plus de la disponibilité de ces données de prévalence, l'identification moléculaire réalisée pour la première fois sur l'île apporte une information supplémentaire avec l'identification d'*E. canadensis* G6-7. Il s'agit de la seconde espèce d'*E. granulosus s.l.* présente en France suite à l'identification d'*E. granulosus s.s.* dans le sud (Umhang et al., 2013c). Si cette espèce a été retrouvée uniquement chez les suidés, il est intéressant de constater l'absence d'identification d'*E. granulosus s.s.* dans cette zone historique de haute endémie. Au regard des données précédentes de forte prévalence chez les ovins et bovins, il pouvait être attendu d'identifier *E. granulosus s.s.* chez les ovins et avec des infestations « accidentelles » de bovins. D'ailleurs, en Sardaigne les porcs sont plus infestés par cette espèce que par *E. canadensis* G6-7 (Varcasia et al., 2006). En Corse, les ovins, bovins et caprins sont élevés dans des zones plus éloignées des fermes et donc des chiens que les porcs, ce qui peut expliquer une probabilité d'infestation moindre. De plus, une très faible proportion de bovins, ovins et caprins sont abattus officiellement avec une inspection sanitaire, car ils sont

rarement élevés pour la production de viande à l'exception des jeunes animaux. L'absence d'infestation d'autres espèces animales que les suidés et l'absence d'identification d'*E. granulosus* s.s. doit ainsi être interprétée avec précaution. En effet, 75 % des bovins abattus au cours de l'étude était des veaux et tous les ovins et caprins avaient moins de deux mois, laissant une très courte période pour l'infestation et le développement larvaire potentiel. Au contraire, les porcs sont abattus autour de 18 mois en raison du faible taux de croissance de la race locale et dans le but de les laisser consommer les châtaignes et glands à l'automne.

Seule une localisation hépatique des kystes hydatiques a pu être observée chez les suidés. Cela avait déjà été décrit pour *E. canadensis* G6-7 en Sardaigne et en Lituanie avec un taux de fertilité similaire (Bruzinskaite et al., 2009; Varcasia et al., 2006). Des infestations pulmonaires ont été décrites mais le taux de fertilité des kystes est inférieur de moitié (20 % contre 44 %) à celui observé sur le foie (Mwambete, Ponce-Gordo, and Cuesta-Bandera, 2004).

La prévalence apparente d'*E. canadensis* G6-7 chez les porcs obtenue en Corse est légèrement plus faible que celle observée dans d'autres pays européens concernés que sont la Roumanie (0,96–10,12 %), la Lituanie (13,2 %) ou la Sardaigne voisine (9,4 %) (Bruzinskaite et al., 2009; Morariu et al., 2011; Varcasia et al., 2006). Si pour des raisons logistiques la prévalence de l'hydatidose n'a pu être déterminée qu'en Haute-Corse, on peut envisager un niveau de prévalence similaire en Corse-du-Sud, en raison d'une géographie des paysages identique et des mêmes pratiques d'élevage. Les différences de prévalence au niveau communal s'expliquent uniquement par la différence des effectifs abattus durant la période de l'étude. Depuis 2005, un décret ministériel rend obligatoire l'abattage officiel en abattoir des porcs. Pourtant, en Corse, une très grande partie des porcs sont encore abattus en dehors de tout contrôle officiel, notamment en raison des difficultés d'accès aux abattoirs. La prévalence réelle d'infestation par *E. canadensis* G6-7 pourrait donc encore être supérieure à celle obtenue uniquement à l'abattoir. La très grande différence des valeurs de prévalence d'infestation par *E. granulosus* s.l. entre la Corse et le sud de la France s'explique par cet abattage hors contrôle sanitaire mais aussi par le mode d'élevage. Le parcours libre pratiqué sur l'île pour les porcs est beaucoup plus favorable à l'entretien du cycle parasitaire que le pâturage classiquement pratiqué sur le continent notamment pour les ovins et bovins, alors qu'une grande partie de l'élevage porcin y est pratiqué hors-sol. Seule la transhumance pratiquée dans les Alpes se rapproche de ce qui est fait en Corse et constitue d'ailleurs un facteur important dans la contamination parasitaire par *E. granulosus* s.l.

L'échantillonnage effectué chez les sangliers a permis de réaliser la première identification moléculaire d'*E. granulosus* s.l. dans la faune sauvage en France. Cela a permis de démontrer que les sangliers étaient concernés comme les porcs par un cycle parasitaire chiens-suidés où se mêlent faune sauvage et espèces domestiques pour les hôtes intermédiaires. Potentiellement d'autres espèces de la faune sauvage insulaire pourraient être infestées par *E. granulosus* s.l., telles que le mouflon, le cerf et le renard comme hôte définitif. Cela semble toutefois peu probable, hors contamination accidentelle, car ces hôtes intermédiaires sauvages ne partagent pas les mêmes écosystèmes que les espèces domestiques. Le renard peut être infesté par *E. granulosus* s.l. (Eckert et al., 2001; Seimenis, 2003) et la consommation de carcasses de porcs par cette espèce a déjà été observée en Corse lors de l'identification de cas de trichinellose (Richomme et al., 2010). Cependant, son rôle potentiel d'hôte définitif semblerait négligeable en comparaison du chien, en raison de la proximité de ce dernier avec les élevages et les espèces sauvages lors des activités de chasse.

Les figatelli, saucisses fabriquées à partir de foie de porc (et occasionnellement de sanglier), représentent une partie importante de la charcuterie traditionnelle Corse (Casabianca, 1996). A notre connaissance l'impact de la saisie en abattoir des foies parasités sur la production de figatelli n'a pas été estimée mais il paraît évident au regard de la forte prévalence de l'hydatidose que cela doit constituer une préoccupation économique. De plus, il est reconnu que l'infestation par *E. granulosus* diminue le rendement et la qualité de la viande et retarde la croissance (Torgerson, 2003). Ces conséquences indirectes de l'infestation parasitaire sont généralement négligées par les éleveurs alors qu'elles pourraient constituer un élément intéressant à considérer dans la perspective d'une lutte intégrée.

En dépit de l'existence de cas humains d'échinococcose kystique en Corse, aucune donnée moléculaire n'est disponible. Si quelques données sont disponibles en France continentale, *E. canadensis* n'a jamais été identifiée à partir de cas humains. Pourtant, si *E. granulosus s.s.* est l'espèce responsable de la majeure partie des infestations humaines dues à *E. granulosus s.l.* (88,44 %) dans le monde, *E. canadensis* G6-7 apparaît comme la seconde espèce (11,07 %) la plus zoonotique du groupe (Alvarez Rojas et al., 2014). En plus de l'impact économique sur la production de *figatelli*, l'impact zoonotique de la présence d'*E. canadensis* à un niveau élevé de prévalence doit donc également constituer un élément d'alerte, du fait de son impact potentiel en santé publique. Dans ce contexte, une identification moléculaire systématique des cas humains en France semble apparaître comme une recommandation pertinente pour compléter les données épidémiologiques au niveau animal et obtenir une vision plus complète de la surveillance d'*E. granulosus s.l.* en France. Malheureusement en dépit de nombreux cas humains d'échinococcose kystique chez des patients originaires de Corse, aucune analyse moléculaire n'a pu être réalisée. Il est donc à l'heure actuelle impossible de caractériser le rôle zoonotique d'*E. canadensis* G6-7 au niveau de l'île. Il semble également indispensable d'y caractériser le cycle parasitaire d'*E. canadensis* G6-7 en réalisant des enquêtes au sein de la population canine de l'île et plus particulièrement des chiens en contact étroit avec les élevages de porcs et impliqués dans les activités de chasse.

6.1.4. Plan de surveillance nationale d'*E. granulosus sensu lato*

Umhang G., Hormaz V., Peytavin C., Boucher JM., Itié-Hafez S., Danan C., Boué F. (2014d) Epidémiologie et surveillance d'*Echinococcus granulosus* à l'abattoir : résultats du plan de surveillance 2012. Bull. Épidémiologique, Santé Animale et Alimentation, (62), 8-12.

Grenouillet F., **Umhang G.**, Arbez-Gindre F., Manton G., Delabrousse E., Millon L., Boué F. *Echinococcus ortleppi* infections in humans and cattle, France. Emerging Infectious Disease, 2014, 20, (12), 2100-2102.

Introduction :

Les enquêtes de surveillance de l'infestation par *E. granulosus s.l.* menées dans le sud de la France et en Corse ont permis de mettre en évidence pour la première fois en France deux espèces d'*E. granulosus s.l.* et d'estimer leurs prévalences actuelles à l'abattoir (Umhang et al., 2013c; Umhang et al., 2014f). Bien que ces prévalences soient bien inférieures à celles observées lors de la dernière enquête nationale en 1989 (Soule et al., 1989), la persistance du cycle parasitaire a incité la DGAL à mettre en place en 2012 un plan de surveillance nationale de la contamination des viscères d'animaux de boucherie. Ce plan de surveillance d'un an à l'abattoir était destiné à préciser la prévalence de l'échinococcose kystique animale en France et la répartition du parasite à l'échelle nationale, et à réaliser une caractérisation moléculaire systématique des cas d'hydatidose.

Matériels et méthodes :

L'ensemble des abattoirs français (départements et régions d'Outre-Mer inclus) ont été concernés *via* les DDPP pour la collecte d'échantillons. Comme pour les enquêtes précédentes, il convenait de faire parvenir au LNR tous les kystes suspects à localisation principalement hépatique et pulmonaire. En amont, une aide au diagnostic différentiel a été réalisée sur la base de photographies de kystes afin que les kystes clairement identifiés comme dus à *T. hydatigena* (kyste à paroi flasque, rosé et translucide) ne soient pas transmis. Les espèces animales concernées étaient les ovins, les bovins, les porcins, les caprins mais aussi les équins, afin de couvrir tous les hôtes intermédiaires domestiques potentiels des différentes espèces d'*E. granulosus s.l.* En parallèle à la saisie et à l'envoi, il était demandé de transmettre les informations d'identification permettant de connaître le dernier lieu d'élevage pour les ovins et les porcins ainsi que les différentes exploitations où l'animal avait séjourné pendant au moins six mois pour les bovins. Les prélèvements ont été analysés au laboratoire selon le protocole dédié du LNR (Umhang et al., 2013b; Umhang et al., 2014c) (encart n°2). Il s'agissait d'un examen macroscopique initial pour évaluer la fertilité des kystes puis de la réalisation d'une

extraction d'ADN suivie de l'amplification de gènes mitochondriaux (*cox1*, puis également de *nad1* en cas d'identification d'*E. granulosus s.l.*) (Bowles et al., 1992; Bowles and McManus, 1993).

Résultats:

De janvier à décembre 2012, 94 abattoirs répartis dans 57 départements ont fait parvenir au moins un kyste permettant la collecte au total de 1237 échantillons. Pour 41 animaux, des kystes provenant du foie et des poumons ont été prélevés. L'échantillonnage total a représenté 1196 animaux différents provenant principalement de bovins (71 %), mais aussi d'ovins (20 %), de porcins (8 %) et dans une proportion moindre de caprins (<1 %). Aucun prélèvement d'équin n'a été transmis au cours de l'année d'enquête. Les kystes reçus provenaient majoritairement du foie (92,6 %) en comparaison avec la localisation pulmonaire (12,9 %) alors que des kystes d'autres organes de la cavité abdominale étaient minoritaires (0,5 %). Le nombre total de prélèvements reçus a été conforme à celui estimé initialement (1000 prélèvements) et basé sur les faibles prévalences attendues indépendamment de l'espèce animale et de la possible confusion avec d'autres lésions. Toutefois la répartition départementale montre une grande disparité de collecte puisque 61 % des échantillons ne proviennent que de dix départements (Allier, Hautes-Alpes, Cotes d'Armor, Loire, Maine-et-Loire, Nord, Sarthe, Saône-et-Loire, Vendée, Haute-Corse), qui ne drainent pourtant que 26 % du cheptel envoyé à l'abattoir, toutes espèces confondues. La répartition géographique de l'échantillonnage chez les bovins est relativement comparable à celle des effectifs abattus, mais ce n'est pas le cas pour les ovins, où de nombreux départements ayant des effectifs abattus élevés n'ont transmis aucun échantillon (Figure 32). De même pour les caprins, même si les effectifs abattus sont faibles, seuls quatre départements ont transmis des échantillons. Pour les porcins, seuls quatre départements continentaux ont transmis des prélèvements, les deux départements de Corse constituant 87 % des effectifs échantillonnés pour cette espèce.

Au total, seuls 14 % des échantillons envoyés correspondaient à des infestations par *E. granulosus s.l.* Les analyses moléculaires ont permis d'identifier trois espèces : *E. granulosus s.s.*, *E. ortleppi* et *E. canadensis*. Des prévalences abattoir à l'échelle nationale et départementale ont pu être établies à partir des effectifs abattus. Il est à noter que ces prévalences abattoir ne constituent qu'un proxy de la prévalence du parasite sur le plan géographique, partant de l'hypothèse que les abattoirs ont principalement une zone de chalandise autour de leur implantation. La prévalence précise au plan géographique n'a pas pu être établie en l'absence de la collecte des informations sur les départements de chalandise des abattoirs. Il convient donc d'interpréter ces « prévalences géographiques » avec prudence, et comme reflétant une certaine tendance géographique. En revanche sur le plan qualitatif, la connaissance du département et de la commune d'élevage des cas identifiés grâce aux données de la base de données nationale d'identification (BDNI) gérée par la DGAL permet d'avoir une représentation de la diversité des zones infestées.

Des parasites autres qu'*E. granulosus* ont pu être identifiés car les couples d'amorces PCR utilisés pour la caractérisation moléculaire permettaient l'amplification d'un large spectre d'espèces parasitaires principalement axé sur les cestodes (cf. 3.4.2.). Ainsi, 85 cas de cysticercose à *T. hydatigena* ont été identifiés, toujours sur le foie, chez les 4 espèces hôtes (Tableau 12). Chez les ovins, les 65 cas identifiés se répartissent sur 24 départements, les abattoirs du Nord (20 ovins infectés) et de la Vienne (13 ovins, 2 bovins) ayant fait remonter le plus de cas.

Tableau 12: Nombre de cas de *T. hydatigena* par espèce animale.

Espèces animales	Effectifs abattus	Nombre de cas	Cas pour 100 000
ovins	4 300 957	65	1,5
bovins	4 816 595	10	0,2
porcins	23 834 331	8	0,03
caprins	816 995	2	0,2

Echantillonnage

Effectif abattu

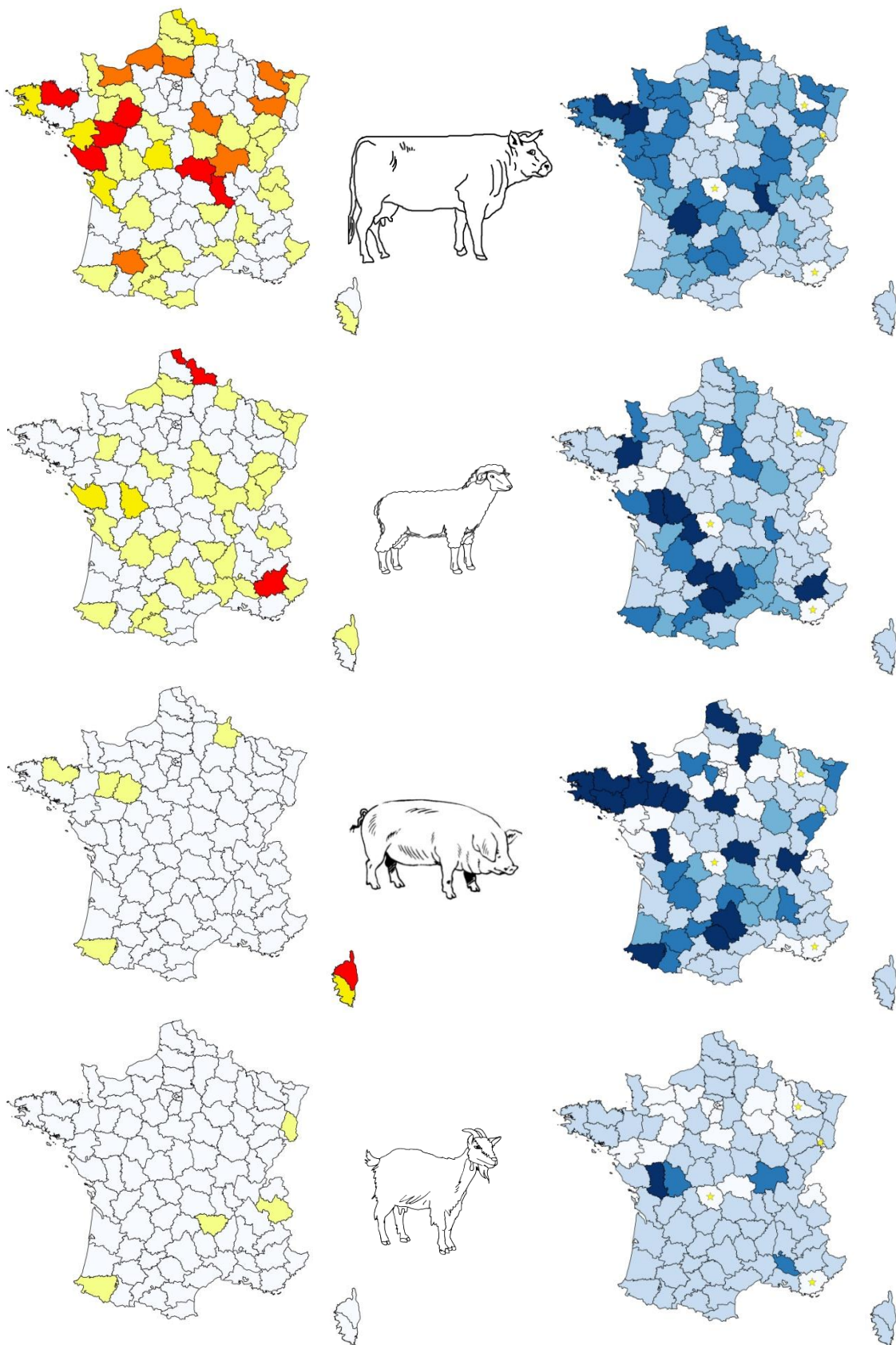


Figure 32 : Répartition par département des prélèvements et des effectifs abattus en fonction des espèces animales.

Trois cas d'infestation par *Tænia ovis* ont également été détectés sur 3 foies d'ovins abattus à Challans (Vendée) et provenant d'un même élevage. Deux cas de distomatose dus à la grande douve (*Fasciola hepatica*) ont également été détectés par biologie moléculaire et concernaient 2 bovins, abattus respectivement dans le Finistère et dans le Maine-et-Loire.

L'espèce *E. granulosus* s.s. a été mise en évidence chez les ovins, les bovins et les porcins avec une prévalence nationale en abattoir respective de 1,53, 0,83 et 0,04 cas pour 100 000 têtes abattues. Chez les ovins, seul sept départements sont concernés. La plupart des 66 cas diagnostiqués positifs ont été identifiés dans le sud-est, avec 74 % en provenance de l'abattoir de Sisteron (Alpes-de-Haute-Provence) et 14 % de celui de Carpentras (Vaucluse), les cinq autres départements (Dordogne, Haute-Garonne, Haute-Loire, Nord, Vendée) présentant chacun un à trois cas au maximum. Au vu des effectifs abattus, les prévalences abattoirs départementales varient donc de 0,8 à 3,1 cas pour 100 000, hormis pour les départements des Alpes-de-Haute-Provence, du Nord et du Vaucluse, où elles atteignent respectivement 10,4, 11,9 et 83,6 cas pour 100 000 (Tableau 13).

Tableau 13 : Nombre de cas et prévalence abattoir de l'infestation par *E. granulosus* s.s. chez les ovins au niveau départemental et national.

Départements	Effectifs abattus	Nombre de cas	Prévalence abattoir (cas pour 100 000)
Alpes-de-Haute-Provence (04)	470 810	49	10,4
Dordogne (24)	123 162	1	0,8
Haute-Garonne (31)	53 613	1	1,9
Haute-Loire (43)	31 822	1	3,1
Nord (59)	25 297	3	11,9
Vaucluse (84)	10 770	9	83,6
Vendée (85)	157 030	2	1,3
Niveau national	4 300 957	66	1,5

Plus de la moitié des ovins infestés (58 %) présentaient une double infestation foie/poumons, alors que des kystes pulmonaires exclusifs n'ont été identifiés que sur trois animaux. Des kystes fertiles ont été retrouvés dans 42 % des cas. L'analyse des données à partir des ovins trouvés infestés a permis de localiser 35 élevages, principalement dans le sud-est de la France (89 % des ovins trouvés infestés) (Figure 33). De plus, dix élevages présentaient au moins deux animaux infestés avec un maximum de sept individus infestés dans deux fermes. Des infestations ont été mises en évidence chez les bovins dans 20 départements, avec un maximum de sept cas en Saône-et-Loire. Les prévalences à l'abattoir pour ces départements s'échelonnent de 0,3 à 5,8 cas pour 100 000, excepté pour l'Ariège et le Jura où elles atteignent respectivement 10,8 et 13,2 cas pour 100 000 (Tableau 14). L'infestation chez les bovins concernait principalement le foie (83 %) avec aucune double infestation foie/poumon. En revanche, le taux de fertilité est extrêmement faible, des protoscolex n'ayant été retrouvés que chez deux animaux, soit 5 % (foie pour l'un et poumon pour l'autre). Contrairement aux ovins, les élevages infestés se répartissent de manière relativement homogène sur l'ensemble du territoire français (Figure 33). Chez les porcs, un seul cas d'infestation par *E. granulosus* s.s. a été identifié, à l'abattoir de Mauléon-Soulé dans les Pyrénées-Atlantiques, indiquant une prévalence apparente abattoir dans ce département de 0,2 cas pour 100 000. De nombreux kystes ont été retrouvés sur le foie et les poumons de cet animal mais aucun n'était fertile.

Tableau 14 : Nombre de cas et prévalence abattoir de l'infestation par *E. granulosus sensu stricto* chez les bovins au niveau départemental et national.

Départements	Effectifs abattus	Nombre de cas	Prévalence abattoir (n cas pour 100 000)
Allier (03)	117 845	4	3,4
Ariège (09)	9 285	1	10,8
Côtes-d'Armor (22)	345 889	1	0,3
Dordogne (24)	208 724	3	1,4
Finistère (29)	187 125	1	0,5
Haute-Garonne (31)	35 298	1	2,8
Gers (32)	28 221	1	3,5
Jura (39)	15 101	2	13,2
Loire (42)	229 331	2	0,9
Loire-Atlantique (44)	61 719	1	1,6
Maine-et-Loire (49)	191 607	3	1,6
Moselle (57)	134 349	3	2,2
Pas-de-Calais (62)	57 194	2	3,5
Pyrénées-Atlantiques (64)	25 528	1	3,9
Saône-et-Loire (71)	146 547	7	4,8
Sarthe (72)	144 880	2	1,4
Seine-Maritime (76)	17 231	1	5,8
Deux-Sèvres (79)	97 606	1	1,0
Vendée (85)	166 187	1	0,6
Yonne (89)	49 634	2	4,0
Niveau national	4 816 595	40	0,8

L'espèce *E. ortleppi* a été identifiée pour la première fois en France chez l'animal, et a été trouvé chez sept bovins abattus dans cinq départements. Une prévalence nationale en abattoir de 10 cas pour 100 000 bovins a pu être estimée, mais qui est localement supérieure à 20 cas pour 100 000 dans l'Ariège et le Loir-et-Cher (Tableau 15). Les kystes ont été observés uniquement sur les poumons avec un taux de fertilité élevé (86 %). Les sept cas de bovins trouvés infestés par *E. ortleppi* peuvent être regroupés en deux zones, l'une dans le centre de la France (2,1 cas pour 100 000), l'autre au niveau des Pyrénées (8 cas pour 100 000) (Figure 33).

Tableau 15 : Nombre de cas et prévalence abattoir de l'infestation par *E. ortleppi* chez les bovins au niveau départemental et national.

Départements	Effectifs abattus	Nombre de cas	Prévalence abattoir (cas pour 100 000)
Ariège (09)	9 285	2	21,5
Gers (32)	28 221	1	3,5
Indre (36)	17 501	2	11,4
Loir-et-Cher (41)	3 868	1	25,9
Vendée (85)	166 187	1	0,6
Niveau national	4 816 595	7	0,1

L'espèce *E. canadensis* (G6-7), associée classiquement en Europe à un cycle chien-porc, a été identifiée chez 68 échantillons de porcs originaires des deux départements de Corse, avec une prévalence à l'abattoir très

importante de 882 cas pour 100 000 têtes abattues, soit voisine de 1 % (Tableau 16). Il s'agit pour l'ensemble des cas d'une localisation uniquement hépatique. Le taux de fertilité des kystes est de 47 % à l'échelle de la région avec une différence importante mais toutefois non-significative entre les deux départements, avec 40 % (IC_{95%} : [27,6 ; 54,2]) en Haute-Corse et 82 % (IC_{95%} : [48,2 ; 97,7]) en Corse-du-Sud. La donnée concernant l'élevage d'origine n'étant pas toujours disponible, les localisations précises des élevages contaminés n'ont pas pu être cartographiées.

Tableau 16 : Nombre de cas et prévalence abattoir de l'infestation par *E. canadensis* chez les porcins au niveau départemental et régional

Département	Effectifs abattus	Nombre de cas	Prévalence abattoir
Corse-du-Sud (2A)	5 129	11	0,2%
Haute-Corse (2B)	2 583	57	2,2%
Niveau régional	7712	68	0,9%

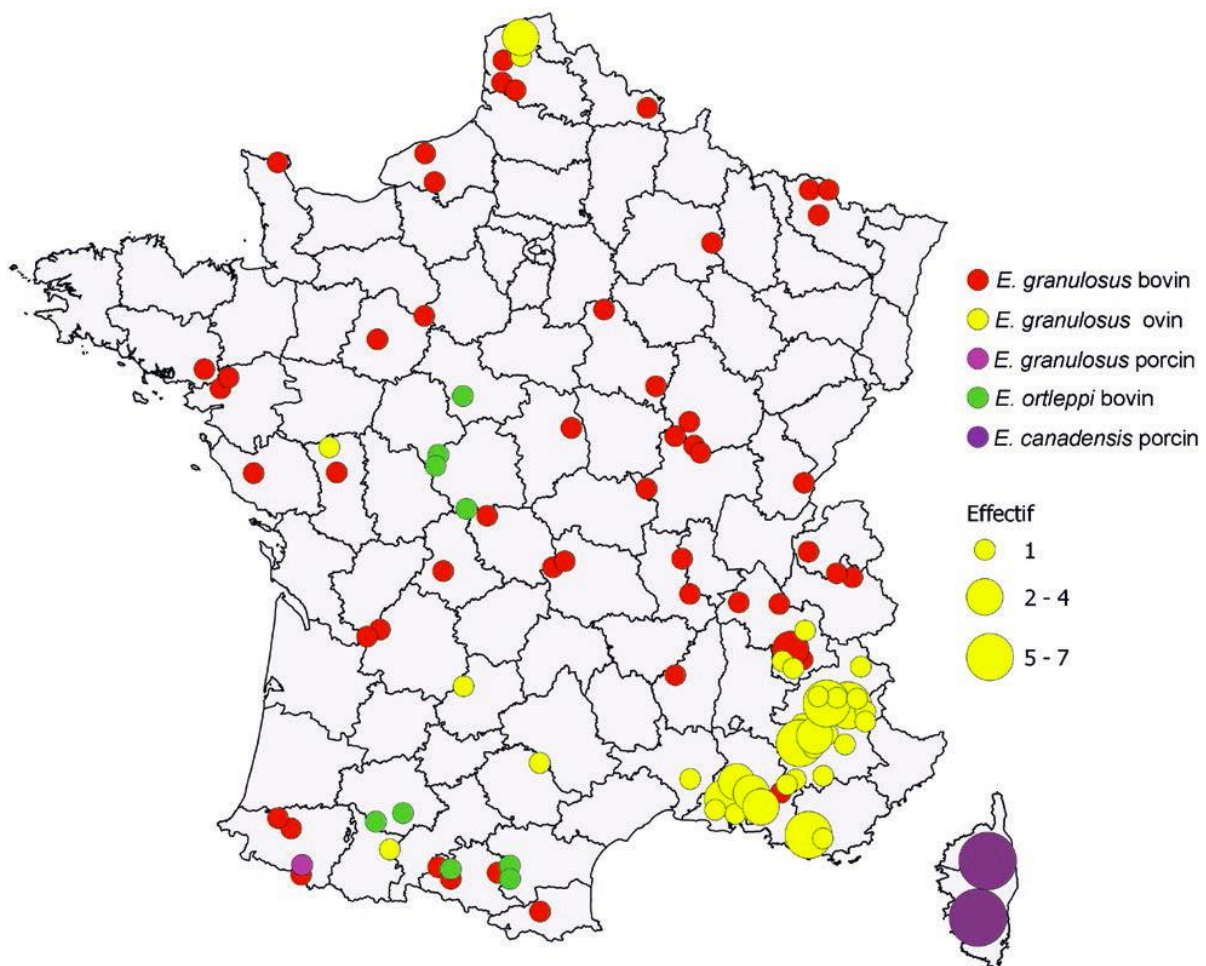


Figure 33 : Localisation des élevages infectés par *E. granulosus sensu lato* (bovins y ayant vécu au moins six mois). Concernant les cas d'infestation par *E. canadensis* porcins en Corse, seule une localisation départementale a été possible.

Discussion :

L'ancienneté de la dernière étude en abattoir à l'échelle nationale et des résultats régionaux obtenus précédemment par le LNR dans le sud et en Corse justifiaient l'organisation d'un plan national de surveillance

afin d'actualiser les zones et les niveaux de présence du parasite et d'objectiver le risque zoonotique actuel lié à ce parasite, longtemps négligé. Ce plan de surveillance de l'infestation par *E. granulosus s.l.* constitue par ailleurs une première à l'échelle européenne de par son envergure nationale et en raison de la caractérisation moléculaire systématique des échinocoques.

Les données d'étiologie obtenues ici quant à l'espèce d'appartenance des kystes confirment qu'un diagnostic de certitude sur des bases macroscopiques est difficile à réaliser à l'abattoir. En effet, en dehors des kystes pathognomoniques d'hydatidose avancée (vésicules opaques blanches à paroi ferme, nettement globuleuses renfermant un liquide sous pression) la confusion est possible entre une infection hydatique récente et d'autres infections parasitaires notamment à *T. hydatigena* ou *F. hepatica*. Les kystes caractéristiques d'hydatidose correspondent souvent à des kystes fertiles, qui indiquent un cycle parasitaire actif dans l'élevage d'origine de l'animal. Ainsi, la mise en place d'une surveillance à l'abattoir même basée uniquement sur la notification des kystes caractéristiques permettrait d'obtenir des informations épidémiologiques intéressantes à moindre coût et possiblement de détecter des foyers non identifiés jusqu'à présent. De plus, cela permettrait de répondre à l'obligation réglementaire annuelle de transmission de données à l'AESA de manière plus complète et moins ponctuelle qu'actuellement.

Cette surveillance nationale a permis de mettre en évidence *E. granulosus s.l.* chez des animaux n'ayant vécu que sur le territoire français et donc de confirmer que le parasite est toujours présent à travers la France métropolitaine. La répartition des lieux d'élevage des animaux infestés montre que l'ensemble du territoire français est concerné. De manière générale, les prévalences observées en 2012 sont très inférieures à celles observées en 1989 (Soule et al., 1989). Toutefois, il faut prendre en compte un biais de sélection des prélèvements suspects envoyés lié aux différences de sensibilisation des agents des abattoirs au plan de surveillance et de formation des inspecteurs, ainsi qu'aux variations de cadence des chaînes d'abattage. Le foyer ovin actif d'infestation par *E. granulosus s.s.* identifié dans les Alpes correspond seulement à une partie de la zone d'infestation ovine décrite en 1989 qui couvrait une zone plus large du sud de la France avec deux foyers très importants, l'un à l'est dans les Alpes (de l'Isère aux Bouches-du-Rhône) et l'autre à l'ouest dans les Pyrénées (Pyrénées-Atlantiques et Hautes-Pyrénées) (Soule et al., 1989). Ce dernier foyer ancien correspondait à des sites de transhumance intra-départementale au sein des Pyrénées, alors que la transhumance alpine est caractérisée par un brassage intense d'animaux d'origine départementale et régionale variées (Bichet and Dorchies, 1998). Cette différence de gestion des troupeaux de transhumance peut expliquer en partie la probable disparition du foyer pyrénéen et la persistance actuelle du foyer alpin. La mise en place de nouvelles mesures sanitaires semble être la principale cause de la réduction de la zone géographique du foyer alpin ainsi que la diminution de la prévalence dans cette zone.

Trois espèces différentes d'*E. granulosus s.l.* ont été identifiées, avec la première détection nationale d'*E. ortleppi* chez l'animal. L'espèce animale infestée par le stade larvaire d'*E. granulosus s.s.* est importante, car elle détermine grandement la possibilité de poursuite du cycle parasitaire selon la production ou non de protoscolex. Chez les ovins, les kystes d'*E. granulosus s.s.* observés sur foie et/ou les poumons sont le plus souvent fertiles, contribuant à la persistance du parasite, alors que les kystes chez les bovins sont rarement fertiles pour cette espèce parasitaire (Thompson, 1986). Cela s'est vérifié au cours de la présente enquête, avec un taux de fertilité des kystes de 42 % chez les ovins et de seulement 5 % chez les bovins, qui doivent alors être considérés comme des hôtes accidentels, et peuvent servir de sentinelles de la présence dans l'environnement de cette espèce parasitaire. La distribution spatiale des cas ovins, très majoritairement groupés dans le sud-est, n'est pas corrélée avec la distribution spatiale plus large des cas bovins. Les cas ovins détectés dans le département du Nord démontrent l'existence possible de cas sur d'autres zones du territoire français, et tendent à confirmer qu'en raison d'un échantillonnage ovin incomplet, des cas n'ont pas pu être mis en évidence. De plus, l'impossibilité de recenser le nombre d'ovins originaires de chaque département pénalise la compréhension de la distribution spatiale du parasite car la seule représentation par département d'abattage est faussée en raison notamment de la transhumance. Le très faible taux de fertilité des bovins pour *E. granulosus s.s.* en France ne peut expliquer à lui seul le maintien du cycle parasitaire, principalement réalisé

entre chiens et ovins. Des investigations plus approfondies sont nécessaires pour identifier les pratiques à risque dans les élevages ovins permettant le maintien du cycle parasitaire. En parallèle, des investigations sur le rôle de la transhumance alpine seraient importantes à conduire, notamment pour la connaissance du statut parasitaire des chiens conduisant les troupeaux en alpage.

La présence d'*E. ortleppi* indique la persistance d'un cycle parasitaire chien-bovin. En effet, pour cette espèce et contrairement à *E. granulosus* s.s., les bovins sont les hôtes intermédiaires majeurs du parasite. Les kystes ont une localisation exclusivement pulmonaire et un taux de fertilité généralement très important (Thompson, 1986). Six des 7 poumons des bovins infestés ici étaient effectivement fertiles et présentaient un nombre très important de protoscolex. L'ensemble des cas est distribué en 2 foyers, un dans le centre de la France qui s'étend sur 130 km et le second dans les Pyrénées qui s'étend sur près de 160 km. Le fait qu'au sein des zones de foyer certains élevages concernés par des cas soient très proches, tend à confirmer que le parasite se maintient localement par l'infestation régulière de chiens à partir des viscères de bovin. Les bovins abattus officiellement ne pouvant pas contribuer à la dynamique du cycle, la source de l'infestation canine peut s'expliquer par un déficit d'équarrissage ou bien par un abattage en dehors des structures officielles, permettant dans les deux cas l'accès du chien à des poumons infestés. En 2011, un premier cas humain d'infestation par *E. ortleppi* a été diagnostiqué par le CHU de Besançon chez un patient de 63 ans originaire du Jura (Grenouillet et al., 2014). L'année suivante un second cas a été identifié chez une patiente de 39 ans originaire de Vendée. Le diagnostic de ces cas inhabituels fut difficile en raison de l'obtention d'un résultat négatif pour *E. granulosus* en ELISA car basé uniquement sur *E. granulosus* s.s. L'accumulation de preuves par histopathologie puis finalement par PCR suite à une intervention chirurgicale a permis d'obtenir un diagnostic de certitude. Une forte proximité géographique avec des élevages de bovins a été identifiée dans les deux cas, laissant supposer l'existence d'une source locale d'infestation, même si aucun cas n'a été identifié chez des bovins à proximité. L'analyse de séquences nucléotidiques des gènes *cox1* et *atp6* a permis de démontrer une identité totale de ces séquences nucléotidiques chez les parasites d'un des deux patients avec ceux issus des sept cas bovins (Umhang et al., 2014c) alors que seule une mutation ponctuelle sur *cox1* différenciait celles-ci de celles issues du second patient. La localisation géographique des deux patients ne correspond pas du tout avec les deux foyers bovins identifiés en France, ce qui pourrait signifier l'existence d'autres foyers bovins que ceux déjà détectés. Ces deux cas humains d'infestation par *E. ortleppi* démontrent le potentiel zoonotique de cette espèce. Toutefois, il ne s'agit que des neuvième et dixième cas rapportés dans le monde. En Europe, un seul cas humain au Pays-Bas et un cas bovin en Suisse avaient été diagnostiqués depuis 1984. Si elle est très présente chez l'animal en Amérique du Sud voire en Afrique, cette espèce était considérée comme en voie d'extinction en Europe (Romig et al., 2006). La découverte de ces cas humains et bovins en France argumente en faveur d'une persistance de foyers en France. Le maintien de la surveillance en abattoir dans les deux foyers bovins en 2013 et 2014 n'a toutefois pas permis d'identifier de nouveaux cas.

La présence d'*E. canadensis* semble quant à elle spécifique à la Corse et directement liée à son mode d'élevage en parcours libre aboutissant à une prévalence élevée. Les résultats sont très similaires à ceux obtenus précédemment sur l'île (Umhang et al., 2014f). Le taux de fertilité observé en Corse-du-Sud est deux fois plus élevé qu'en Haute-Corse (différence non significative), alors que la prévalence y est à l'inverse 10 fois plus faible. Ces différences contradictoires pourraient s'expliquer par un biais d'échantillonnage, notamment du fait que les kystes non fertiles sont généralement moins développés et peuvent ne pas être vus à l'inspection. Alors que les porcs représentent 70 % des effectifs d'animaux de boucherie abattus en France, aucun cas d'infestation par *E. canadensis* n'a été diagnostiqué en France continentale. L'absence supposée de ce parasite s'explique le plus vraisemblablement par le type d'élevage hors-sol pratiqué majoritairement sur le continent. L'existence d'un cycle chiens-porcs ne semble pas avérée en dehors de la Corse. Toutefois, comme précisé plus haut, vu le faible nombre d'échantillons porcins envoyés par les abattoirs de France continentale, cette absence de cas devra être confirmée notamment par une surveillance des élevages porcins en système extensif.

La mise en place d'une surveillance nationale de l'hydatidose à l'abattoir a permis d'actualiser les données d'infestation observées à l'abattoir pour les différentes espèces d'hôtes intermédiaires domestiques. Afin de pouvoir établir des comparaisons avec des données plus anciennes pour lesquelles la distinction taxonomique parasitaire n'était pas réalisable, il est nécessaire de cumuler les prévalences pour les trois différentes espèces d'*E. granulosus* observées (Tableau 17).

Tableau 17: Prévalences abattoir d'*E. granulosus s.l.* à l'échelle nationale (en cas pour 100 000) en fonction des espèces animales.

Complexe d'espèces ou espèces	<i>E. granulosus sensu stricto</i>	<i>E. ortleppi</i>	<i>E. canadensis</i>	<i>E. granulosus s.l.</i>	<i>E. granulosus s.l.</i> en 1989
bovins	0,83	0,1	-	0,94	130
ovins	1,53	-	-	1,53	420
porcins	0,004	-	0,29	0,29	9

*En 1989, les cas ovins et caprins étaient fusionnés pour aboutir à une seule valeur de prévalence.

Les prévalences observées en 2012 sont concordantes avec celles estimées en 2009-2010 : 4 cas pour 100 000 chez les ovins et 3 cas pour 100 000 chez les bovins dans le Sud et 5,4 % chez les porcs en Corse (Umhang et al., 2013c; Umhang et al., 2014f). En revanche, elles sont très inférieures à celles observées en 1989 (Soule et al., 1989) : 130 fois pour les bovins, 270 fois pour les ovins et 30 fois pour les porcins. A noter de plus qu'en 1989 ovins et caprins étaient regroupés, or aucun cas sur caprins n'a été recensé ici. Nous pouvons donc penser que la diminution de la prévalence ovine est encore plus importante que celle observée. Pour les porcins, aucune donnée n'avait été obtenue en Corse en 1989 ; aussi, si nous excluons les cas corses du plan de surveillance 2012, seul un cas porcine a été identifié. Cette nette diminution des prévalences en France peut s'expliquer par l'amélioration de l'état sanitaire global des élevages au cours des 20 dernières années (Seimenis, 2003), permettant de fait aussi des avancées dans le contrôle d'*E. granulosus* en France.

Aucun foyer important d'infestation de bovins par *E. granulosus sensu stricto* n'a été mis en évidence lors de cette surveillance 2012. Or en 1989, les bovins infestés se répartissaient, en plus des départements concernés par la zone d'infestation ovine du sud, majoritairement dans les départements d'élevage à forte prédominance bovine, dans l'ouest et dans le nord (Soule et al., 1989). Les 2 foyers d'*E. ortleppi* identifiés ici ne correspondent pas à ces zones d'infection bovine précédemment identifiés.

L'acquisition de toutes ces données sur la présence d'*E. granulosus s.l.* chez l'animal en France interpelle sur le risque zoonotique associé. En effet, si par le passé les cas humains étaient certainement sous-estimés et considérés comme importés et non autochtones, la présence toujours actuelle de foyers actifs chez les animaux de rente et leur large répartition spatiale soulèvent la question de l'existence probable de cas d'échinococcose kystique humains autochtones en France. Ces données récentes devraient permettre d'identifier les liens épidémiologiques entre les cas humains et l'infestation chez l'animal et d'évaluer l'impact zoonotique réel d'*E. granulosus s.l.* en France.

6.2. Situations d'hyper-endémie

Dans le cadre de collaborations internationales, le LNR a mis à disposition ses infrastructures et son expertise pour étudier des situations d'hyper-endémie en Moldavie, au Maroc et en Algérie.

6.2.1. En Europe : la République de Moldavie

Umhang G., Chihai O., **Boué F.** Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in a hyperendemic European focus, the Republic of Moldova. *Parasitology Research*, 2014, 113 (12), 4371-4376.

Chihai O., **Umhang G.**, Erhan D., Boué F., Talambuta N., Rusu S., Zamornea M. Slaughterhouse survey of cystic echinococcosis in cattle and sheep from the Republic of Moldova. *Journal of Helminthology*, 2016, 90 (3), 279-283.

Introduction :

En 2011, le LNR initia une collaboration avec l'institut de zoologie de l'académie des Sciences de la République de Moldavie afin d'améliorer les connaissances relatives à l'épidémiologie de l'hydatidose, considérée comme un problème de santé publique prioritaire dans ce pays. La première mention publiée de la maladie chez l'Homme y avait été faite dans le cadre de la recension de 448 cas humains dès la période 1946-1954 (Covaly, 1960; Logvinsky, 1952), laissant supposer une situation de forte endémie de l'hydatidose. Les études récentes décrivent une incidence comprise entre 4,3 et 4,7 cas pour 100 000 habitants (Lungu, 2012; Prisacari and Lungu, 2014). La majorité (90 %) des patients infestés vivent en zone rurale, qui représente 73 % du territoire d'après la FAO. Concernant l'infestation des animaux de rente, durant la période 1986-1990, la prévalence dans des districts du sud du pays était de 72,6 % chez les ovins, 49,1 % chez les bovins et de 18,2 % chez les porcins (Bondari, 1992). Ces données de prévalence chez les animaux de rente avaient été obtenues uniquement par diagnostic macroscopique à l'abattoir et aucune donnée moléculaire n'était disponible. Le premier objectif de la collaboration était de bénéficier de l'expertise du LNR en biologie moléculaire pour la caractérisation moléculaire d'*E. granulosus s.l.* afin d'identifier les espèces parasitaires concernées et ainsi en déduire les cycles parasitaires impliqués (Umhang, Chihai, and Boue, 2014a). Ensuite, il s'agissait de produire des données récentes de prévalence de l'hydatidose pour les espèces animales concernées (Chihai et al., 2016).

Matériel et méthodes :

Les espèces animales concernées étaient les ovins, bovins et porcins. Les échantillons d'*E. granulosus s.l.* nécessaires à la caractérisation moléculaire ont été collectés en 2011 dans deux abattoirs au centre du pays : ceux de la ville d'Orhei et de la capitale Chisinau. L'étude de prévalence a été réalisée de janvier à décembre 2012 mais uniquement dans l'abattoir d'Orhei pour des raisons logistiques. Tous les ovins et bovins abattus durant cette période ont été inclus dans l'enquête. Les animaux provenaient de fermes collectives rattachées au service public ainsi que de fermes du secteur privé, alors que les porcins provenaient tous de complexes industriels pratiquant l'élevage intensif. Les fermes collectives pratiquent l'élevage intensif d'environ une centaine d'animaux, toujours d'une seule espèce. Au contraire, dans le secteur privé, l'élevage extensif est pratiqué, avec des effectifs d'animaux plus réduits et un mélange de plusieurs espèces.

Le diagnostic de la présence de kystes hydatiques a été réalisé lors de l'inspection sanitaire. Les carcasses et organes internes (foie et poumons principalement) des animaux abattus ont été examinés par inspection visuelle et palpation. La fertilité des kystes a été déterminée par la présence de protoscolex dans le liquide hydatique. Pour la caractérisation moléculaire, les kystes ont été congelés pour envoi au LNR afin d'être analysés selon le protocole mis en place au laboratoire (encart n°2), si ce n'est qu'en complément de *cox1* le séquençage du gène *nad3* a été réalisé à la place de celui de *nad1*, car considéré comme plus polymorphe. Un réseau d'haplotypes mitochondriaux basé sur les séquences concaténées des deux gènes *cox1+nad3* (701 pb) a été réalisé à l'aide du logiciel TCS (Clement, Posada, and Crandall, 2000) pour évaluer la relation entre les différents haplotypes présents.

Concernant l'étude de prévalence, un échantillon de 100 foies infestés et de 100 poumons infestés provenant de bovins et d'ovins a été utilisé pour évaluer le niveau d'infestation reflété par la proportion de l'organe qui est infestée par des kystes parasitaires. L'index a été considéré comme faible si un quart ou moins de l'organe était infesté par des kystes hydatiques, modéré si un quart à la moitié de l'organe était affecté et fort si plus de la moitié de l'organe était concernée. Une étude de morphométrie a été réalisée à l'institut de Zoologie de Chisinau par un examen macroscopique et microscopique des organes infestés. Un échantillon de 332 kystes

dont 189 issus de bovins (129 à localisation hépatique et 60 à localisation pulmonaire) et 143 issus d'ovins (102 kystes hépatiques et 41 pulmonaires) a été prélevé. Le diamètre des kystes a été mesuré pour être réparti en trois catégories : petit (<2 cm), moyen (2 à 5 cm) et gros (>5 cm). L'âge des animaux a été obtenu auprès des registres des abattoirs.

Résultats :

Caractérisation moléculaire :

Au total, 71 kystes hydatiques ont été analysés (à raison d'un par organe infesté) provenant de 33 ovins et de 15 bovins. *E. granulosus s.s.* a été systématiquement identifié pour tous les échantillons. Le taux de fertilité était de 40% pour les ovins et de 20% pour les bovins, alors qu'aucune relation significative entre l'organe infesté et la fertilité n'a été mise en évidence (26 % pour le foie contre 43 % pour les poumons). Pour cinq échantillons, des séquences n'ont pu être obtenues que pour l'un des deux gènes. Les analyses de séquences ont permis d'identifier 13 haplotypes pour le gène *cox1* et 13 pour *nad3*. La concaténation des séquences des deux gènes a abouti à 23 haplotypes différents avec 21 points de mutations observés. Les haplotypes H1 et H13 étaient les deux plus représentés avec respectivement 30,3 % et 13,6 % des échantillons. A l'inverse, 14 haplotypes (21,2 %) n'étaient représentés que par un seul échantillon, alors que les autres haplotypes rassemblaient au moins deux échantillons provenant d'au moins deux animaux différents. Huit haplotypes ont été identifiés chez les bovins et 21 pour les ovins, dont 6 sont retrouvés chez les deux espèces. Concernant les infestations à localisation hépatique et pulmonaire pour un même animal, la présence de deux haplotypes différents a été observée pour 17 des 21 ovins et pour les deux bovins concernés. Le réseau d'haplotypes mitochondriaux présente une structure complexe avec les haplotypes H1 et H13 formant chacun le centre de deux configurations en étoile connectées entre elles (Figure 34).

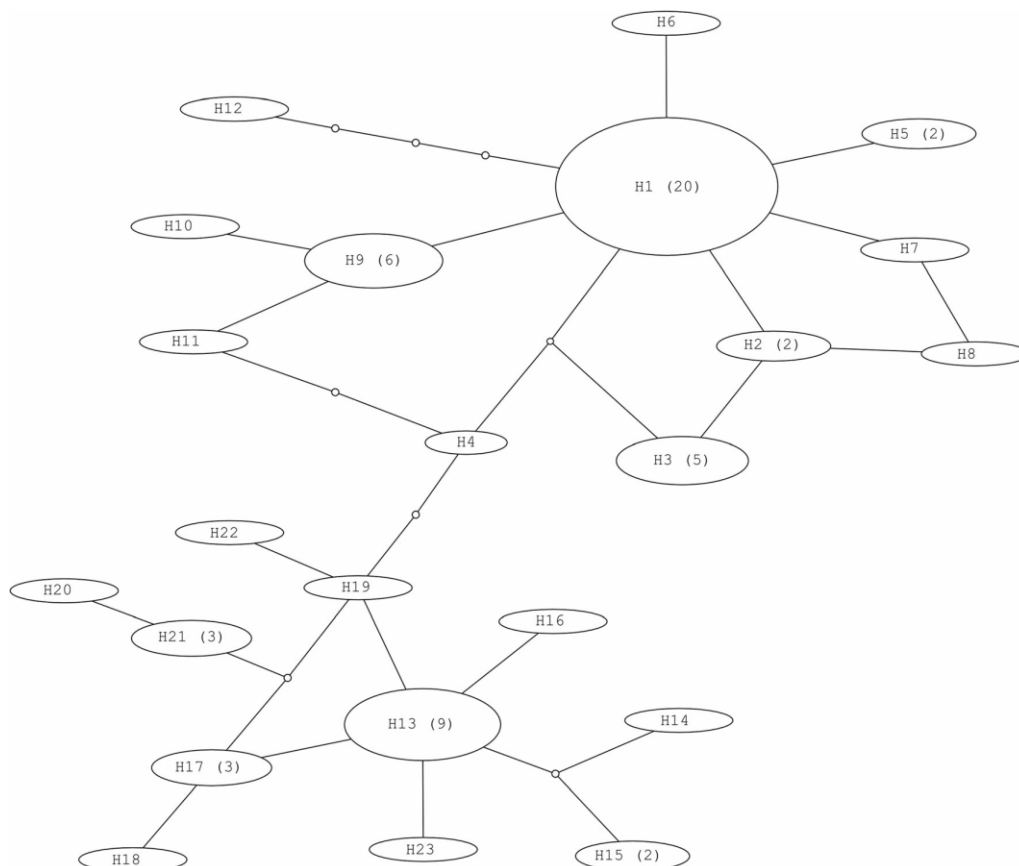


Figure 34 : Réseau d'haplotypes mitochondriaux (*cox1+nad3*) obtenus à partir de 66 échantillons d'*E. granulosus s.s.* La taille des cercles indique approximativement le nombre d'individus (indiqué entre parenthèses lorsque différent de 1) et chaque mutation est représentée par une ligne et un point blanc.

Etude de prévalence :

Au total, 1525 bovins, 5580 ovins et 12700 porcins ont été concernés par la surveillance d'*E. granulosus* à l'abattoir d'Orhei en 2012. Aucun cas d'infestation n'a été observé chez les porcins alors qu'une prévalence de 59,3 % chez les bovins et de 61,9 % chez les ovins a été obtenue (Tableau 18). La fréquence d'infestation augmente avec l'âge pour les deux espèces animales (Tableau 19). La prévalence chez les ovins et bovins âgés de plus de cinq ans est significativement supérieure à celle des animaux dont l'âge est compris entre 2 et 5 ans et celle des animaux de moins de 2 ans ($P < 0,001$). Une double infestation hépatique et pulmonaire a été observée chez 51,8 % des ovins et 51,2 % des bovins. La localisation exclusivement hépatique (41,6 % chez les ovins et 36,9 % chez les bovins) des infestations était plus fréquente que la localisation exclusivement pulmonaire (11,9 % chez les ovins et 6,6 % chez les bovins).

Tableau 18 : Prévalence de l'infestation par *E. granulosus* chez les bovins et les ovins en fonction du type d'élevage. N correspond au nombre d'animaux examinés et CI à l'intervalle de confiance à 95 %.

Host species	N	Global		Private households		Collective farms	
		%	CI	%	CI	%	CI
Cattle	1525	59.3	56.8–61.8	65.5	62.8–68.1*	25.0	19.7–31.2
Sheep	5580	61.9	60.6–63.2	80.0	78.4–81.5*	45.0	43.2–46.8

*Correspond to a chi-square test with a P value < 0.01 .

Tableau 19 : Prévalence de l'infestation par *E. granulosus* en fonction de l'âge pour les 1525 bovins et 5580 ovins. N correspond au nombre d'animaux examinés et IC à l'intervalle de confiance à 95 %.

Host species	Host age								
	<2 years			2–5 years			>5 years		
	N	%	CI	N	%	CI	N	%	CI
Cattle	76	9.2	4.1–18.6	564	38.5	34.5–42.7	885	67.6	64.4–70.6
Sheep	152	15.1	10.0–22.1	2090	71.0	69.0–72.9	3338	86.0	84.8–87.2

Les animaux élevés dans les fermes privées étaient significativement plus fréquemment infestés que ceux des fermes collectives ($P < 0,001$) (Tableau 20). Dans les fermes du secteur public, une tendance à la diminution de la prévalence a été observée parallèlement à l'augmentation du niveau de l'index d'infestation (Tableau 20). Par contre, dans les fermes privées la prévalence augmente, à l'exception des infestations pulmonaires des bovins. Le niveau d'infestation était généralement supérieur dans les fermes privées.

Tableau 20 : Prévalence de l'infestation par *E. granulosus* selon la localisation hépatique ou pulmonaire chez les ovins et les bovins en fonction du type d'élevage. N correspond au nombre d'animaux examinés.

Host species	Type of breeding	Liver				Lungs			
		N	Low	Moderate	Severe	N	Low	Moderate	Severe
Sheep	Collective farms	43	37.2	48.8	14.0	19	47.4	31.6	21.1
	Private households	57	7.0	24.6	68.4	81	12.4	38.3	49.4
Cattle	Collective farms	21	81.0	14.3	4.8	32	68.8	21.9	9.4
	Private households	79	13.9	29.1	57.0	68	51.5	29.4	19.1

La majorité des kystes hydatiques avaient un diamètre inférieur à 2 cm quel que soit le type d'organe ou l'espèce animale concernée (Tableau 21). Les kystes de plus de 5 cm de diamètre étaient peu fréquents. Le taux de fertilité chez les bovins était de 1,1 % avec des protoscolex retrouvés uniquement dans les kystes de deux animaux. Chez les ovins, le taux de fertilité était plus bien plus élevé (47,6 %) avec des taux similaires quel que soit l'organe infesté.

Tableau 21 : Prévalence de l'infestation par *E. granulosus* chez les ovins et les bovins en fonction de la taille des kystes. Le nombre d'organes examinés est indiqué entre parenthèses.

Cyst size (cm)	Cattle		Sheep	
	Liver %	Lungs %	Liver %	Lungs %
<2	56.6 (73)	85.0 (51)	53.9 (55)	68.3 (28)
2–5	34.9 (45)	15.0 (9)	42.2 (43)	26.8 (11)
>5	8.5 (11)	0 (0)	3.9 (4)	4.9 (2)
Total	100 (129)	100 (60)	100 (102)	100 (41)

Discussion :

Si la lutte contre l'hydatidose constitue une priorité de santé publique en Moldavie, peu de données étaient disponibles sur le plan épidémiologique chez les animaux de production. De plus, cela concernait principalement les bovins alors qu'ils représentent des hôtes intermédiaires compétents uniquement pour *E. ortleppi*, dont la présence en Europe est très rare (Grenouillet et al., 2014; Romig et al., 1999). Ainsi, la collaboration avec le LNR avait pour but d'étoffer les données disponibles sur la présence du parasite chez l'animal en identifiant les espèces parasitaires et animales impliquées dans le maintien du cycle, mais aussi de disposer d'une estimation de la prévalence. La situation d'hyper-endémie du pays vis-à-vis d'*E. granulosus* a été confirmée, compte tenu des très fortes prévalences obtenues chez les ovins et les bovins, nettement supérieures à celle décrites par ailleurs en Europe, généralement inférieures à 10 % (Cardona and Carmena, 2013). L'identification d'*E. granulosus s.s.* comme seule espèce responsable des infestations permet de statuer sur l'existence d'un cycle chien-ovin responsable du maintien du parasite. Si des haplotypes correspondant aux génotypes G1 et G3 ont été identifiés, certains haplotypes appartenant à l'un des deux génotypes (selon la position de trois mutations sur le gène *cox1*, voir 2.3.2.1) sont génétiquement plus proches de l'autre génotype. La réalisation de cette première caractérisation moléculaire en Moldavie confirme aussi le rôle insignifiant des bovins car présentant un taux de fertilité très faible comme cela est systématiquement observé en Europe (Cardona and Carmena, 2013). L'absence de cas chez les porcins peut apparaître plus surprenante car ils sont sensibles à *E. granulosus s.s.* et peuvent développer des kystes fertiles. L'origine exclusivement intensive des porcs examinés dans cette étude explique très certainement cette absence de cas d'infestation. Par contre, l'élevage extensif de porcs en extérieur est également pratiqué pouvant laisser supposer des risques d'infestation. L'échantillonnage de ce type d'animaux pourrait conduire à la détection d'*E. canadensis* (G6-7), dont les porcs sont les hôtes intermédiaires principaux. Cela est d'autant plus probable que cette espèce parasitaire a été identifiée chez les porcs en Roumanie (Bart et al., 2006b; Neghina et al., 2010), pays frontalier de la Moldavie.

L'appartenance des élevages au secteur public ou privé est un élément essentiel dans l'épidémiologie d'*E. granulosus s.s.* en Moldavie. L'élevage intensif pratiqué dans le secteur public aboutit à une réduction de l'exposition au parasite, alors que dans le secteur privé le pâturage et l'élevage en plein air sont majoritairement pratiqués. De plus, dans les fermes collectives, l'abattage est réalisé sous contrôle vétérinaire alors que dans les fermes privées l'abattage est généralement pratiqué à la ferme. Les viscères sont alors enterrés ou donnés au chien comme le veut une tradition très répandue, ce qui contribue à perpétuer le cycle parasitaire, particulièrement avec la situation de surabondance de chiens errants ou divagants. La chute de l'URSS a permis à la Moldavie d'acquiescer son indépendance en 1991. La proportion des animaux élevés dans le secteur public et privé s'est complètement inversée dans les dix années qui ont suivi, avec actuellement 95 % des animaux dans le secteur privé. On peut ainsi supposer que la prévalence de l'infestation par *E. granulosus s.s.* en Moldavie a probablement augmenté depuis les 20 dernières années et qu'elle est actuellement encore sous-estimée car basée uniquement sur la minorité des animaux passant à l'abattoir. L'observation

d'haplotypes très proches suggère des populations non différenciées et coïncide avec l'hypothèse d'une augmentation récente de la prévalence. La présence de nombreuses fermes privées tout autour des fermes collectives peut aussi expliquer la présence du parasite dans ces structures malgré l'application de mesures de contrôle sanitaire.

Malheureusement, nous n'avons pas pu obtenir le détail des informations concernant les animaux concernés par l'analyse macroscopique des kystes : proportion de l'organe infesté et taille (en cm) des kystes. L'absence de ces informations est d'autant plus frustrante que cela empêche de répondre à certaines questions rarement étudiées telles que l'influence de l'âge de l'animal sur la taille des kystes. Toutefois, la forte proportion de l'organe infesté par des kystes parasites observée dans le secteur privé correspond à des infestations massives qui résultent probablement d'évènements successifs d'infestations. La preuve moléculaire d'infestations par deux haplotypes sur le même organe ou deux organes différents issus du même animal, observées dans cette étude, avait déjà été décrite précédemment chez les ovins et bovins (Boufana et al., 2014; Casulli et al., 2012; Umhang et al., 2013c). Cependant, l'échantillonnage et l'analyse moléculaire de plusieurs échantillons de kystes hydatiques issus d'un même animal et encore plus d'un même organe infesté sont rarement réalisés. La disponibilité d'un outil moléculaire plus discriminant devrait permettre de pouvoir explorer plus en détail cette origine des kystes afin d'en déduire des fréquences d'évènements d'infestation.

La très forte prévalence de l'infestation par *E. granulosus* s.s. observée chez les ovins et les bovins suggère une forte contamination environnementale pouvant expliquer les fortes incidences de cas humains décrites, dont le nombre augmente de près de 5 % chaque année (Erhan, 2010). Les pratiques d'élevage et plus particulièrement celles du secteur privé très largement majoritaire expliquent le maintien du cycle parasite et probablement l'augmentation de la prévalence depuis le début des années 1990. Si *E. granulosus* s.s. est actuellement la seule espèce du complexe décrite dans le pays, la présence d'*E. canadensis* (G6-7) chez le porc peut-être fortement soupçonnée. Cette espèce ayant un impact zoonotique non négligeable (Alvarez Rojas et al., 2014), elle doit constituer l'une des cibles des futures enquêtes épidémiologiques, afin de disposer des informations épidémiologiques nécessaires à l'amélioration du niveau sanitaire vis-à-vis de cette parasitose.

6.2.2. En Afrique du Nord : Algérie et Maroc

El Berbri I., Petavy AF., **Umhang G.**, Bouslikhane M., Fassi Fihri O., Boué F., Dakkak A. Epidemiological investigations on cystic echinococcosis in North-West (Sidi Kacem Province) Morocco: Infection in ruminants. *Advances in Epidemiology*, 2015, Article ID 104025, 1-9.

Zait H., Kouidri M., Grenouillet FE., **Umhang G.**, Millon L., Hamrioui B., Grenouillet F. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus sensu stricto* and *Echinococcus canadensis* in humans and livestock from Algeria. *Parasitological Research*, 2016, 115(6):2423-2431.

Introduction :

L'échinococcose kystique est présente à un niveau fortement endémique dans tous les pays de l'Afrique du Nord qui constituent le Maghreb : Algérie, Maroc, Tunisie et Libye (Dakkak, 2010). Cette zoonose y constitue à la fois un problème majeur de santé publique et un problème économique majeur. Plusieurs facteurs environnementaux et socioculturels ont été décrits comme associés à un fort risque zoonotique : l'existence de communautés de bergers en zone rurale, l'absence d'inspection sanitaire en abattoir, le nourrissage des chiens avec les viscères des animaux de rente, la mauvaise élimination des carcasses, le nombre élevé de chiens errants ou divagants et la faible connaissance de la maladie par le public (Carmena and Cardona, 2013). Dans ce contexte d'hyper endémie, le LNR a collaboré avec l'Algérie *via* le CNR de Besançon et avec le Maroc dans le cadre du projet ICONZ (Integrated Control of Neglected Zoonoses) financé par le 7ème Programme Cadre de Recherche et Développement. La prévalence chez les hôtes intermédiaires en Algérie est comprise entre 8 et 26 % chez les dromadaires, 5 à 26 % chez les bovins, 4 à 22 % chez les ovins, 2 à 11 % chez les chèvres et 6 % chez les chevaux d'après les précédentes études réalisées (Bardonnet et al., 2003; Hamrat et al., 2011; Kouidri et al., 2012; Kouidri et al., 2013; Ouchene et al., 2014). Au Maroc, la prévalence d'infestation par *E. granulosus*

s.l. atteint 49 % chez les bovins, 32 % chez les ovins, 2 % chez les chèvres, 11 % chez les dromadaires et 8 % chez les équidés (Azlaf and Dakkak, 2006; Azlaf et al., 2007; Dakkak, 2010; Pandey, Ouhelli, and Ouchtou, 1986). Les cas humains sont nombreux, 1627 en 2012 au Maroc (soit 5,2 cas pour 100 000 habitants), et estimés à plus de 700 en Algérie alors qu'aucun système d'enregistrement n'est disponible. L'étude réalisée au Maroc avait pour but de fournir des données de prévalence ainsi que de caractérisation moléculaire du parasite chez les animaux de rente à l'abattoir dans la province de Sidi Kacem, considérée comme fortement endémique mais pour laquelle aucune donnée n'était disponible. En Algérie, l'étude menée a consisté à réaliser la caractérisation moléculaire des espèces d'*E. granulosus s.l.*, principalement chez l'Homme.

Matériel et méthodes :

La province marocaine de Sidi Kacem (3095 km²) située au nord-ouest du pays est une zone agricole regroupant 1,6 % de la population du Maroc. Elle comporte 10 abattoirs, dans lesquels la présence de kystes hydatiques chez les ruminants notifiée pendant 4 ans (avril 2009 à mars 2013) a été utilisée pour les besoins de l'étude. Un total de 2090 animaux (652 bovins, 1302 ovins et 136 caprins) a été examiné visuellement et par palpation pour détecter la présence de kystes hydatiques. La fertilité a été déterminée pour 1272 kystes sélectionnés aléatoirement sur les poumons et le foie de bovins (913 kystes) et d'ovins (359 kystes). En parallèle, 114 kystes sélectionnés aléatoirement ont été prélevés à l'aide de papier FTA (cf. encart 4) afin de déterminer l'espèce d'*E. granulosus s.l.* concernée à partir du séquençage partiel du gène *cox1* réalisé au LNR comme décrit précédemment (Umhang et al., 2013c).

Des kystes hydatiques issus de 54 patients algériens provenant principalement du foie et des poumons mais aussi de localisations plus atypiques (os, maxillaire, rate, cœur et diaphragme) ont été collectés. Ces échantillons provenaient de 31 adultes et de 23 enfants. En parallèle, 16 kystes provenant d'ovins (n=7), de bovins (n=4), de caprins (n=3) et de dromadaires (n=2) ont été ajoutés. L'ADN de l'ensemble de ces échantillons a été extrait afin de pouvoir réaliser l'amplification partielle des gènes *cox1* et *nad1* (Bart et al., 2006b) au CHU de Besançon. En cas d'absence de résultats d'amplification pour le gène *nad1* avec les amorces optimisées pour *E. granulosus s.s.*, les amorces originellement décrites par Bowles et McManus (Bowles and McManus, 1993) ont été utilisées. Un réseau d'haplotypes mitochondriaux basé sur les séquences concaténées des deux gènes *cox1+nad1* (884 pb) a été réalisé par le LNR à l'aide du logiciel TCS (Clement et al., 2000) pour évaluer la relation entre les différents haplotypes présents.

Résultats :

Pour la période couvrant les quatre années de surveillance, la prévalence d'*E. granulosus* aux abattoirs de Sidi Kacem a été de 11,0 % (IC_{95%} : [9,4-12,8]) chez les ovins, 42,9 % (IC_{95%} : [39,2-47,6]) chez les bovins, et de 1,5 % (IC_{95%} : [0,4-5,2]) chez les caprins. Une nette augmentation des taux de prévalence a pu être mise en évidence chez les bovins et les ovins (p<0,001). La fertilité des kystes étaient légèrement supérieure chez les ovins en comparaison des bovins, alors que les kystes des deux seuls chèvres infestées étaient calcifiés ou stériles. Les analyses moléculaires ont permis de déterminer que seule l'espèce *E. granulosus s.s.* était responsable des infestations des animaux de rente examinés dans le contexte de cette étude.

En Algérie, l'examen des kystes hydatiques provenant des bovins, ovins et caprins a abouti à l'identification de la même espèce parasitaire : *E. granulosus s.s.* A l'exception d'une chèvre et d'un bovin, le même haplotype pour les gènes *cox1* et le *nad1* a été mis en évidence. Cependant, l'espèce *E. canadensis* (G6-7) a été identifiée dans les deux échantillons de kystes fertiles issus de dromadaires, avec le même haplotype pour le gène *cox1* mais deux haplotypes différents pour *nad1*. Cette même espèce s'est également révélée être à l'origine d'une infestation fertile chez une patiente touareg de 60 ans vivant dans la région désertique de Tamanrasset au sud de l'Algérie. En revanche, l'ensemble des 53 autres échantillons d'origine humaine, correspondait à l'espèce parasitaire *E. granulosus s.s.* Parmi ces échantillons d'*E. granulosus s.s.* identifiés chez l'Homme et l'animal, 10 haplotypes pour chacun des deux gènes ont été obtenus avec à chaque fois un haplotype dominant représentant 76 % des échantillons humains et correspondant à ce qui était considéré comme le génotype G1. Au total, le taux de fertilité des kystes d'*E. granulosus s.s.* chez l'Homme était de 93,6 %.

Encart 4 : Utilisation du papier FTA pour l'échantillonnage du stade larvaire d'*E. granulosus s.l.* en vue d'analyses moléculaires

Boué F., El Berbri I., Hormaz V., Boucher J.-M., Bezeid A., Traore A., Petavy AF., Dakkak A., **Umhang G.** Use of FTA card methodology for sampling and molecular characterization of *Echinococcus granulosus sensu lato* in Africa. *Experimental Parasitology*, 2017, 173, 29-33.

E. granulosus s.l. est hyper-endémique et enzootique en Afrique, cependant peu de données moléculaires sont disponibles. Le diagnostic se limite généralement à l'observation macroscopique de kystes hydatiques sur les animaux de rente à l'abattoir. Cependant si la spécificité de ce type d'analyse est variable dès lors qu'il s'agit de kystes non caractéristiques, la distinction au niveau de l'espèce dans le complexe *E. granulosus s.l.* ne peut être réalisée qu'avec des méthodes de biologie moléculaire. Or, si *E. granulosus s.s.* et *E. canadensis* (G6-7) sont présents de façon majoritaire en Afrique, *E. ortleppi* et *E. felidis* sont aussi décrits dans la faune sauvage. Cette absence de données est liée à la difficulté de réalisation, de conservation et de transport de prélèvements dans un climat généralement chaud et humide, ainsi qu'à l'absence de laboratoires de biologie moléculaire à proximité. Dans ce contexte, l'utilisation de la carte FTA est apparue comme une alternative pertinente car permettant de conserver les acides nucléiques à température ambiante pendant des années sur un papier buvard. Ces cartes FTA avaient déjà été utilisées avec succès pour des bactéries et des virus mais étaient quasiment ignorées pour les parasites. Dans le cadre d'une collaboration avec plusieurs pays africains, le LNR a mis en place une étude de validation de cette méthode d'échantillonnage en laboratoire puis sur des prélèvements réalisés à l'abattoir en Afrique sur des ovins, bovins, caprins et chameaux.

Soixante-seize prélèvements de kystes parasites à localisations hépatique ou pulmonaire, provenant d'animaux de rente (ovin, bovin, porcin) ou d'espèces sauvages (rat musqué, ragondin, sanglier) ont été échantillonnés au laboratoire à l'aide des cartes FTA. Tous ces kystes avaient déjà été diagnostiqués au préalable par le LNR à l'aide de l'analyse d'une portion du gène *cox1* (encart n°2). Les prélèvements sur la carte FTA ont été réalisés en imprégnant le papier pendant 20 secondes sur la membrane interne du kyste après incision au scalpel, puis en laissant sécher 24 heures à température ambiante. Dans les abattoirs au Maroc, au Mali et en Mauritanie, 217 kystes d'animaux de rente ont été échantillonnés avec cette méthode. Une surface d'environ 1 cm² de papier FTA a été prélevée et découpée en plus petits morceaux pour réaliser une extraction d'ADN. Une PCR amplifiant une partie du gène *cox1* (encart n°2) a été réalisée pour identifier l'espèce parasitaire impliquée après séquençage.

Un résultat conforme à celui attendu a été obtenu pour l'ensemble des 76 échantillons réalisés au laboratoire, permettant l'identification d'espèces au sein des deux genres *Echinococcus* et *Taenia*. 80 % des échantillons prélevés à l'abattoir ont permis d'obtenir un résultat (Tableau 22). Cela a permis la première caractérisation moléculaire d'*E. granulosus s.l.* au Maroc avec l'identification d'*E. granulosus s.s.* Au Mali, seuls *T. hydatigena* et *F. gigantica* ont pu être identifiées avec un taux de succès du diagnostic de seulement 69 %. En Mauritanie, seuls des chameaux ont été échantillonnés, aboutissant à l'identification d'*E. canadensis* G6-7 à partir de 44 % des prélèvements seulement.

Tableau 22 : Résultats des diagnostics par PCR à partir des échantillons prélevés sur papier FTA en abattoir.

Pays	Espèce hôte	<i>E. canadensis</i> (G6-7)	<i>E. granulosus</i> <i>sensu stricto</i>	<i>Taenia</i> <i>hydatigena</i>	<i>Fasciola</i> <i>gigantica</i>	négatif	Taux d'amplification (%)
Maroc	Bovins		87	1		15	88/103 (85%)
	Ovins		46	1	1	5	48/53 (91%)
Mali	Bovins			2	6	4	8/12 (67%)
	Ovins			15		7	15/22 (69%)
	Caprins			8		3	8/11 (73%)
Mauritanie	Camélidés	7				9	7/16 (44%)

Les échecs d'amplification constatés sur les prélèvements d'abattoir peuvent s'expliquer par un non-respect du protocole de prélèvement, notamment du fait de temps de contact et de séchage trop courts. Cela peut aussi s'expliquer par le type de kyste, l'ADN étant moins présent dans les kystes calcifiés, mais aussi par la nature du kyste qui peut s'avérer être d'origine bactérienne et donc ne pas correspondre au spectre d'amplification de la cible PCR. Cette méthode d'échantillonnage par le papier FTA a démontré sa capacité à permettre d'obtenir un diagnostic moléculaire sur un panel d'hôtes intermédiaires domestiques mais aussi sauvages. La possibilité d'obtenir des échantillons de kystes hydatiques malgré des conditions difficiles de prélèvement, de conservation et de transport devrait faciliter l'obtention de futures données moléculaires.

La concaténation des séquences nucléotidiques des gènes *cox1* et *nad1* (884 pb) a révélé 18 haplotypes différents pour *E. granulosus* s.s. sur la base de 26 sites de mutation (Figure 35). La relation entre ces haplotypes a été représentée par un réseau d'haplotypes mitochondriaux, où l'on observe un haplotype dominant HL1 (71,6 % des échantillons). Les autres haplotypes ne sont représentés que par un seul échantillon, à l'exception de H9 et H18 pour lesquels deux échantillons sans lien épidémiologique ont été obtenus. Les haplotypes HL19 et L20 correspondaient à *E. canadensis* (G6-7), et étaient issus des trois échantillons provenant de la même zone géographique du sud de l'Algérie. L'haplotype HL19 correspond aux parasites identifiés chez la patiente touareg et chez un dromadaire.

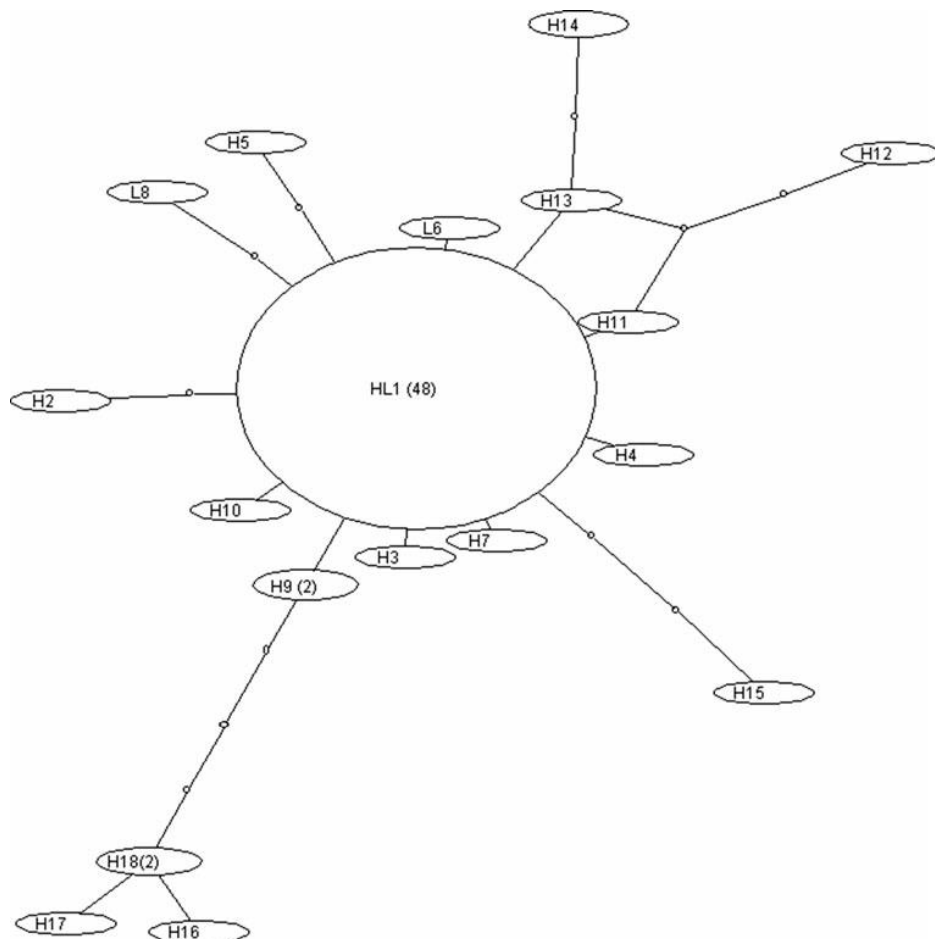


Figure 35 : Réseau d'haplotypes mitochondriaux (*cox1+nad1*) obtenus à partir de 67 échantillons d'*E. granulosus* s.s. La taille des cercles indique approximativement le nombre d'individus (indiqué entre parenthèses lorsque différent de 1) et chaque mutation est représentée par une ligne et un point blanc.

Discussion :

Malgré le statut hyper-endémique du Maghreb, les résultats de ces deux études ont permis d'obtenir des données originales tant au niveau de la surveillance que de l'épidémiologie moléculaire, soulignant la nécessité de produire des données épidémiologiques pour tendre vers une perspective de lutte. Dans les deux pays et à l'image de l'Afrique et du monde, l'espèce *E. granulosus* s.s. s'avère la plus représentée au sein du complexe *E. granulosus* s.l., chez les animaux de rente comme chez les humains. Les prévalences obtenues chez les animaux de rente dans la province de Sidi Kacem sont légèrement supérieures à celles obtenues dans les autres régions du pays (Azlaf and Dakkak, 2006). Cela pourrait s'expliquer au moins en partie par les résultats d'une enquête menée dans la région, et qui avait révélé que les espaces de pâturages y sont très fréquentés par les chiens, qui sont présents en très grand nombre et ont un accès régulier aux viscères des animaux de rente, notamment *via* les abattoirs (El Berbri et al., 2015). La relation entre l'âge et le taux d'infestation est conforme à ce qui est

classiquement décrit et s'explique principalement par l'augmentation de l'exposition à la contamination environnementale par les œufs d'*E. granulosus s.s.*, permettant d'accroître la probabilité d'infestation ou de ré-infestation. De plus, comme entre 4 et 13 mois sont nécessaires pour que les kystes hydatiques atteignent quelques millimètres de diamètre, les infestations très récentes peuvent ne pas être diagnostiquées à l'abattoir, accentuant la différence entre les individus jeunes et les individus âgés, qui ont une plus forte probabilité d'avoir des kystes plus développés. Au Maroc, les bovins sont généralement abattus plus vieux que les ovins, ce qui est susceptible de contribuer à expliquer la plus forte prévalence observée chez les bovins. De plus contrairement à l'Europe mais à l'image de toute l'Afrique, le taux de fertilité des kystes d'*E. granulosus s.s.* chez les bovins est similaire à celui des ovins. Les bovins font donc partie intégrante, en tant qu'hôte intermédiaire, du cycle d'*E. granulosus s.s.* au Maroc, comme les ovins et doivent donc être également ciblés par les mesures de lutte. Le rôle des chèvres dans la transmission d'*E. granulosus s.s.* est insignifiant. Les prévalences sont très faibles (0-2 %) contrairement à celles observées chez les bovins et ovins dans les mêmes zones. La chèvre est un hôte intermédiaire connu d'*E. canadensis* (G6-7) mais cette espèce parasitaire n'est généralement présente en Afrique que par l'existence d'un cycle entre chiens et dromadaires. De fait, les deux dromadaires porteurs de kystes et originaires du sud de l'Algérie étaient infestés par *E. canadensis* (G6-7). Cette espèce est minoritaire par rapport à *E. granulosus s.s.* en Algérie comme dans toute l'Afrique. Sa présence est généralement liée aux zones désertiques en raison de la présence de dromadaires. L'existence de cas humains, notamment dans les populations Touaregs, incite à ne pas la négliger, d'autant que son potentiel zoonotique est avéré. *E. canadensis* (G6-7) est responsable de 11,07 % (IC_{95%} : [9,6-12,7]) des cas humains d'hydatidose dans le monde, certes loin derrière *E. granulosus s.s.* mais bien devant les autres espèces du complexe *E. granulosus s.l.* qui représentent en cumulé moins de 0,4 % des cas. Il s'agissait ici de la première description d'un cas humain d'*E. canadensis* en Algérie.

L'utilisation de séquences nucléotidiques de gènes mitochondriaux s'avère très utile pour la diagnose d'espèce au sein d'*E. granulosus s.l.*, laquelle est indispensable à la connaissance des cycles parasites impliqués. Cependant, la comparaison avec des données moléculaires issues de pays voisins ou d'autres continents est limitée par l'utilisation de gènes ou portions de gènes différentes dans les différentes études. Si le gène *cox1* apparaît le plus utilisé, il ne s'agit pas toujours des mêmes portions de séquences, et les séquences ciblées sont plus ou moins longues, allant de 396 pb au gène entier (1600 pb). D'autres gènes amplifiés seuls ou en complément de *cox1*, sont ainsi souvent utilisés, tels que *nad1*, *nad3* ou encore *atp6* ou l'ARN ribosomal 12S. Un consensus sur le choix de gènes permettrait de faciliter les comparaisons, à moins que le développement d'un nouvel outil moléculaire plus discriminant puisse remplacer cette approche basée sur la comparaison de séquences nucléotidiques d'un seul gène ou d'un nombre limité de gènes.

7. Caractérisation des cycles parasitaires d'*E. multilocularis* et d'*E. granulosus*

A l'exception du stade œuf libre dans l'environnement, les deux autres stades parasitaires du cycle de vie des échinocoques requiert des hôtes définitifs ou intermédiaires pour leur survie. Les espèces de mammifères doivent être des hôtes compétents pour le développement du parasite mais aussi s'intégrer dans une relation proie-prédateur afin de permettre le passage du stade larvaire au stade adulte. Généralement, un seul des deux types d'hôtes est principalement concerné par la surveillance, à savoir le renard pour *E. multilocularis* et les animaux de rente pour *E. granulosus* s.l. Toutefois l'identification de l'autre type d'hôte intervenant dans le cycle est nécessaire pour assurer une meilleure compréhension de la réalisation du cycle parasitaire. Ainsi, la forte proximité avec l'homme des carnivores domestiques nécessite de disposer de données épidémiologiques pour connaître leur potentiel zoonotique. Des études ont ainsi été menées en zone de forte endémie d'*E. multilocularis* pour le chien et le chat, alors qu'une confirmation du chien en tant qu'hôte définitif d'*E. canadensis* (G6-7) en Corse a été recherchée.

7.1. Rôle des carnivores domestiques dans l'épidémiologie d'*E. multilocularis*

7.1.1. Rôle du chien

Umhang G., Raton, V., Comte, S., Hormaz, V., Boucher, J -M., Combes, B., Boué, F. *Echinococcus multilocularis* in dogs from two french endemic areas: No evidence of infection but hazardous deworming practices. *Veterinary Parasitology*, 2012, 188(3-4), 301-305.

Umhang G., Comte S., Raton V., Hormaz V., Boucher JM., Favier S., Combes B., Boué F. *Echinococcus multilocularis* infections in dogs from urban and peri-urban areas in France. *Parasitology Research*, 2014, 113 (6), 2219-2222.

Karamon J., Samorek-Pieróg M., Kochanowski M., Dąbrowska J., Sroka J., Gołąb E., **Umhang G.** & Cencek T.. First detection of *Echinococcus multilocularis* in dogs in a highly endemic area of Poland. *Folia Parasitologica*, 2016, 63, 1-5.

7.1.1.1. Surveillance épidémiologique

Introduction :

Dans les pays européens historiquement endémiques, la prévalence de l'infestation canine par *E. multilocularis* est généralement inférieure à 1 % mais peut localement atteindre 7 % en zone de très forte endémie (Deplazes et al., 1999; Dyachenko et al., 2008b; Gottstein et al., 2001; Sager et al., 2006). Cependant aucune donnée n'était disponible en France. Deux études ont ainsi été menées par le LNR en collaboration avec l'ELIZ dans des zones de forte endémie, à différentes échelles géographiques et avec des niveaux d'urbanisation différents.

Matériels et méthodes :

Afin de disposer d'un nombre suffisamment élevé d'échantillons de fèces pour une évaluation robuste de la prévalence, une collaboration a été menée avec les cabinets vétérinaires des zones échantillonnées. Cela permettait de couvrir un large territoire et un grand nombre de chiens en quelques mois tout en essayant d'être le plus représentatif de la population canine existante. Chaque client possédant un chien se voyait proposer un vermifuge contenant du praziquantel. En échange, il devait rapporter la première crotte après vermifugation, accompagnée d'un questionnaire de renseignements sur le chien et sa fréquence de vermifugation.

Une étude a été réalisée dans l'ensemble du département de la Meuse en 2008 puis dans celui de la Haute-Saône en 2010 (Umhang et al., 2012). Ces deux départements ruraux sont considérés comme fortement endémiques avec une prévalence d'infestation par *E. multilocularis* chez le renard dépassant les 35 % (Combes et al., 2012). La collecte de fèces s'est déroulée au printemps (mars à juin) car cette période est estimée plus propice à l'infestation canine en raison de la plus forte prévalence chez les rongeurs. Une autre étude a été

menée à l'échelle des communautés de communes d'Annemasse (74) et de Pontarlier (25) en milieu urbain et péri-urbain (Umhang et al., 2014b). A l'échelle départementale, la Haute-Savoie et le Doubs sont considérés comme très fortement endémiques avec des prévalences autour de 50 % chez le renard (Combes et al., 2012). Dans cette étude, la collecte des fèces a été réalisée quatre fois par an de 2006 à 2008.

Résultats :

La participation quasi-unanime des vétérinaires en Meuse et en Haute-Saône a permis de couvrir l'ensemble des deux départements, aboutissant à la collecte de 860 fèces de chiens. Une observation microscopique a permis d'identifier la présence d'au moins une espèce parasitaire (ankylostome, *T. vulpis*, *Toxocara* sp., *Capillaria* sp., *Taenia* sp., *Mesocetoides* sp., larves de nématodes) dans 171 des fèces (19,9 %). Des œufs de *Taenidae* ont été observés dans sept fèces. Cinq infestations à *T. crassiceps* ont été identifiées. Malgré des essais répétés, la présence d'inhibiteurs pour deux échantillons n'a permis d'identifier l'espèce de *Taenidae* impliquée. En l'absence de fèces positives pour *E. multilocularis*, la prévalence apparente de l'infestation dans la population canine a été estimée inférieure à 1 % en Haute-Saône et inférieure à 0,75 % dans la Meuse. Parmi les 860 chiens échantillonnés, 320 étaient des chiens de chasse (37,2 %), 76 des chiens de ferme (8,8 %) et 464 (54,0 %) des chiens de compagnie. Les chiens de chasse étaient quatre fois plus parasités que les chiens de ferme et cinq fois plus que les chiens de compagnie (odd-ratio IC_{95%} : chiens de chasse 1, chiens de ferme 0,26 [0,18–0,37], chiens de compagnie 0,2 [0,09–0,44]). La prévalence parasitaire globale n'était pas différente entre les chiens vermifugés au minimum une fois par an (n=715, 20,5 %, IC_{95%} : [9,8 – 35,3 %]) et ceux jamais vermifugés (n=44, 18, 7 %, IC_{95%} : [15,9 – 21,8 %]). Aucune différence significative concernant le type de chien (p=0,53) ou la fréquence de vermifugation (p=0,52) n'a été observée en relation avec la suspicion de prédation rapportée chez 37 % des chiens. En Haute-Saône, les propriétaires avaient été interrogés sur leur connaissance de la prédation de rongeurs par leur chien. Les propriétaires dont le chien consommait des rongeurs étaient par contre deux fois moins conscients de l'utilité d'un antihelminthique efficace contre *E. multilocularis* (odd-ratio = 0,48, IC_{95%} : [0,24 – 0,97]) que les propriétaires n'observant pas la consommation de rongeurs par leur chiens. Parmi les sept chiens infestés par des œufs de *Taenidae*, quatre étaient des chiens de chasse dont deux avec une prédation de rongeurs reconnue.

Les trois années de collecte sur les communautés de communes d'Annemasse et de Pontarlier ont permis d'obtenir 817 fèces provenant de chiens différents. Dans chacune des deux zones, deux fèces positives pour *E. multilocularis* ont été identifiées, conduisant à des prévalences similaires de 0,4 % à Annemasse et 0,6 % à Pontarlier. La prévalence globale de l'infestation par *E. multilocularis* chez le chien a été estimée à 0,5 % (IC_{95%} : [0,1 – 1,3 %]). En parallèle, huit infestations par *Taenia* spp. ont été observées : *T. crassiceps* n=(5), *T. serialis* (n=2) et *T. polyacantha* (n=1). En raison du faible nombre de chiens de ferme (n=20), seulement deux catégories de chiens ont été retenues : les chiens de chasse et les autres. Globalement, les chiens de chasse étaient très significativement (p<0,001) plus infestés par *E. multilocularis* et *Taenia* sp., même si cela n'était pas le cas en considérant uniquement *E. multilocularis* (p=0,457). De plus, les chiens de chasse étaient moins souvent vermifugés au moins deux fois par an (p=0,010), et plus souvent jamais vermifugés (p=0,028) en comparaison des autres chiens.

L'analyse de 980 fèces de chiens provenant de cabinets vétérinaires en France dans le cadre d'une étude concernant plusieurs pays européens n'a conduit à la détection d'aucun animal fournissant une réponse positive pour *E. multilocularis* (Dyachenko et al., 2008b). Cependant, l'absence de toute donnée sur la catégorie de chiens et surtout sur leur provenance géographique (zone d'enzootie ou non) a rendu difficile l'interprétation des résultats de cette étude, réalisée par un laboratoire allemand. Que cela soit en zone urbaine, péri-urbaine ou en zone rurale, cette étude confirme que le rôle du chien dans le maintien du cycle parasitaire et la contamination environnementale est très largement minoritaire en comparaison avec le renard (Hegglin and Deplazes, 2013). Toutefois, le risque zoonotique n'est pas à négliger, la possession d'un chien ayant été identifiée comme un facteur de risque de développement chez l'homme d'une échinococcose alvéolaire (Kern et al., 2004; Piarroux et al., 2013). Dans les deux études menées par le LNR, les chiens de chasse ont été identifiés comme plus parasités et moins souvent vermifugés que les autres chiens. Alors que la

chasse a été précédemment identifiée comme un facteur de risque pour l'échinococcose alvéolaire (Kreidl et al., 1998), la possession d'un chien de chasse semblerait donc être un facteur de risque supplémentaire dans ce contexte. Ces résultats sont révélateurs d'un manque majeur de sensibilisation et de connaissances sur l'échinococcose alvéolaire, notamment par les chasseurs, pourtant proches du milieu de la faune sauvage. Cela aboutit à des situations aberrantes, telle qu'une fréquence de vermifugation plus faible chez les chiens dont les propriétaires ont conscience qu'ils consomment des rongeurs en Haute-Saône. Or, la connaissance de cette attitude de prédation devrait engendrer une vermifugation plus fréquente mais faute de connaissance suffisante concernant le parasite, il n'y a pas de lien établi avec un risque zoonotique. Il est également à noter que les chiens analysés au cours de ces deux études font partie de populations canines sous surveillance vétérinaire et ne sont donc pas représentatifs de l'ensemble de la population canine, laquelle inclut des chiens peu ou pas médicalisés. Malgré le fait qu'il soit plus difficile d'accéder à des populations de chiens ne fréquentant pas les cabinets vétérinaires, il apparaît vraisemblable que ces populations pourraient être encore plus à risque et mériteraient d'être concernées au cours des études futures.

En France, la fréquence de vermifugation communément préconisée est de deux fois par an et elle est appliquée dans plus de 70 % des cas. Toutefois, cette fréquence ne semble pas être suffisante pour avoir un effet sur l'infestation parasitaire. En zone d'endémie d'infestation par *E. multilocularis*, une vermifugation mensuelle est recommandée pour les chiens prédateurs de rongeurs afin d'éviter l'excrétion d'œufs dans les fèces (Eckert and Deplazes, 1999). Cette fréquence serait certainement difficile à accepter par tous les propriétaires concernés notamment en raison du coût associé. Par contre, cibler les populations canines les plus exposées pourrait constituer un point de départ intéressant pour la prévention de l'échinococcose canine.

7.1.1.2. Intérêt des différentes approches de dépistage coprologique chez le chien

Si aucun cas d'infestation canine n'a pu être identifié dans les deux départements ruraux de Meuse et de Haute-Saône, les quatre cas positifs observés à Annemasse et Pontarlier constituent les premiers cas diagnostiqués chez le chien en France par une approche moléculaire. Des niveaux de prévalences similaires de l'infestation par *E. multilocularis* ont été retrouvés chez le chien en Europe (Carmena and Cardona, 2013). Récemment, l'expertise du LNR dans ce type d'étude a été mise à contribution pour la réalisation d'une étude en Pologne par l'institut national de recherche vétérinaire de Pulawy. La collecte de 148 fèces de chiens au printemps 2015 dans une région de forte endémie dans le sud-est du pays a permis de mettre en évidence pour la première fois une infestation de chiens par *E. multilocularis* (Karamon et al., 2016). Deux fèces, correspondant à une prévalence de 1,4 % (IC_{95%} : [0,4 – 4,8 %]) ont été détectées positives par PCR. Toutefois, ces prévalences ont été obtenues en ayant recours à des protocoles différents de dépistage coprologique. Le choix du protocole de dépistage est d'autant plus important qu'il a un impact direct sur la sensibilité de détection, très importante pour ces études où une faible prévalence est attendue. Le dépistage final étant désormais systématiquement réalisé par PCR, l'importance de la spécificité est moindre car une confirmation par séquençage est devenue systématique.

Lors des études menées par le LNR en France, la première étape après flottaison consiste en une flottaison adaptée de la méthode développée par Mathis et al. (Mathis et al., 1996). Cinq grammes de fèces sont homogénéisées dans de l'eau distillée puis filtrée avec une maille de 250 µm afin d'éliminer les gros éléments. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot repris dans une solution de chlorure de zinc à 42 %. Après centrifugation, le surnageant est filtré sur maille de 20 µm qui retient les œufs de parasites. Le filtre est alors rincé pour obtenir un culot contenant les œufs de parasites. L'observation au microscope de cette solution permet ensuite d'identifier les œufs de *Taenidae*. Les œufs des genres *Echinococcus* et *Taenia* étant morphologiquement identiques, un dépistage par PCR se doit ensuite d'être réalisé pour l'identification de l'espèce parasitaire concernée. Cette approche classique a été utilisée pour l'étude en Meuse et en Haute-Saône (Umhang et al., 2012), alors que pour l'étude sur Annemasse et Pontarlier (Umhang et al., 2014b) il avait été choisi de réaliser après flottaison une extraction d'ADN sur tous les échantillons suivie d'un dépistage de la

présence de *Taenia sp.* et d'*E. multilocularis* par PCR multiplex (Trachsel et al., 2007). Si l'observation microscopique systématique permet de limiter le nombre d'échantillons à traiter en PCR et de disposer d'une observation polyspécifique des espèces parasitaires présentes, l'analyse PCR systématique avait l'avantage d'augmenter la sensibilité de détection pour les échantillons contenant une faible quantité d'œufs et surtout pour ceux qui ne contenaient potentiellement pas d'œufs mais uniquement de l'ADN d'*E. multilocularis*. Si cette seconde approche se révèle être plus longue et plus coûteuse, l'identification de cas positifs pour *E. multilocularis* tend à argumenter en faveur d'une meilleure sensibilité, en considérant l'existence de contextes épidémiologiques similaires dans les deux études.

La disponibilité de meilleurs kits d'extraction d'ADN et surtout de tests PCR plus sensibles et spécifiques a eu pour effet d'abandonner le criblage par flottaison et de réaliser une extraction directe à partir de fèces. Cela permet de ne pas être dépendant de la sensibilité de la flottaison et de l'observation au microscope. Toutefois, cette approche directe est en butte à la présence potentielle d'inhibiteurs de PCR. Une des solutions consiste à diluer l'extrait d'ADN pour utilisation en PCR. Un tel phénomène n'avait pas permis d'obtenir une amplification pour deux des sept fèces présentant des œufs de *Taenidae* en Meuse et Haute-Saône (Umhang et al., 2012). Lors de l'étude menée en collaboration avec la Pologne (Karamon et al., 2016) il a été décidé de réaliser systématiquement l'amplification d'un échantillon d'ADN dilué au 1/10^{ème} et non dilué. Le résultat positif pour *E. multilocularis* à partir de l'une des deux fèces positives a été obtenu par les deux tests PCR utilisés mais uniquement avec un échantillon d'ADN dilué au 1/10^{ème}, confortant l'intérêt de l'utilisation de cette pratique. La disponibilité de techniques de PCR en temps réel pour le dépistage d'*E. multilocularis* (Dinkel et al., 2011; Knapp et al., 2014) (cf. encart n°2) a fini d'orienter le choix des protocoles vers une analyse directe des fèces sans étape préalable à l'extraction d'ADN. Cette nouvelle approche plus sensible permet également un couplage à un contrôle interne, qui permet d'observer la présence d'inhibiteurs potentiels. Ce dispositif constitue donc une approche très pertinente dans le cadre des enquêtes de dépistage de l'infestation par *E. multilocularis* chez les carnivores domestiques, afin de disposer de données plus précises pour évaluer le rôle de ces animaux dans le risque de contamination de l'Homme.

7.1.2. Rôle du chat : prévalence et potentiel zoonotique

Umhang G., Forin-Wiart M-A., Hormaz V., Caillot C., Boucher J-M., Poulle M-L., Boué F. (2015) *Echinococcus multilocularis* detection in the intestines and feces of free-ranging domestic cats (*Felis s. catus*) and European wildcats (*Felis s. silvestris*) from northeastern France. *Veterinary Parasitology*, 214(1-2):75-79.

Introduction :

Comme le chien, le chat est un carnivore domestique constituant un hôte définitif potentiel pour *E. multilocularis*. Sa proximité avec l'homme lui a valu d'être lui aussi identifié comme un facteur de risque pour l'échinococcose alvéolaire (Kern et al., 2004; Kreidl et al., 1998) mais son rôle demeure pourtant ambigu. En effet, beaucoup d'études d'infestations expérimentales du chat par *E. multilocularis* ont été réalisées (Crellin, Marchiondo, and Andersen, 1981; Jenkins and Romig, 2000; Kamiya, Ooi, and Ohbayashi, 1986; Rausch and Richards, 1971; Thompson and Eckert, 1983; Thompson, Deplazes, and Eckert, 2003; Vogel, 1957) et contrairement au renard et au chien, les résultats d'études d'infestations expérimentales récentes semblent montrer que le chat ne jouerait pas un rôle significatif dans l'épidémiologie de l'échinococcose alvéolaire (Kapel et al., 2006; Thompson et al., 2006). Ainsi, la réceptivité du chat aux infestations expérimentales varie d'un état apparemment réfractaire à celui de fortement réceptif, mais cette appréciation prend uniquement en considération la charge parasitaire sans tenir compte du stade de développement des parasites (Jenkins and Romig, 2000). Or, le développement des vers est retardé, avec une excrétion très faible d'œufs (Kapel et al., 2006; Thompson et al., 2006). Seulement deux études récentes ont exploré la période patente, si essentielle pour l'évaluation du potentiel zoonotique, en analysant de manière quantitative la présence du parasite dans les fèces et les intestins jusqu'à 90 jours post-infestation (Kapel et al. 2006, Thompson et al. 2006). En parallèle, plusieurs cas d'infestation naturelle du chat ont été décrits en Amérique du Nord (Leiby and Kritsky, 1972;

Wobeser, 1971), au Japon (Kamiya et al., 1986) et en Europe (Deblock et al., 1989; Eckert, Muller, and Partridge, 1974; Zeyhle, 1982) et ces descriptions sont importantes pour confirmer ou nuancer les conclusions obtenues par les infestations expérimentales. De plus, les chats forestiers (*Felis s. silvestris*) et les chats domestiques en Europe ont une forte activité de prédation de rongeurs (Forin-Wiart, 2014; Germain, Ruetter, and Poulle, 2009) et, comme les populations de chats domestiques sont plus importantes que celles des renards (Hiby, Eckman, and MacFarlane, 2014; Ruetter, Stahl, and Albaret, 2003), le rôle des populations de chats comme hôte définitif d'*E. multilocularis* mérite d'être évalué très précisément. Dans ce contexte, le LNR *Echinococcus spp.* a voulu obtenir des informations sur l'infestation naturelle par *E. multilocularis* chez le chat.

Matériels et méthodes :

Une collaboration avec le plateau technique du CERFE de l'Université de Reims Champagne-Ardenne a permis d'obtenir des fèces de chats domestiques représentatifs d'une population de 61 chats vivants en extérieur et de 81 chats de ferme, ainsi que des intestins de chats domestiques et de chats forestiers tués par des accidents de la route. Les fèces provenaient de trois sessions de collecte (juin-juillet 2011, novembre-décembre 2011 et mars 2012) dans deux communes rurales des Ardennes, zone de forte endémie parasitaire atteignant localement jusqu'à 53 % d'infestation des renards (Combes et al., 2012; Guislain et al., 2008). L'origine féline des fèces avait été confirmée par des analyses moléculaires dans la perspective d'une autre étude concernant le régime alimentaire (Forin-Wiart, 2014). Le dépistage de l'infestation par *E. multilocularis* a été réalisé par qPCR à partir d'un échantillon de 500 mg de fèces (Knapp et al., 2014). Tous les résultats positifs en qPCR ont ensuite été confirmés par pyroséquençage ciblant un segment de la séquence du gène *cox1*, avec comparaison à une séquence de référence pour *E. multilocularis*. De plus, pour tous les échantillons dans lesquels la présence d'*E. multilocularis* avait été confirmée, la présence d'œufs de *Taenidae* a été vérifiée par un protocole de flottaison (Umhang et al., 2012). En cas de présence d'œufs de *Taenidae*, une qPCR était à nouveau réalisée pour confirmer qu'il s'agissait bien de ceux d'*E. multilocularis*. En l'absence de résultat positif à cette qPCR, un dépistage de l'espèce de *Taenia sp.* impliquée était réalisé par une PCR spécifique du genre (Trachsel et al., 2007). Les intestins ont été collectés de février 2011 à mars 2014 puis analysés par la méthode SSCT (Umhang et al., 2011), la charge parasitaire étant estimée par le comptage de 20% de chacun des cinq segments pour les échantillons ayant fourni un résultat positif.

Résultats :

Parmi les 321 fèces de chats disponibles pour analyse, la présence d'*E. multilocularis* a pu être confirmée à partir de 10 fèces (3,1 %, IC_{95%} : [1,5-5,7]). Après flottaison, la présence d'œufs de *Taenidae* n'a pu être observée que pour un seul échantillon. Les analyses moléculaires ont démontré qu'il ne s'agissait pas d'*E. multilocularis* mais de *Taenia (Hydatigera) taeniaeformis*. Parmi les 19 intestins de chats domestiques et les cinq intestins de chats forestiers analysés, des vers d'*E. multilocularis* ont pu être observés dans un échantillon de chacune des deux espèces. La prévalence de l'infestation par le parasite a ainsi pu être estimée à 5 % chez le chat domestique avec une charge parasitaire évaluée à 7040 vers pour le seul intestin infesté. Des vers d'*E. multilocularis* (environ 680) ont été observés pour un seul des cinq intestins de chats forestiers. La faible taille d'échantillonnage pour les deux espèces ne permet pas de donner des intervalles de confiance pertinents. Chez les deux chats infestés, seulement des vers immatures ont pu être observés (<1,5 mm), correspondant au mieux au scolex et aux deux premiers segments. Le même profil EmsB a été identifié chez les vers des deux chats.

Discussion :

La prévalence intestinale de l'infestation par *E. multilocularis* chez le chat domestique est comprise entre 0 et 5,5 % dans des zones variées d'endémie (Eckert et al., 2011). La forte prévalence obtenue dans notre étude peut être expliquée par le faible nombre d'échantillons analysés ainsi que par un échantillonnage réalisé dans une zone géographique de faible superficie en zone hautement endémique qui n'est très probablement pas représentatif de la région et surtout pas de la France. Compte tenu du manque de représentativité de l'échantillonnage, il apparaît difficile de réaliser une comparaison de prévalence. Toutefois, les deux

infestations permettent de relever des observations intéressantes quant à la charge parasitaire et au stade de développement des vers. Les charges parasitaires obtenues lors d'infestations expérimentales varient de l'absence de vers jusqu'à plus de 3000 vers mais avec un faible ratio (3,2 %) de protoscolex inoculés se développant en vers (Jenkins and Romig, 2000; Kapel et al., 2006). Lors des infestations naturelles, les charges parasitaires sont généralement faibles, avec par exemple une charge moyenne de neuf vers pour les trois chats infestés précédemment décrits en Haute-Savoie et dans l'Ain (Petavy et al., 2000) et de 3 à 50 au Canada (Wobeser, 1971). Comme les fortes charges observées dans cette étude étaient uniquement des vers immatures, il peut être considéré qu'aucun ou peu de vers auraient atteint leur stade final de développement avec la production d'œufs. Une si forte diminution du nombre de vers a déjà pu être observée durant les dix premiers jours de l'infestation lors d'infestations expérimentales de chats (Kamiya et al., 1986).

Les taux d'infestation⁵ des fèces par *E. multilocularis* chez le chat en Europe n'excèdent pas 0,77 % lors de détection par copro-ELISA ou flottaison avec confirmation systématique par PCR (Deplazes et al., 1999; Dyachenko et al., 2008a). Le fort taux d'infestation obtenu dans cette étude pourrait résulter de l'utilisation pour la première fois de la qPCR pour le dépistage d'*E. multilocularis* chez le chat. Néanmoins, cela correspond uniquement à la détection de l'ADN du parasite sans observation d'œufs d'*E. multilocularis*, alors que justement les autres méthodes sont généralement basées initialement sur l'observation microscopique des œufs. La détection de l'ADN d'*E. multilocularis* par qPCR en l'absence d'œufs, démontre la possibilité de la détection d'une infestation prépatente par cet outil comme cela avait déjà été démontré par copro-ELISA et par PCR conventionnelle après flottaison (Al-Sabi et al., 2007; Deplazes et al., 1999; Deplazes, Dinkel, and Mathis, 2003). Toutefois, cette détection ne semble pas être systématique en cas d'infestation, car dépendante du nombre de vers. Ainsi, aucun signal n'avait pu être obtenu par Knapp et al. (Knapp et al., 2014) pour le seul échantillon de fèces provenant d'un renard infesté par cinq vers non gravides. L'utilisation d'outils moléculaires pour la détection de l'infestation par *E. multilocularis* chez le chat doit ainsi être systématiquement associée à une recherche *a posteriori* des œufs de *Taenidae* pour les échantillons ayant fourni un résultat positif afin d'éviter des conclusions épidémiologiques inappropriées en raison de l'absence générale ou de la faible excrétion d'œufs. Cette absence d'œufs dans les fèces laisse supposer que la plupart (voire la totalité) des vers se décrocheraient dans le contenu intestinal avant d'être totalement développés, expliquant la présence d'ADN détectable par qPCR dans les fèces. Il ne peut pas être exclu que la présence d'ADN dans les fèces pourrait aussi provenir directement de la digestion de la phase larvaire du parasite suite à la prédation d'un rongeur parasité, même si la détection se ferait sur une période plus courte comparée à celle de vers qui se décrocheraient.

Les résultats obtenus dans cette étude confirment que le chat domestique et le chat forestier semblent jouer un rôle insignifiant dans la transmission d'*E. multilocularis*, même en région fortement endémique. Le potentiel biotique d'*E. multilocularis* chez le chat est extrêmement faible en comparaison du chien et du renard, qui doivent être considérés comme les deux espèces prioritaires pour la mise en œuvre des mesures de contrôle d'*E. multilocularis*. Ces données d'infestation naturelle apparaissent comme très similaires à celles obtenues lors des infestations expérimentales chez le chat avec un développement difficile des vers aboutissant à une excrétion minimale d'œufs, estimée à seulement 0,76 œufs excrétés par ver. De plus, les œufs produits par le chat se sont révélés non infectieux après infestation par voie orale chez la souris (Kapel et al., 2006; Nonaka et al., 2008). Cependant, bien que non observée dans cette étude, la présence d'œufs totalement développés dans des fèces de chats infestés naturellement a déjà été décrite avec jusqu'à 440 œufs par gramme (Nonaka et al., 2008). D'autres études seraient nécessaires pour clarifier totalement le rôle potentiel du chat comme une source d'infestation pour l'homme. A l'heure actuelle, cette absence de clarification empêche d'écartier totalement tout risque zoonotique, même si il doit être considéré comme très faible (Deplazes et al., 1999; Nonaka et al., 2008; Thompson et al., 2003). Pour cela, il serait intéressant d'évaluer chez la souris le potentiel infectieux d'œufs obtenus par des chats infestés naturellement.

⁵ Il est ici fait référence à la notion de taux d'infestation et non de prévalence car plusieurs fèces provenant d'un même individu ont été analysés en raison de la réalisation de l'échantillonnage sur deux communes de petite taille.

7.2. Cas particulier des animaux captifs : surveillance d'*E. multilocularis* dans un parc animalier

Umhang, G., Lahoreau, J., Nicolier, A., & Boué, F. (2013b). *Echinococcus multilocularis* infection of a ring-tailed lemur (*lemur catta*) and a nutria (*myocastor coypus*) in a french zoo. *Parasitology International*, 62(6), 561-563.

Umhang G., Lahoreau J., Hormaz V., Boucher J-M., Guenon A., Montange D., Grenouillet F., Boué F. (2016) Surveillance and control of *Echinococcus multilocularis* in a wildlife park. *Parasitology International*, 65(3), 245-250.

Introduction :

Au cours des deux dernières décennies, de nombreux cas d'infestation d'animaux captifs par *E. multilocularis* ou d'autres espèces d'échinocoques ont été décrits. Cela concerne principalement les primates, dont plusieurs espèces de singes (*Gorilla gorilla*, *Macaca sylvanus*, *Macaca fascicularis*, *Macaca nigra*, *Macaca fuscata*, *Cercopithecus diana*) et de lémuriers (*Varecia rubra*, *Lemur catta*) (Boufana et al., 2012; Deplazes and Eckert, 2001; Kondo et al., 1996; Yamano et al., 2014). En zone d'endémie d'*E. multilocularis*, cela peut constituer une réelle menace notamment pour des espèces habituellement non confrontées à ce parasite. Au zoo de Bâle, un épisode groupé ayant affecté cinq macaques et un gorille a été décrit alors qu'en Allemagne 24 macaques de trois espèces ont également été diagnostiqués comme infestés (Rehmann et al., 2005; Tappe et al., 2007). Si ces cas ont un intérêt clinique et une importance écologique dès lors qu'ils concernent des espèces menacées, ils ont aussi une grande importance épidémiologique car ils constituent des indicateurs de la présence locale du parasite dans l'environnement et donc un risque zoonotique potentiel (Deplazes and Eckert, 2001).

En avril 2011 dans un parc animalier, l'autopsie d'un ragondin mort suite à plusieurs morsures des autres individus de son enclos révéla que la cause de la mort était une septicémie. Cependant, la présence de lésions hépatiques conduisit la vétérinaire du parc où l'animal vivait en captivité depuis sa naissance à réaliser un prélèvement afin d'établir un diagnostic à partir de cette lésion. Le LNR *Echinococcus spp.* fut contacté pour la prise en charge de l'analyse de ce prélèvement. La suspicion macroscopique fut confirmée par la mise en évidence d'une séquence nucléotidique du gène *cox1* (Bowles et al., 1992) identique à celle présente chez *E. multilocularis* (Umhang et al., 2013a). En parallèle, des analyses histologiques réalisées par le laboratoire Vet Diagnostics confirmèrent le diagnostic moléculaire et permirent également l'identification de protoscolex. Le LNR proposa la mise en place d'une surveillance de la présence du parasite dans le parc animalier suite à la mise en évidence de ce cas d'échinococcose alvéolaire chez un animal captif. Le but était d'évaluer la présence du parasite dans la faune sauvage autour et à l'intérieur du parc ainsi que chez les animaux captifs, afin de pouvoir caractériser le(s) cycle(s) parasite(s) en place et tenter d'en déduire l'origine de l'infestation (Umhang et al., 2016c).

Matériel et méthodes :

Le parc animalier est situé en Moselle, département considéré comme en zone de forte endémie avec 34% (IC_{95%} : [25-44]) des renards infestés par *E. multilocularis* (Combes et al., 2012). Les 120 hectares du parc sont situés en zone rurale entourée de champs et de forêts. La présence de simples grillages délimitant la zone du parc permet le passage de renards, observés de temps en temps à l'intérieur du parc. Les animaux captifs sont dans des grands enclos avec barrières naturelles et sont principalement issus de la faune sauvage européenne. La recherche de la présence du parasite dans la faune sauvage a été réalisée chez les hôtes principaux que sont le renard et les rongeurs. Pour l'hôte définitif, une collecte de fèces de renards a été réalisée dans un rayon de 4 km autour du parc en février 2012 par l'équipe du LNR. A l'intérieur du parc, les fèces observées par le personnel du parc de février 2012 à janvier 2014 ont été collectées. Lorsque cela a été possible, des tirs de renards qui s'étaient introduits dans le parc ont été réalisés afin d'éliminer si possible les individus observés mais aussi afin d'entretenir leurs craintes vis-à-vis de ce territoire pour dissuader de nouvelles intrusions. Lors des tirs réussis, les intestins ont été collectés. Concernant les hôtes intermédiaires, un piégeage de rongeurs a été réalisé dans 21 zones du parc (forêt, prairie, haie) d'avril à mai 2012, à l'aide de pièges de type INRA (34

pièges sur 100 m) durant quatre nuits consécutives. Lors de l'autopsie des rongeurs, toutes les lésions suspectes présentes sur le foie ont été prélevées et congelées.

La surveillance chez les hôtes définitifs potentiels parmi les animaux captifs a été réalisée par la collecte mensuelle de fèces, de décembre 2011 à avril 2012, dans les enclos de tous les carnivores : un renard roux (*V. vulpes*), trois chats forestiers (*F. s. silvestris*), trois lynx (*Lynx lynx*), quatre genettes (*Genetta genetta*), une meute de sept loups blancs arctiques (*Canis lupus tundrarum*), deux meutes de sept loups gris d'Europe (*Canis lupus lupus*), quatre ours bruns (*Ursus arctos*) et quatre ratons laveurs (*Procyon lotor*). Une collecte supplémentaire a été réalisée pour les loups de novembre 2012 à avril 2013. Comme un échantillonnage individuel n'était souvent pas possible à réaliser, un nombre de fèces correspondant au nombre d'animaux présents dans l'enclos a été collecté mensuellement (échantillonnage des fèces le même jour avec prélèvement de fèces d'animaux différents lorsque l'observation de la défécation est possible). Pour les hôtes intermédiaires captifs, la surveillance consistait en l'observation systématique de la présence de lésions hépatiques lors de l'autopsie d'animaux morts au parc.

Après décontamination par passage d'une semaine à -80°C, toutes les fèces furent analysées par flottaison suivie d'une observation microscopique pour rechercher la présence d'œufs de *Taenidae* (voir (Umhang et al., 2012) dont la diagnose d'espèce a été réalisée par PCR multiplex (Trachsel et al., 2007). Le diagnostic de l'étiologie des lésions observées chez les hôtes intermédiaires a été réalisé par PCR sur le gène *cox1* (Bowles et al., 1992). Les intestins de renards ont été analysés par la technique SSCT (Umhang et al., 2011). Une analyse génétique par le microsatellite EmsB a été réalisée à partir de cinq vers pour chacun des renards positifs et à partir des lésions des hôtes intermédiaires infestés par *E. multilocularis*.

Résultats :

Renards à l'extérieur et à l'intérieur du parc :

Parmi les 97 fèces de renards collectées autour du parc, la présence d'œufs de *Taenidae* a été observée dans 37 fèces avec identification d'*E. multilocularis* pour 20 d'entre eux (20,6 %, IC_{95%} : [13,1-30,0]). A l'intérieur du parc, le parasite a été dépisté dans 8 des 45 fèces collectées (17,8 %, IC_{95%} : [8,0-32,1]), les autres infestations étant liées à *T. polyacantha*, *T. crassiceps* et *T. (Hydatigera) taeniaeformis*. Le dépistage de l'infestation des hôtes définitifs sauvages a été complété par la recherche de la présence de vers d'*E. multilocularis* chez trois des cinq renards tirés dans le parc. L'analyse de 194 fèces provenant des carnivores captifs lors de la première année de surveillance a conduit à l'observation de nombreux œufs de *Taenidae* dans une des fèces de loups gris, avec confirmation de la présence d'*E. multilocularis*. Lors de la seconde année de surveillance, le parasite n'a plus été mis en évidence chez les loups.

Rongeurs et hôtes intermédiaires captifs :

Au total, 227 rongeurs ont été piégés dont majoritairement des campagnols avec 135 *Myodes glareolus* et 16 *Microtus agrestis*. Sur les 21 rongeurs présentant des lésions, sept d'entre elles chez *M. glareolus* et une chez *M. agrestis* ont été identifiées comme causées par *E. multilocularis*, soit une prévalence d'infestation par *E. multilocularis* chez les rongeurs de 3,5 % (IC_{95%} : [1,5-6,8]) et de 5,3 % (IC_{95%} : [2,3-10,2]) si l'on ne considère que les campagnols. La présence de protoscolex a été confirmée chez deux *M. glareolus* parmi les trois seuls animaux présentant des lésions très développées (Figure 36). Les autres infestations ont été diagnostiquées chez des rongeurs comme étant causées par *T. (Versteria) mustelae*. De plus, un rat (*Rattus norvegicus*) retrouvé mort dans une annexe du parc présentait aussi des lésions qui ont été confirmées par PCR comme causées par *E. multilocularis*.

En août 2012, lors de l'autopsie d'un maki catta (*Lemur catta*) arrivé 16 mois auparavant dans le zoo et retrouvé noyé dans l'eau entourant son île, des lésions multivésiculaires massives ont été observées sur plusieurs lobes hépatiques. A nouveau, les analyses moléculaires et histologiques ont confirmé toutes deux l'infestation par *E. multilocularis* (Umhang et al., 2013a). A la suite de ce cas, un diagnostic sérologique et par imagerie a été mis en œuvre chez l'ensemble des lémuriers dans une perspective de lutte contre *E.*

multilocularis, dont les composantes seront développées dans le chapitre correspondant (8.4). Un second maki catta est décédé en septembre 2014 après avoir manifesté une baisse de forme et une apathie marquée. L'autopsie a révélé la présence d'un fluide crémeux au niveau abdominal, dû à la rupture d'un abcès sur le foie. Plus de 75 % du foie avait été remplacé par le développement de kystes partiellement calcifiés et nécrosés. La présence de protoscolex a été observée par examen histologique ainsi qu'une péritonite et une hépatite granulomateuse sévère. La diagnose moléculaire a confirmé à nouveau la présence d'*E. multilocularis*. Enfin, un troisième maki catta a été euthanasié quatre mois plus tard en raison d'un fort élargissement de l'abdomen causant des difficultés respiratoires et motrices. L'autopsie a révélé une hépatomégalie sévère, le poids du foie représentant plus de 40 % du poids total de l'animal (Figure 36). D'autres lésions au niveau du diaphragme et du mésentère ont également été observées et toutes ont permis de confirmer la présence par PCR d'*E. multilocularis*.



Figure 36 : Lésions hépatiques fertiles d'échinococcose alvéolaire (cercle rouge) chez un *M. glareolus* piégé au sein du parc animalier (à gauche) et un *L. catta* (à droite) (Umhang et al., 2016c).

Le génotypage avec le microsatellite EmsB a pu être réalisé pour 15 vers provenant des 3 renards infestés ainsi que pour tous les hôtes intermédiaires captifs ou sauvages diagnostiqués comme atteints, à l'exception d'un *M. glareolus*. Parmi les six profils EmsB obtenus, trois profils ont été identifiés chez les animaux captifs (trois lémuriers et le ragondin). Des échantillons provenant de la faune sauvage (renards, rongeurs) obtenus à l'intérieur du parc ont également été testés avec observation de chacun de ces trois profils (Figure 37). Le parasite issu du ragondin partage le même profil que six vers collectés chez deux renards. Le premier cas de lémurien (Lemur_1) a donné lieu au même profil EmsB que celui obtenu à partir de deux rongeurs piégés à plusieurs centaines de mètres des enclos voisins des lémuriers et des ragondins. Le même profil EmsB a été identifié pour les parasites provenant des deux autres lémuriers (Lemur_1, Lemur_2) et de deux rongeurs capturés à l'opposé du parc, ainsi que pour huit vers provenant des trois renards sauvages tirés dans le parc.

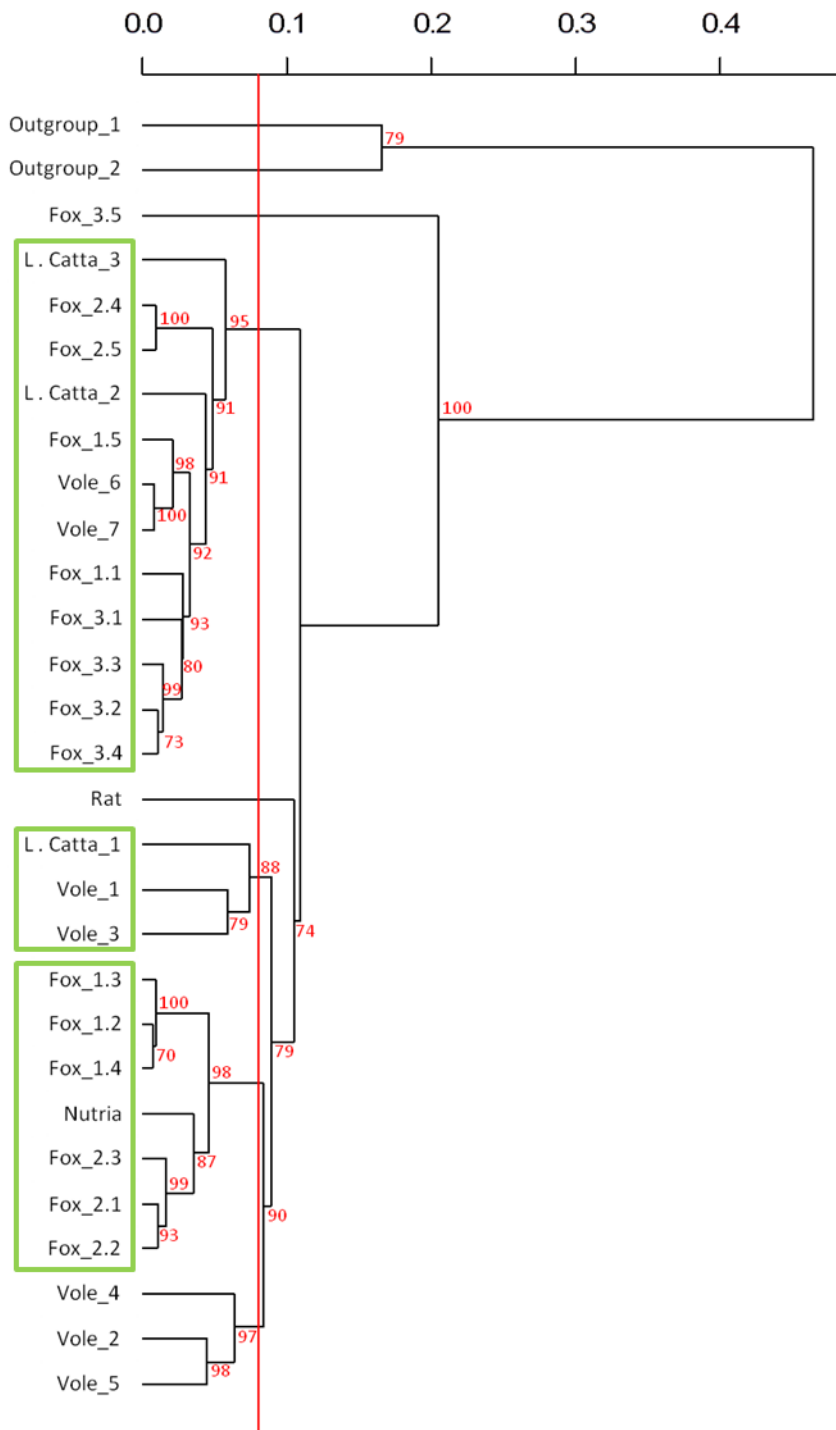


Figure 37 : Dendrogramme construit à partir de données obtenues par le génotypage EmsB des échantillons d'*E. multilocularis* provenant des animaux captifs (ragondin et lémuriens) du parc ainsi que de la faune sauvage environnante (renards et rongeurs). Les valeurs de bootstrap (%) calculées avec 1000 répétitions sont indiquées à chaque nœud. Deux échantillons d'*E. granulosus* s.s. ont été utilisés comme exogroupe.

Discussion :

Au cours de cette surveillance de l'infestation par *E. multilocularis* dans le parc animalier, le parasite a été identifié dans le parc à la fois chez des hôtes intermédiaires et définitifs, qu'ils soient sauvages ou captifs. La prévalence d'*E. multilocularis* dans les fèces de renards est similaire à l'intérieur et à l'extérieur du parc avec des valeurs conformes à ce qui pouvait être supposé, compte tenu des niveaux connus de prévalence au niveau départemental. Cela est cohérent avec l'observation de renards infestés qui s'introduisent dans le parc. Néanmoins, la densité de renards et de fèces étant moindre dans le parc, il en résulte une contamination

environnementale probablement plus faible qu'à l'extérieur. Si les renards peuvent s'infester à l'extérieur du parc, la forte prévalence observée chez les rongeurs piégés au sein du parc milite fortement en faveur d'une infestation concernant également les rongeurs vivant à l'intérieur. Tous ces éléments montrent qu'il est potentiellement possible qu'un cycle totalement sylvaïque se réalise au sein même du parc. Dans ce contexte, la population de rongeurs constitue une bonne sentinelle de la contamination en œufs d'*E. multilocularis* dans le parc. En l'absence dans le parc des deux espèces principales de rongeurs généralement impliquées dans la transmission du parasite que sont *Arvicola shermann* et *Microtus arvalis*, une forte prévalence d'infestation a été observée chez des espèces d'importance habituellement très mineure, *M. glareolus* et *M. agrestis*. La présence de protoscolex chez deux *M. glareolus* confirme pourtant son rôle d'hôte intermédiaire potentiel dans le parc et contribue à souligner la nécessité de la réévaluation de la sensibilité vis-à-vis d'*E. multilocularis* de plusieurs espèces de rongeurs (Woolsey et al., 2015).

L'infestation de loups gris d'Europe par *E. multilocularis* avait déjà été décrite (Bargade et al., 2009; Martínek et al., 2001) mais il s'agit du premier cas chez un animal captif. Cela est d'autant plus intéressant que classiquement les cas décrits d'animaux captifs ne concernent quasi exclusivement que des hôtes intermédiaires infestés suite à la consommation d'œufs microscopiques. En effet, la contamination d'un hôte définitif nécessite la consommation du stade larvaire du parasite, c'est-à-dire généralement la prédation d'un rongeur infesté. Dans le cas du parc, l'enclos des loups gris est en bordure d'une zone forestière où des rongeurs infestés ont été observés. Comme les enclos des autres carnivores du parc sont potentiellement aussi accessibles aux rongeurs, le risque d'infestation potentielle des autres hôtes définitifs captifs potentiels est à prendre en compte même si il apparaît comme rare.

Suite à l'infestation d'un ragondin, tous les autres cas chez les hôtes intermédiaires captifs ont été observés chez des maki catta. Curieusement, aucune des deux autres espèces de lémuriers (*Eulemur rubiventris* et *Varecia rubra*) n'a été infestée alors qu'ils vivent tous sur la même île et sont tous arrivés au parc la même semaine. Si les maki catta apparaissent comme extrêmement sensibles au parasite avec des infestations très étendues notamment en comparaison du gorille ou de l'Homme (Kondo et al., 1996), aucune donnée comparative n'est disponible avec les autres espèces de lémuriers. Si un cas d'*E. equinus* chez un *V. rubra* a été décrit au Royaume-Uni (Boufana et al., 2014), la majorité des cas rapportés d'infestation par des échinocoques ou même des espèces du genre *Taenia* concerne des maki catta (Boufana et al., 2014; De Liberato et al., 2014; Deplazes and Eckert, 2001; Kondo et al., 1996; Luzon et al., 2010; Palotay and Uno, 1975; Shock et al., 2010). Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'il s'agit de l'espèce de lémurien la plus répandue dans les zoos et parc animaliers en Europe, cependant dans le cas de ce parc deux autres espèces de lémuriers avec la même durée d'exposition étaient présentes. Une autre hypothèse pouvant être avancée est que les maki catta sont l'espèce qui passe le plus de temps au sol, même en liberté, et ont donc un comportement plus propice à la contamination par les œufs d'*E. multilocularis*.

7.3. Caractérisation du cycle d'*E. canadensis* (G6-7) en Corse

S. Grech-Angelini, **G. Umhang**, C. Richomme, O. Maestrini, C. Peytavin de Garam, J.-M. Boucher, D. Van Cauteren, F. Grenouillet, F. Casabianca, F. Boué. Échinococcose kystique en Corse : identification d'*Echinococcus canadensis* chez le chien. Bulletin Épidémiologique, Santé Animale et Alimentation, 2015, (69), 27.

Introduction :

Les précédentes études de surveillance d'*E. granulosus s.l.* menées en Corse avaient révélé une prévalence importante d'*E. canadensis* (G6-7) chez les porcs (5,4 %) et les sangliers (4,0 %) (Umhang et al., 2014f). Cette espèce parasitaire n'a pas été identifiée sur le reste du territoire national, alors que la présence pourtant suspectée d'*E. granulosus s.s.* en Corse n'a pas été confirmée (Umhang et al., 2013c; Umhang et al., 2014c). La forte présence d'infestation des suidés par *E. canadensis* sur l'île s'explique par le mode d'élevage en parcours libre de ces animaux ainsi que par la fréquence de l'abattage en dehors des abattoirs règlementaires entraînant

une disponibilité potentielle des viscères infestées (Umhang et al., 2014c). Le maintien du cycle parasitaire nécessitant l'intervention d'un hôte définitif, une étude a été mise en place en collaboration avec l'INRA de Corte afin d'échantillonner des fèces de chiens de chasse supposés être les principaux responsables de la contamination environnementale et d'estimer la prévalence insulaire d'*E. granulosus s.l.*

Matériel et méthodes :

Une campagne de collecte des fèces de chiens s'est déroulée de septembre 2013 à mars 2014, dans 30 communes concernées par l'élevage porcin, situées en Haute-Corse et Corse-du-Sud dans un rayon d'une vingtaine de kilomètres autour de Corte. Hormis les chiens de compagnie vivant exclusivement en ville, la très grande majorité des chiens ayant un contact potentiel avec des porcs et des sangliers sont des chiens de chasse, jouant pour certains également le rôle de chien de ferme. Les selles ont été collectées majoritairement dans les chenils des chiens de chasse mais aussi en cliniques vétérinaires lorsque les animaux étaient hospitalisés suite à des accidents de chasse. Dans la perspective de pouvoir mettre en évidence *E. granulosus s.s.* et *E. canadensis* (G6-7), une PCR multiplex temps réel pour la détection de ces deux espèces a été mise au point au LNR. A chacune des espèces correspondait un couple d'amorces et une sonde de type TAQMAN avec un fluorochrome spécifique. En plus, un contrôle interne de l'amplification sous la forme d'un plasmide contenant une séquence amplifiée par les amorces d'*E. granulosus s.s.* mais avec une sonde spécifique était également ajoutée à cette qPCR multiplex. En parallèle, la présence de parasites du genre *Taenia sp.* a été recherchée à l'aide de la PCR simplex dédiée Cest4-5 (Trachsel et al., 2007).

Résultats et discussion :

Au total, 259 chiens ont été échantillonnés, 86 % étaient des adultes (âge supérieur à un an) et 60 % des mâles. Les chiens de chasse représentaient 96 % de l'échantillonnage, 4 % des chiens étant exclusivement des chiens de ferme, et 19 % vivaient sur le site d'une exploitation porcine. La présence de l'ADN d'*E. canadensis* (G6-7) a été mise en évidence dans les selles de trois chiens de chasse corses (1,2 %, IC_{95%} : [0,2-3,3%]) dont un vivant sur une exploitation porcine. Des infestations à *T. ovis* et *T. hydatigena* ont été identifiées dans un échantillon chacune et aucun cas d'infestation par *E. granulosus s.s.* n'a pu être observé. Cette étude est la première à fournir un génotypage d'*E. granulosus s.l.* chez le chien en France, et plus précisément en Corse. Compte tenu du faible nombre de chiens ayant fourni un résultat positif, la recherche de facteurs associés à la présence d'*E. canadensis* chez le chien n'a pas été possible, mais des entretiens réalisés auprès des propriétaires ont montré que certaines pratiques d'élevage étaient clairement à risque, s'agissant de l'entretien du cycle parasitaire. En effet, 33 % des chiens échantillonnés étaient nourris avec une alimentation contenant des abats de porcs ou de sangliers, 60 % n'étaient vermifugés au mieux qu'une fois par an et 68 % des propriétaires de ces chiens abandonnent régulièrement les carcasses de porcs ou de sangliers chassés dans la nature. Étant donné la relative homogénéité de la prévalence de l'hydatidose porcine observée sur l'île (Umhang et al., 2014c; Umhang et al., 2014f), il n'est pas interdit d'envisager que la prévalence canine soit comparable dans des zones d'élevage porcin non échantillonnées, mais présentant des pratiques similaires d'abandon dans la nature des déchets d'abattage de porcs et sangliers (voir ci-après).

Aucune infestation par *E. granulosus s.s.* n'a été observée chez les chiens de l'étude, étayant les données précédemment obtenues qui n'ont pas permis d'observer la présence dans l'île de cette espèce parasitaire chez les hôtes intermédiaires alors qu'elle est majoritaire en France continentale et en Sardaigne (Umhang et al., 2013c; Umhang et al., 2014f; Varcasia et al., 2006). Le chien et le renard (*Vulpes vulpes*) sont les deux carnivores hôtes définitifs potentiels d'*E. granulosus s.l.*, présents en Corse. Le renard est décrit comme un hôte définitif possible uniquement pour *E. granulosus s.s.* (McManus, 2013), le chien apparaît donc bien ici comme l'hôte définitif, très certainement principal (voire exclusif), dans le cycle d'*E. canadensis* en Corse. En l'état actuel de nos connaissances sur l'épidémiologie de l'infestation par *E. granulosus s.l.* en Corse, la recommandation d'une vermifugation plus fréquente des chiens (au moins quatre fois par an), et surtout une limitation stricte de l'accès des chiens aux viscères d'animaux (notamment par le passage systématique des

porcs en abattoir), restent les deux conditions nécessaires pour envisager une diminution de la présence du parasite sur l'île.

8. Expérimentation de méthodes de lutte contre *E. multilocularis*

Les données de prévalence obtenues pour *E. granulosus s.l.* en France ne démontrent pas la nécessité de mettre en place une lutte contre ce parasite, hormis en Corse où la prévention auprès des propriétaires de chiens et des éleveurs porcins pourrait déjà faire chuter drastiquement le niveau d'endémie. Par contre s'agissant d'*E. multilocularis*, les fortes prévalences observées et le fait que le cycle soit principalement sylvatique limitent grandement l'effet de la prévention au niveau de la contamination environnementale. Ainsi, en collaboration avec l'ELIZ et l'UFC, le LNR a pu expérimenter deux méthodes de lutte contre *E. multilocularis* ciblant le renard mais par deux approches différentes : une approche médicale, le traitement antihelminthique et une approche sanitaire, la régulation de la population par abattage. Un autre aspect de la lutte consiste également dans la mise en place d'un traitement ciblant des hôtes intermédiaires, et qui peut se justifier dès lors qu'il s'agit d'espèces particulières, notamment en captivité.

8.1. Vermifugation des renards en zone urbaine : résultats contrastés dans deux villes de taille moyenne

Comte, S., Raton, V., Raoul, F., Hegglin, D., Giraudoux, P., Deplazes, P., Favier, S., Gottschek, D., **Umhang, G.**, Boué, F., Combes B. Fox baiting against *Echinococcus multilocularis*: contrasted achievements among two medium size cities. Preventive Veterinary Medicine, 2013, 111(1-2), 147-155.

Introduction :

Des études ont démontré en France et en Suisse l'existence d'un gradient croissant de prévalence d'infestation par *E. multilocularis* chez le renard, des zones urbaines de faible enzootie aux zones rurales de forte enzootie (Fischer et al., 2005; Hegglin et al., 2007; Robardet et al., 2008). La présence du parasite en milieu urbain et péri-urbain dans des zones de forte densité humaine où le contact avec le parasite est plus probable, a nécessité le développement de méthodes de lutte contre *E. multilocularis* (Deplazes et al., 2004; Reperant et al., 2007). Pendant plusieurs années, des études ont été menées sur la vermifugation des renards par la distribution d'appâts contenant du praziquantel, en se basant sur le succès des campagnes antirabiques. Des résultats prometteurs ont été obtenus suite aux premières campagnes réalisées à grande échelle en Allemagne (Schelling et al., 1997; Tackmann et al., 2001). Par la suite, des tests concluants ont été réalisés en Suisse et au Japon à une échelle géographique réduite correspondant à quelques villages ou petites villes (Hegglin, Ward, and Deplazes, 2003; Hegglin and Deplazes, 2008; Inoue et al., 2007). Aucune étude n'avait été réalisée dans des villes de taille moyenne (moins de 100 000 habitants) pourtant très répandues, sans intervention périphérique plus large. A cette échelle, l'interaction entre les populations vulpines, urbaines et rurales, est plus importante que dans les grandes villes et elle peut augmenter la fréquence de re-contamination des renards, ce qui risque de diminuer l'efficacité de cette stratégie thérapeutique. De plus, aucune des études précédentes n'avait estimé le coût financier de telles opérations de vermifugation par distribution d'appâts, alors que l'analyse du rapport coût/bénéfice paraît indispensable aux preneurs de décisions pour la mise en place de telles mesures.

Matériel et méthodes :

Zones d'étude :

Les deux communes d'Annemasse (74) et de Pontarlier (25) ont été choisies en raison de leur nombre d'habitants et de leur situation en zone de forte enzootie vulpine (autour de 50 %). Bien que les deux zones d'études présentent une forte densité de constructions immobilières au centre entourées par une plus faible densité de quartiers résidentiels et commerciaux, la surface des constructions couvre 46 % de la superficie totale pour Annemasse et seulement 18 % pour Pontarlier. Les zones de prairies, qui constituent les biotopes préférentiels pour les hôtes intermédiaires du parasite, sont faiblement représentées à Annemasse (2 %), étant principalement constituées de petites zones disséminées. Au contraire, la commune de Pontarlier est entourée de grands prés et prairies (18 %) se prolongeant bien au-delà de la zone traitée.

Distribution et suivi de la consommation des appâts :

Durant 32 mois, d'août 2006 à mars 2009, 14 campagnes de distribution d'appâts ont été réalisées suivant un planning basé sur l'écologie des hôtes et du parasite. Chaque année, deux campagnes ont été réalisées en août et septembre avant le début de l'immigration des renardeaux. Deux autres campagnes ont eu lieu en janvier et mars afin de limiter le niveau de contamination environnementale au printemps, lorsque les populations de rongeurs commencent à augmenter. Une cinquième campagne annuelle a eu lieu en juin, lorsque les renardeaux commençaient à prendre leur indépendance pour la prédation de rongeurs. Les zones traitées correspondaient dans chaque commune à 33 parcelles agglomérées de 1 km² centrées sur la partie urbaine de la ville en essayant d'éviter autant que possible les zones forestières (Figure 38). A chaque campagne, 40 appâts par parcelle étaient distribués en voiture ou à pied de la façon la plus homogène possible, à raison de 4 jours par commune. Un suivi de la consommation des appâts a été réalisé sur deux parcelles par commune, une en zone urbaine et l'autre en zone péri-urbaine. Un relevé de la présence/absence des appâts après distribution a été effectué et des pièges photos ont été utilisés pour identifier les espèces animales concernées.

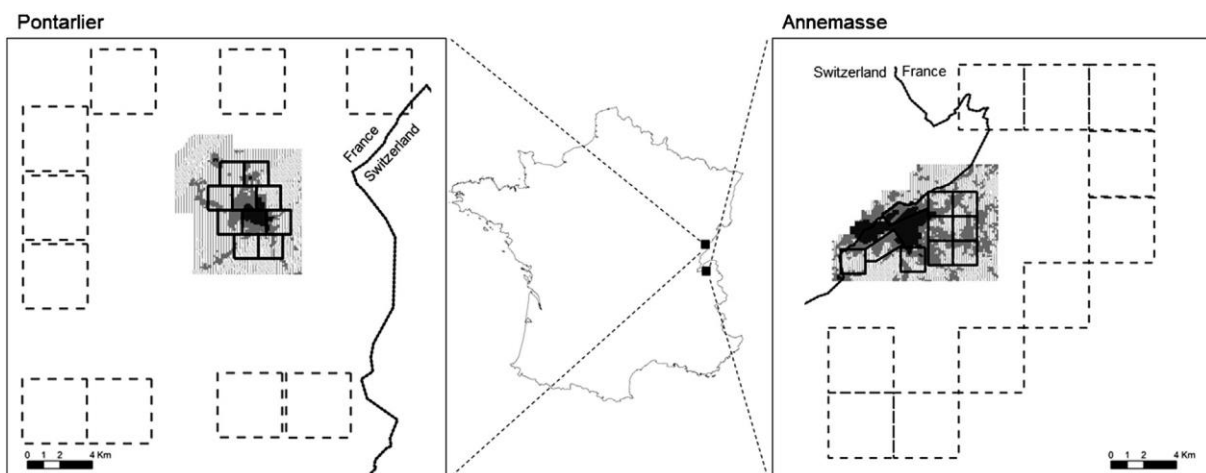


Figure 38 : Localisation des parcelles d'échantillonnage des fèces de renards. Les lignes pleines correspondent aux 10 parcelles de 1,5 km de côté de la zone traitée. Les lignes en pointillés correspondent aux 10 parcelles de 4 km de côté servant de contrôle et réparties autour de la zone traitée.

Suivi de la prévalence d'*E. multilocularis* à partir de l'analyse par copro-ELISA de fèces de renards :

Le niveau de contamination environnementale par les œufs d'*E. multilocularis* a été suivi par la collecte puis l'analyse de fèces de renards au printemps et en automne 2006 (avant la distribution d'appâts) jusqu'à avril 2009, durant 7 campagnes de collecte (Figure 39). Dix parcelles de 1,5 km de côté ont été définies dans les zones traitées des deux communes. Cinq fèces ont été collectées dans chacune de ces parcelles à chaque campagne. Cinq fèces ont également été collectées dans des parcelles de 4 km de côté au sein de zones contrôle non traitées, en zone rurale périphérique de la zone de traitement et composée majoritairement de terrains ouverts et de forêts (Figure 38). A chacune des campagnes de collecte, 100 fèces étaient analysés par copro-ELISA à l'institut de parasitologie de l'université de Zürich (Deplazes et al., 1999). Cette méthode d'analyse avait déjà été utilisée avec succès pour démontrer la présence de gradients de contamination environnementale à l'échelle régionale et locale (Pleydell et al., 2004; Raoul et al., 2001; Stieger et al., 2002), ainsi que pour déterminer l'efficacité de campagnes de traitement au praziquantel par distribution d'appâts en milieu urbain (Hegglin and Deplazes, 2008). De plus, cette méthode d'analyse non invasive n'a pas d'impact sur la population de renards au contraire des méthodes classiques d'analyse d'intestins.

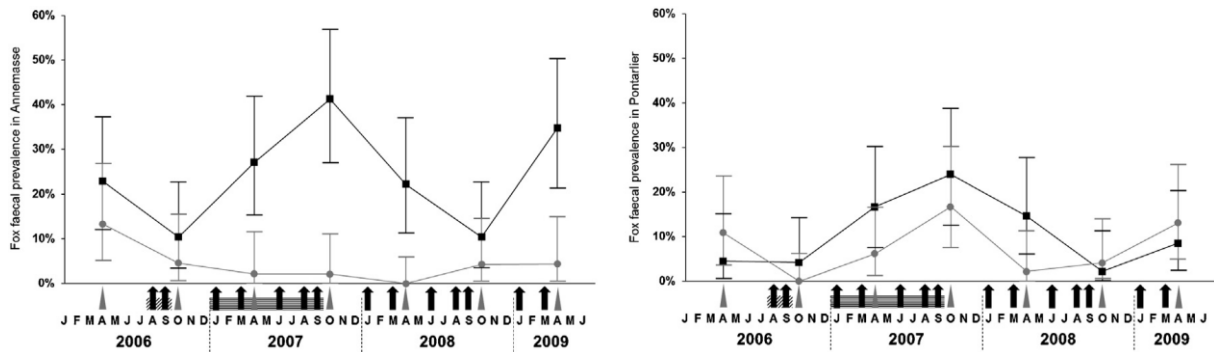


Figure 39 : Evolution de la prévalence d'infestation par *E. multilocularis* estimée à partir de l'analyse par corpo-ELISA de fèces de renards à Annemasse (à gauche) et Pontarlier (à droite). Les zones traitées sont représentées par des cercles gris et les zones de contrôle par des carrés noirs avec les intervalles de confiance respectifs représentés par les barres verticales. Les périodes de distributions des appâts sont représentées par les flèches noires, les collectes de fèces par les triangles gris, la période de suivi de consommation des appâts par piège photo avec des rayures en diagonale et par observation directe par des rayures horizontales.

Résultats :

Le taux de consommation d'appâts était élevé, de 93,6 % (IC : 86,4-100) en zone péri-urbaine et 78,9 % en zone urbaine (IC_{95%} : 77,2-100%). Les renards étaient l'espèce la plus photographiée et aussi les consommateurs principaux des appâts avec la fouine, responsable chacun de la consommation de 40 % des appâts.

En comparaison avec la zone de contrôle, la prévalence dans la zone traitée à Annemasse a diminué suite au traitement pour se stabiliser autour de 5 % jusqu'à la fin de l'étude (Figure 39). Une comparaison avant/après traitement de la prévalence fécale à Annemasse suggère une diminution de la contamination printanière de 13,3 % en 2006 à 2,2 % sur la période 2007-2009. Au contraire à Pontarlier, aucun effet significatif du traitement n'a pu être observé, avec une évolution similaire au cours du temps de la prévalence entre les deux zones pour une prévalence globale de 9,1 %.

Discussion :

La consommation moindre des appâts en zone urbaine par rapport aux zones péri-urbaine peut s'expliquer par la plus grande disponibilité de nourriture d'origine anthropogénique en ville (Contesse et al., 2004). Cependant, les taux de consommation, la densité des appâts (40/km²) et leur distribution homogène semblent bien adaptés à des communes de taille moyenne. Afin d'évaluer l'efficacité du traitement, la comparaison de la prévalence de l'infestation par *E. multilocularis* entre les zones traitées et non-traitées doit être relativisée en tenant compte de facteurs de confusion (densité d'hôtes, conditions de survie des œufs...). Différentes études en milieu rural et urbain ont démontré l'impact de la diminution de la densité des renards ou des rongeurs (principalement *A. terrestris* et *M. arvalis*) sur la diminution de la prévalence d'*E. multilocularis*. A partir des tableaux de chasse de la période concernée, une diminution de la population de renards a été observée à Annemasse alors qu'elle est restée stable à Pontarlier. De plus, une plus forte présence de rongeurs autour de Pontarlier laisse supposer l'existence de conditions plus favorables pour le cycle d'*E. multilocularis* (Raoul et al., 2003; Raoul et al., 2010). La plus forte densité de rongeurs observée à Pontarlier notamment sur des vastes zones de prairies qui s'étendent au-delà de la zone traitée ainsi que la plus faible taille de la ville de Pontarlier pourraient expliquer la présence de renards non traités au sein de la zone urbaine traitée. Le maintien du parasite serait alors facilité, ce qui pourrait expliquer au moins en partie l'absence d'impact des campagnes de vermifugation sur la prévalence.

Seule une collecte de fèces et donc des données de prévalence d'infestation par *E. multilocularis* avant traitement sont disponibles. La variation saisonnière et interannuelle de la prévalence d'infestation par le parasite pourrait remettre en cause l'efficacité de la vermifugation à Annemasse. Toutefois, la diminution observée au printemps 2006 et l'absence de pics saisonniers en de 2007 à 2009 comme observé dans la zone contrôle argumente en faveur d'une efficacité du traitement.

Le coût d'une telle opération de prophylaxie envers un parasite responsable d'une zoonose grave apparaît souvent comme l'élément principal de décision par les autorités sanitaires. Les résultats de cette étude démontrent que le contrôle du parasite est possible mais nécessite d'être adapté à chaque situation. Le coût a été estimé à 117 895 € par commune mais peut être réduit de 40 % si du personnel technique local (employés communaux par exemple) réalise la distribution des appâts, qui ne nécessite pas de connaissances techniques particulières. Une autre option peut consister à se focaliser uniquement sur la prophylaxie, sans collecte ni analyse de fèces, pour atteindre un coût de 52 754 € par commune, correspondant à une somme de 114 € par km² traité. Ces dépenses sont à mettre en parallèle avec le coût de traitement moyen d'un patient atteint d'échinococcose alvéolaire estimé en Suisse à 108 762 € (IC: 48 302-178 568€). Le but final des expérimentations de vermifugation est de réduire les risques de contamination humaine par le parasite. Il est donc nécessaire de considérer ce rapport coût-bénéfice pour la société associé à la réduction du nombre de cas humains dans la zone considérée. Cependant, il est à noter que seul est connu le lieu de résidence des cas humains qui ne correspond pas forcément aux zones de contamination.

8.2. Régulation de la population vulpine

Comte S., **Umhang G.**, Raton V., Raoul F., Giraudoux P., Boué, F., Combes B. *Echinococcus multilocularis* management by fox culling: an inappropriate paradigm. Soumis à Preventive Veterinary Medicine en octobre 2016.

Introduction :

La menace grandissante représentée par l'échinococcose alvéolaire en Europe a conduit à une amélioration des techniques de diagnostic et de traitement des cas humains. Cependant, il apparaît nécessaire d'envisager la mise en place de méthodes de lutte afin d'interrompre le cycle parasitaire. Si les œufs sont le stade infectieux pour l'homme, ils ne peuvent constituer la cible d'une action de lutte à grande échelle, tout comme les rongeurs, en raison de la très faible prévalence chez ces micromammifères et de la dispersion géographique des hotspots (Giraudoux et al., 2002). Ainsi, le renard, hôte définitif principal et espèce majoritairement responsable de la contamination environnementale (Hegglin and Deplazes, 2013), constitue la cible prioritaire de la lutte contre *E. multilocularis*.

Plusieurs études ont démontré l'efficacité de la distribution d'appâts pour vermifuger les renards mais la prévalence de l'infestation chez cette espèce tend à retrouver rapidement son niveau initial dès lors que le traitement est interrompu (Hegglin and Deplazes, 2008; Romig et al., 2007). Dans ce contexte, la régulation sanitaire des populations de renards est une solution souvent utilisée pour lutter contre l'échinococcose alvéolaire, notamment par les associations de chasseurs. Des effets défavorables de cette approche comme l'augmentation de la dispersion des individus et l'obtention d'une éradication locale non représentative de la réalité de l'éradication des renards à l'échelle de la zone réellement infectée ont pu être constatés lors de l'épizootie de rage dans les années 1990. Par contre, une diminution soudaine de la population vulpine due à un empoisonnement indirect (effet collatéral du contrôle des populations de rongeurs par l'utilisation de la bromadiolone) avait alors permis d'observer une forte diminution de la prévalence d'infestation par *E. multilocularis* chez le renard (Raoul et al., 2003).

La mise en évidence de renards infestés en zone urbaine dans la Communauté Urbaine du Grand Nancy (CUGN) (Robardet et al., 2008) a alerté la population et les autorités locales sur l'existence d'un risque zoonotique. Une régulation de la population vulpine a été souhaitée par les autorités de la CUGN. Afin de pouvoir évaluer l'efficacité d'un tel dispositif, une collaboration entre le LNR, l'ELIZ et l'UFC a été mise en place pour proposer un projet de régulation sanitaire de la population vulpine afin de lutter contre *E. multilocularis*, ce qui n'avait jusqu'à présent jamais été testé ailleurs à une telle échelle.

Matériel et méthodes :

La ville de Nancy (15 km², 430 000 habitants) se situe en zone de forte enzootie pour *E. multilocularis*, avec une prévalence départementale estimée à 54 % chez le renard (Combes et al., 2012). Une zone d'étude a été

délimitée par un cercle de 20 km de rayon autour du centre de la ville. Cette zone a été divisée en deux parties, nord et sud, par l'autoroute A31 et le canal de la Marne au Rhin. Au nord, une régulation intense de la population vulpine a été réalisée alors qu'au sud aucune modification sur les activités de chasse et de piégeage ne l'a été. Une grille d'échantillonnage (carré de 3x3 km) a été superposée sur cette zone, aboutissant à 77 parcelles au nord et 65 au sud (

Figure 40).

En France, le renard est considéré comme une espèce nuisible et peut donc être chassé toute l'année. Les chasseurs et piégeurs concernés de la zone nord ont été contactés afin d'augmenter leur effort de prélèvement alors que les lieutenants de louveteries et les agents de l'ELIZ ont eu l'autorisation administrative d'y réaliser des tirs de nuit. D'octobre 2008 à avril 2012, chaque renard tué devait être ramené au LNR, identifié par son numéro de parcelle afin d'être pesé et sexé et d'être soumis à une estimation de l'âge par une analyse de coupe de dents. Aucune consigne particulière sur l'âge ou le sexe des renards n'avait été donnée, permettant de considérer que l'échantillonnage obtenu était représentatif de la population. Le suivi de la prévalence d'*E. multilocularis* a été réalisé durant l'hiver (octobre à avril) par l'analyse des intestins de renards par la technique SSCT développée par le LNR (Umhang et al., 2011). Dans la zone nord, le premier renard tué de chaque parcelle a ainsi été analysé, alors qu'un renard par parcelle a été prélevé dans la zone sud afin de pouvoir établir les comparaisons. Le niveau d'abondance relative des renards au cours des quatre années a été estimé par la réalisation de quatre sessions de comptage aux phares dans chacune des deux zones.

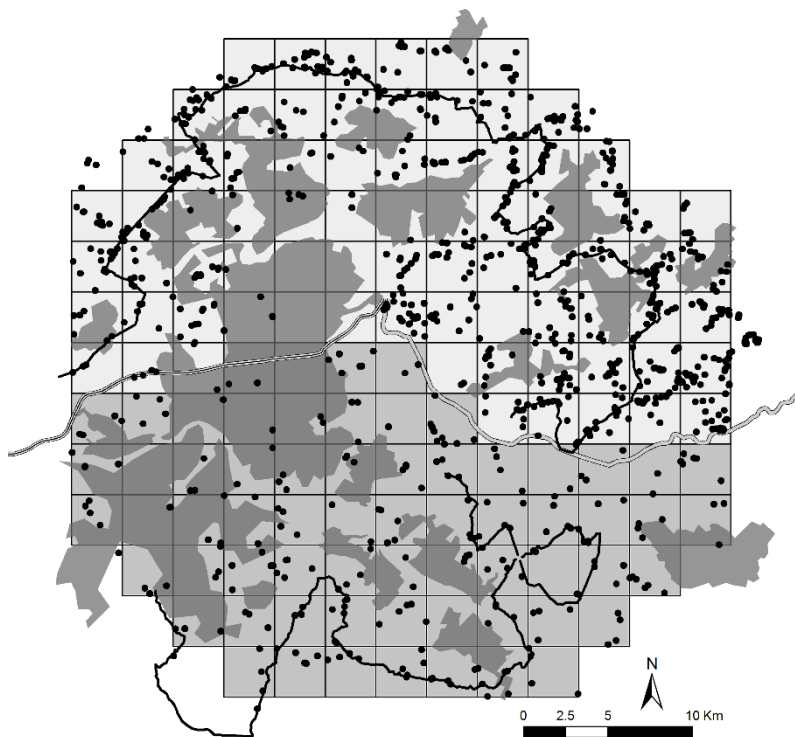


Figure 40 : Représentation de la zone d'étude avec les différentes parcelles dans les zones nord (gris clair) et sud (gris foncé). La présence de zones forestières est indiquée dans la plus sombre nuance de gris. Les deux tracés noirs correspondent aux circuits des comptages aux phares réalisés dans les deux zones. Chaque point noir correspond à un renard abattu dans le cadre de l'étude.

Résultats :

Au total, 827 renards ont été tués dont la majorité par tir de nuit (89,3 %). La faible activité de piégeage et de chasse (8,7 %) démontre le peu d'intérêt des acteurs locaux et s'est avérée stable tout au long de l'étude, aboutissant à considérer uniquement les 776 renards tués en tirs de nuit comme correspondant à l'effort de

régulation. Aucun effet significatif de la régulation sur les niveaux de populations de renards n'a pu être mis en évidence entre les zones et au cours du temps à partir des données de comptage aux phares.

Pour le suivi de la prévalence d'infestation vulpine par *E. multilocularis*, une moyenne annuelle de couverture de 84 % des prélèvements a pu être obtenue par rapport au nombre attendu et les résultats ont été analysés sur les deux zones. La première année correspondait au niveau initial de la prévalence avant la régulation et aucune différence significative (chi-deux=0,5; p=0,7267) de prévalence entre la zone régulée (39,7 %, IC_{95%} : 27,1 %-53,4 %) et la zone contrôle (44,6 %, IC_{95%} : 31,3 %-58,5 %) n'a été observée. Durant les trois années qui ont suivi, aucune variation (p=0,9289) n'a eu lieu dans la zone de contrôle, avec une moyenne de 42,1 % (IC_{95%} : 35,5 %-48,9 %) de renards infestés. Concernant la zone régulée, la prévalence d'infestation par le parasite a été stable durant la seconde et la troisième année (chi-deux=0,9; p=0,3414) avant de significativement augmenter la dernière année (chi-deux=8,6; p=0,0034) pour atteindre 55,4 % (IC_{95%} : 42,5 %-67,7 %). Comme précédemment décrit, la charge parasitaire des renards infestés a été extrêmement variable (de 1 à 123 300 vers), avec trois des renards représentant près de la moitié de la charge parasitaire globale (47,6 %). Les renards juvéniles étaient parasités par 2,59 fois plus de vers que les renards adultes.

Discussion :

Dans cette étude, non seulement la prévalence d'infestation par *E. multilocularis* chez le renard n'a pas diminué mais elle a même augmenté durant la dernière année. Malgré l'utilisation de tous les moyens disponibles (piégeage, chasse, tirs de nuit) pour éliminer des renards, aucune diminution de la population vulpine n'a pu être constatée. Dans le contexte actuel de restrictions économiques, il paraît peu envisageable de déployer une activité plus importante de régulation à cette échelle géographique, ce qui serait pourtant indispensable afin de pouvoir juger d'un effet potentiel d'une diminution de la population de l'hôte définitif sur la prévalence d'infestation par le parasite. De plus, un effort de régulation plus important pourrait aussi poser des questions éthiques.

La régulation des renards laissant libres certains territoires y a probablement entraîné l'immigration de renards provenant de l'extérieur de la zone d'étude mais a aussi pu faciliter la dispersion des jeunes renards de la zone. Étant donné le fort impact de cette catégorie de population sur la contamination environnementale en raison de leur forte charge parasitaire, cela pourrait expliquer en partie le maintien de la prévalence d'infestation par *E. multilocularis* voire l'augmentation lors de la dernière année.

Les résultats obtenus dans cette étude démontrent la difficulté de la mise en place d'une régulation de la population vulpine et les effets contraires que cela peut provoquer sur la prévalence d'infestation des renards par *E. multilocularis*. À l'image des échecs systématiques de cette approche sur le long terme pour l'éradication de la rage, la lutte contre l'échinococcose alvéolaire ne doit pas constituer un argument pour justifier une régulation de la population vulpine. À ce jour, la prévention et la distribution d'appâts pour vermifuger les renards constituent les solutions de lutte les plus envisageables.

8.3. Lutte et traitement d'hôtes intermédiaires captifs

Umhang G. , Lahoreau J., Hormaz V., Boucher J-M., Guenon A., Montange D., Grenouillet F., Boué F. Surveillance and control of <i>Echinococcus multilocularis</i> in a wildlife park. <i>Parasitology International</i> , 2016, 65(3), 245-250.

Introduction :

En août 2012, 16 mois après la découverte d'un ragondin captif infesté par *E. multilocularis* au parc de Sainte-Croix, l'autopsie d'un maki catta (*Lemur catta*) avait révélé également la présence d'une infestation par ce parasite (Umhang et al., 2013a). L'ensemble des lémuriers du parc (11 *L. catta*, 4 *Varecia rubra* et 3 *Eulemur rubiventer*) résidant tous sur la même île furent intégrés à la surveillance d'*E. multilocularis* mise en place. Les précédents cas décrits d'infestation par des échinocoques ou des espèces du genre *Taenia* chez des primates et des lémuriers avaient démontré un fort développement parasitaire très handicapant pour l'animal infesté, au

point d'être fatal (Kondo et al., 1996; Rehmann et al., 2005; Tappe et al., 2007; Yamano et al., 2014). Afin de prévenir au plus vite les effets d'une potentielle infestation des lémuriens, un protocole de suivi particulier a été mis en place grâce à la collaboration du CNR échinococcose alvéolaire du CHU de Besançon pour son expertise sur le diagnostic et le traitement du stade larvaire du parasite acquis chez l'humain.

Matériels et méthodes :

Premièrement, tous les lémuriens du parc ont été soumis à une palpation abdominale par la vétérinaire afin de détecter un potentiel élargissement au sein de l'abdomen. Ensuite, de décembre 2012 à janvier 2013, les 11 maki catta ont été transportés vers un cabinet vétérinaire spécialisé afin de pouvoir réaliser une échographie abdominale. Les autres lémuriens ont été soumis au même examen en juillet 2013. De novembre 2012 à février 2014, une surveillance sérologique des lémuriens a été mise en place. Une analyse rétrospective de sérums prélevés à l'arrivée au parc des lémuriens en mai 2011 ainsi qu'en février 2012, a été incluse afin de pouvoir estimer la période de séroconversion. L'analyse sérologique a été basée sur celle réalisée chez l'Homme en utilisant le test ELISA *E. granulosus* (Bordier Affinity) avec confirmation par un western blot commercial (LDBio Diagnostic). Seule une légère modification a été apportée, et qui a consisté à utiliser comme conjugué la protéine non spécifique A/G alcaline phosphatase en raison de l'absence d'antiglobulines spécifiques aux lémuriens.

En fonction des résultats obtenus, les lémuriens suspectés d'être infestés (lésions observées par échographie et sérologie positive) ont reçu un traitement à l'albendazole par voie orale à raison de 10 mg/kg/jour, en deux doses, déposées sur un morceau de banane. Les niveaux de sulfoxyde d'albendazole ont été suivis par une méthode HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) pour tous les animaux traités, en utilisant les sérums un an après le début du traitement et 4 heures après administration.

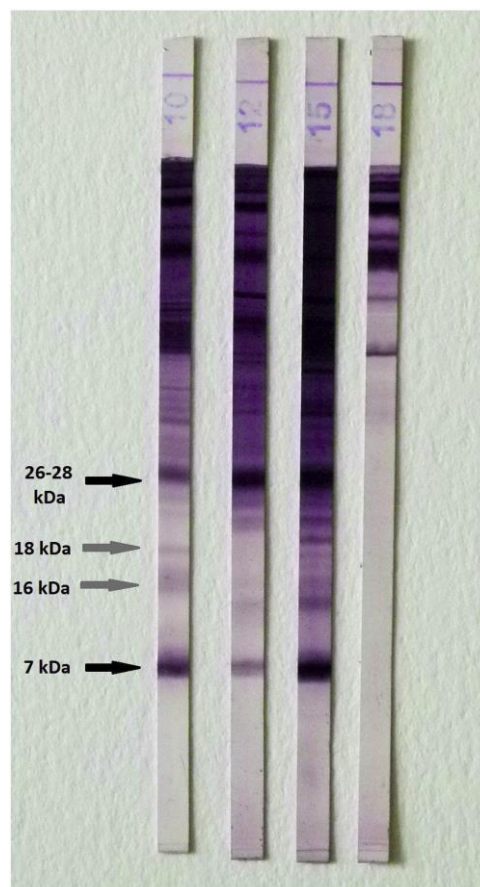


Figure 41 : Analyse par western blot des sérums de lémuriens en utilisant la protéine A/G comme conjugué. Bandelette 10 : contrôle positif (sérum d'un patient humain). Bandelette 12 et 15 : sérum de maki catta avec une échinococcose alvéolaire. Bandelette 18 : sérum de maki catta non infesté par *E. multilocularis*.

Résultats :

Des résultats fortement positifs ont été obtenus en ELISA chez le cas index ainsi que quatre autres maki catta. Une confirmation a été obtenue en western blot pour tous les cinq animaux avec la présence d'au moins trois bandes positives (bandes à 7 kDa et à 26-28 kDa pour tous les animaux, associées avec des bandes soit à 16-18 kDa soit à 17 kDa) (Figure 41). L'échographie abdominale des quatre maki catta encore en vie et séropositifs a mis en évidence la présence de pseudo-tumeurs et de pseudo-lésions hépatiques caractéristiques de l'échinococcose alvéolaire. L'analyse rétrospective des sérums de ces cinq maki catta lors de leur arrivée au parc s'est révélée négative, démontrant que la séroconversion avait eu lieu durant leur séjour au parc. Un autre maki catta était positif en ELISA mais ne fournissait qu'une faible bande à 26-28 kDa en western blot. Aucune lésion n'avait pu être observée pour cet animal à l'échographie.

Un traitement albendazole a été mis en place pour les quatre lémuriers infestés ainsi que pour cet autre maki catta. Toutefois, après un an de traitement à l'albendazole de ce cinquième lémurien, le traitement a été stoppé car les analyses sérologiques (ELISA et western blot) sont devenues négatives. La sérologie des quatre autres lémuriers n'a pas varié durant cette année de traitement. Le suivi du traitement à l'albendazole a démontré que l'absorption était optimale avec des niveaux de sulfoxyde d'albendazole compris entre 3,8 et 13,7 $\mu\text{mol/l}$. Aucun effet secondaire (hépatotoxicité ou alopécie) n'a été observé. Toutefois, en dépit de ce traitement, un des quatre maki catta a été retrouvé mort en septembre 2014 après avoir présenté une très nette baisse de forme et une apathie marquée. Les diagnostics moléculaire et histologique ont confirmé la présence du parasite qui s'était développé de façon extrêmement massive (cf. 7.2, Figure 36).

Discussion :

Les résultats de la surveillance globale d'*E. multilocularis* ainsi que ceux obtenus par l'analyse sérologique rétrospective des sérums de lémuriers ont permis de prouver que l'infestation avait eu lieu dans le parc, confirmant les résultats des analyses microsatellites EmsB. Des mesures de prévention ont été prises pour restreindre l'accès de l'île des lémuriers aux renards sauvages et pour ne pas nourrir les animaux avec des branches ayant été trainées sur le sol, ce qui était précédemment réalisé. En plus de la prévention, la lutte s'est également basée sur la mise en place d'un traitement individualisé à l'albendazole. Une bonne absorption de l'antiparasitaire a été constatée chez les lémuriers, avec des taux comparables à ceux observés chez l'humain (Brunetti et al., 2010). Les lémuriers n'ont pas eu d'effets secondaires apparents et le mode d'administration choisi *via* une tranche de banane a permis de rendre facile la prise du traitement. Toutefois, deux lémuriers sont morts durant la phase de traitement avec pour cause majeure les effets du développement larvaire d'*E. multilocularis*. En effet, les lémuriers et particulièrement l'espèce maki catta (*Lemur catta*) apparaissent comme très sensibles à l'infestation. Si le diagnostic et le traitement sont possibles, il apparaît indispensable d'anticiper le risque d'infestation lors de l'introduction de lémuriers dans des zoos ou parcs animalier en zone d'enzootie.

9. Discussion générale : bilan et perspectives

Au début des années 2000, on disposait d'une connaissance très partielle de la présence des différents échinocoques en France, avec peu de données obtenues à partir d'un nombre restreint d'études ponctuelles et à une échelle géographique généralement réduite. La désignation par la DGAI du LRFSN en tant que LNR *Echinococcus spp.* en 2006 a été déterminante pour bâtir une stratégie de reconquête de cette thématique à laquelle j'ai pu activement participer en tant qu'unique chargé de projet et responsable technique pour cette thématique.

L'absence de réelle surveillance des échinocoques avant cette date avait alors abouti à une situation similaire de forte méconnaissance des zones d'enzootie pour *E. multilocularis* et *E. granulosus* en France. Cela conduisait à des hypothèses quasi-opposées quant à la situation épidémiologique et aux enjeux de santé publique. Ainsi, une forte réduction supposée de la zone et du niveau d'enzootie pour *E. granulosus* laissait envisager un risque zoonotique moins présent voire désormais absent sur le territoire. Inversement, s'agissant d'*E. multilocularis*, l'expansion constatée en Europe et également suspectée en France nécessitait absolument de pouvoir disposer d'informations fiables et actualisées afin d'évaluer le risque zoonotique dans les différentes régions.

La stratégie mise en place a consisté à mener des études de surveillance à une large échelle géographique pour déterminer les zones et les niveaux d'enzootie, tout en progressant en parallèle dans le domaine de l'identification et de la caractérisation des différents cycles parasitaires existants, afin de mieux comprendre les facteurs de leur maintien. La mise au point de nouveaux outils de dépistage/diagnostic en parasitologie et en épidémiologie moléculaire a facilité la réalisation de ces études. Cela s'est concrétisé par l'obtention de données françaises inédites relatives à la prévalence chez différents hôtes ainsi qu'à la présence de différentes espèces parasitaires du complexe *E. granulosus s.l.* mais aussi par une meilleure appréhension des facteurs sous-jacents à la dynamique d'expansion ou de maintien des espèces d'échinocoques présentes en France.

9.1. Principaux apports sur le plan des données épidémiologiques

9.1.1. Surveillance de l'infestation par *E. multilocularis*

La zone d'enzootie actuellement connue pour *E. multilocularis* en France compte désormais 39 départements, alors qu'au début des années 2000 seule une dizaine était identifiée comme enzootique. Les études de surveillance réalisées ont démontré une large expansion de la répartition du parasite, qui s'étend du foyer historique du grand est vers les départements du nord, de l'Ille-et-Vilaine et des Hautes-Alpes (Figure 42) (Combes et al., 2012; Combes et al., 2013; Umhang et al., 2016b). Des études de l'ampleur de celle réalisée en France par analyse des intestins de renards (Combes et al., 2012), ont rarement été menées dans d'autres pays. Si la Pologne et la Hongrie ont réalisé plus récemment une étude nationale de ce type (Casulli et al., 2010; Karamon et al., 2014) cela n'a jamais été mis en œuvre dans d'autres pays d'Europe de l'ouest, notamment en Allemagne où les données de prévalence de l'infestation vulpine par *E. multilocularis* sont toujours manquantes au nord du pays. Cette étude paraissait d'autant plus pertinente que la limite ouest de la zone d'enzootie connue en Europe du parasite se situait en France. L'observation de cette expansion de la zone d'enzootie d'*E. multilocularis* en France (Combes et al., 2012; Umhang et al., 2016a) a été notamment possible grâce à la mobilisation du réseau de départements adhérents à l'ELIZ, permettant d'explorer pour la première fois des zones non précédemment connues comme enzootiques.

Cartographie de l'échinococcose alvéolaire chez le renard en France

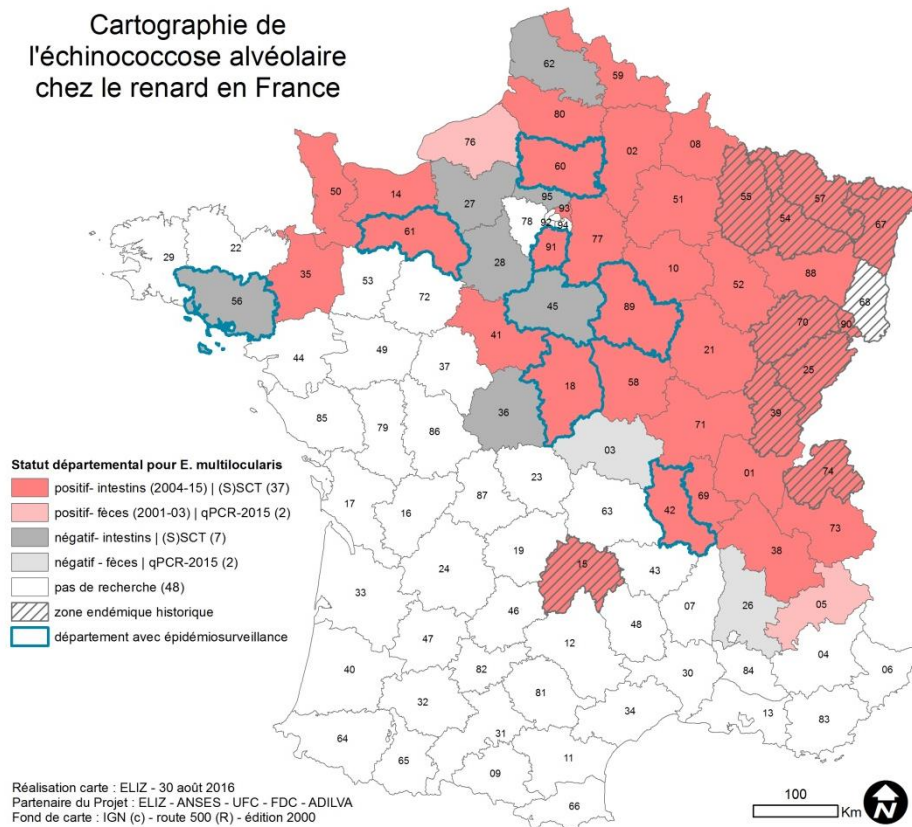


Figure 42 : Représentation des départements concernés par la surveillance de *E. multilocularis* en France.

La mise en évidence de cette expansion d'*E. multilocularis* en France a posé plusieurs questions, notamment celle de savoir quelles sont réellement les limites des zones d'enzootie et aussi depuis quand le parasite s'est propagé en dehors du foyer historique de l'est.

Il est difficile de répondre quant aux zones réelles d'enzootie parasitaire actuelles en France. Une expansion aussi loin à l'ouest n'était pas attendue, avec un déplacement de près de 500 km par rapport à la situation d'enzootie précédemment connue, englobant de plus des zones plus urbanisées, telle que la région parisienne. En outre, les prévalences d'infestation vulpine obtenues dans les départements de la Manche et du Calvados se situent autour de 15 %, ce qui correspond à un niveau de prévalence considéré comme supérieur à un faible niveau d'endémie (<5 %), et de plus avec une répartition relativement homogène des renards infestés sur le territoire départemental. Les cas ayant fourni un résultat positif situés en Ille-et-Vilaine et constituant actuellement la limite ouest connue de la zone d'enzootie sont tous regroupés dans le quart est du département, à la frontière de la Mayenne, département non exploré jusqu'à présent. Malgré une surveillance réalisée dans le Morbihan avec l'analyse de près de 200 renards depuis 2011, aucun cas n'a été mis en évidence (Combes et al., 2013), ce qui peut suggérer que l'on a probablement atteint la limite occidentale actuelle de la zone d'enzootie. Toutefois, le fait que seule une centaine de renards aient été analysés par département exige de rester prudent car une telle taille d'échantillonnage ne permet pas de garantir une détection systématique d'au moins un cas ($>IC_{95\%}$) pour des prévalences inférieures à 5 % (Cannon and Roe, 1982). Ainsi, aucun renard n'avait été détecté comme infesté après l'analyse de 97 renards dans le département de l'Yonne, alors que la poursuite de la surveillance a permis par la suite d'identifier des cas d'infestation vulpine. L'obtention d'un échantillonnage de cadavres de renards repartis de façon homogène se heurte à des contraintes logistiques fortes en lien avec le caractère sylvatique du cycle. Malgré cela nous sommes parvenus à obtenir une centaine de cadavres répondant à cette exigence et ce protocole d'échantillonnage apparaît donc adapté et satisfaisant dès lors que l'objectif est de pouvoir détecter la

présence du parasite dans des zones où les niveaux de prévalence deviennent plus préoccupants pour la santé publique.

La surveillance effectuée par le LNR dans l'ensemble du grand ouest par le piégeage et le dépistage de l'infestation des rongeurs aquatiques en 2010, semble par ailleurs confirmer cette limite ouest de la zone d'enzootie. Les cas de rongeurs aquatiques infestés par *E. multilocularis* provenaient exclusivement de départements précédemment identifiés comme enzootiques par l'analyse d'intestins de renards. Si aucun cas de rongeur aquatique infesté par *E. multilocularis* n'a été identifié en Ille-et-Vilaine, cela semble s'expliquer par un effort de piégeage très faible (uniquement sept ragondins) dans la zone Est d'enzootie vulpine connue dans ce département.

Parallèlement à cette importante expansion du parasite vers l'ouest, une expansion vers le sud certes moins importante a également été mise en évidence. Si le dépistage de renards infestés pouvait être attendu en Savoie en raison de la description ancienne du parasite en Haute-Savoie, un cas positif a également été mis en évidence au sud de l'Isère (Combes et al., 2012). L'identification rétrospective de la présence de l'ADN d'*E. multilocularis* dans des fèces de renards collectées dans les Hautes-Alpes a ensuite confirmé cette expansion au sud du massif alpin (Umhang et al., 2016a). Les prévalences d'infestation vulpine obtenues dans ces départements du sud sont relativement faibles et ont été obtenues à chaque fois dans le cadre d'une seule étude. Il apparaît donc difficile actuellement de pouvoir statuer avec certitude sur la limite réelle de la présence du parasite au sud de la France.

Concernant la chronologie de l'expansion d'*E. multilocularis*, un scénario spatio-temporel obtenu grâce à une analyse génétique a permis d'estimer à au moins plusieurs décennies la présence du parasite dans l'ouest et dans le nord (Umhang et al., 2014d). S'il n'a pas été possible d'intégrer dans cette étude des échantillons permettant de statuer sur la limite sud, l'identification rétrospective de l'infestation de fèces collectées au début des années 2000 semble corroborer l'hypothèse d'une présence plus ancienne, sans toutefois pouvoir préciser davantage la chronologie de cette expansion.

9.1.2. Surveillance de l'infestation par *E. granulosus sensu lato* en France

Face à l'incertitude quant à la présence d'*E. granulosus sensu lato* à travers la France à la fin des années 2000, le LNR s'est d'abord attaché à confirmer la persistance du parasite dans deux régions considérées comme fortement enzootiques 20 ans auparavant. Ainsi des cas ont été identifiés dans le sud du pays chez les animaux de rente à l'abattoir avec des prévalences estimées à 4 cas pour 100 000 chez les ovins et 3 cas pour 100 000 chez les bovins (Umhang et al., 2013c). L'enquête menée en Corse a permis de constater que seul les porcins semblaient infestés mais avec une forte prévalence atteignant 5,9 % (Umhang et al., 2014f). Parallèlement à l'acquisition de données récentes confirmant la présence du parasite en France, ces deux études ont également fourni pour la première fois des données moléculaires permettant de pouvoir caractériser précisément les espèces en cause au sein du complexe *E. granulosus sensu lato*. Cette identification précise de l'espèce a permis de définir le rôle de chacun des hôtes intermédiaires infestés et de connaître les cycles parasitaires existants. Ainsi seul *E. granulosus s.s.* a été identifié dans le sud alors qu'à l'inverse seul *E. canadensis* (G6-7) semble avoir perduré en Corse.

Suite à l'obtention de ces nouvelles données épidémiologiques, un plan de surveillance national de l'infestation par *E. granulosus s.l.* à l'abattoir a pu être réalisé en 2012 grâce au support de la DGAI (Umhang et al., 2014c). Une étude épidémiologique d'une telle ampleur constitue une première en Europe pour *E. granulosus*, d'autant plus qu'un diagnostic moléculaire systématique des cas observés à l'abattoir était ensuite réalisé par le LNR. Cette étude a en outre permis de montrer que la présence d'*E. granulosus s.s.* ne se limite pas au sud mais s'étend à tout le pays, même si les prévalences sont plus faibles en dehors du foyer majeur du sud des Alpes. Le foyer pyrénéen pourtant encore très important il y a vingt ans semble avoir quasiment disparu, seul des cas sporadiques ayant été reportés. La prévalence nationale demeure faible avec 1,53 cas chez les ovins et

0,83 cas chez les bovins pour 100 000 têtes abattues. L'existence à travers le pays de nombreux cas bovins, pourtant infestés par des kystes non fertiles d'*E. granulosus* s.s., en l'absence de cas ovins à proximité interroge sur l'exhaustivité de l'enquête au niveau des abattoirs pour l'identification des cas ovins, notamment en lien avec une inspection moins exhaustive des carcasses ovines.

Aucune identification d'*E. canadensis* G6-7 n'a été réalisée en dehors de la Corse, où elle se confirme être *a priori* la seule espèce d'échinocoque présente. Lors de l'enquête nationale de 1989, seuls des résultats très partiels et concernant qu'une faible proportion des animaux abattus avaient été obtenus pour la Corse. Des cas d'hydatidose n'avaient alors été décrits que chez les bovins. L'absence de cas chez les porcs en 1989 ne permet pas de préjuger de la présence ou non chez cette espèce d'*E. canadensis* G6-7 à cette époque en raison du caractère très partiel des données obtenues alors sur cette espèce. L'infestation actuelle par *E. canadensis* G6-7 ne se limite par ailleurs pas aux porcins car des taux d'infestation similaires ont été observés chez les sangliers tués à la chasse, suggérant fortement une implication importante de la faune sauvage dans un cycle classiquement domestique (Umhang, Richomme, and Boué, 2014e). L'identification en France d'une troisième espèce, à savoir *E. ortleppi*, a été plus surprenante, car elle est considérée comme en voie d'extinction en Europe en raison des désormais rares opportunités de transmission du parasite entre bovins et chiens (Romig et al., 2006; Thompson et al., 1984b). Les deux foyers situés dans le Centre et dans les Pyrénées ne correspondent pas à la localisation des deux cas humains diagnostiqués en parallèle par le CNR (Grenouillet et al., 2014). La persistance de cette espèce dans le contexte de l'abattage obligatoire des bovins en abattoir suppose *a priori* un accès des chiens aux viscères de bovins au niveau de l'élevage, soit du fait d'abattages réalisés hors structure officielle, soit suite à la mort d'un animal, en attente d'évacuation par l'équarrissage.

9.1.3. Expertise à l'international

Le développement des travaux du LNR et leur valorisation sous forme de publications a permis au LNR de progressivement construire un réseau de collaborations internationales afin notamment de faire profiter d'autres pays de l'expertise scientifique et techniques acquise dans le cadre de la surveillance et/ou l'épidémiologie moléculaire relative aux échinocoques. Concernant *E. granulosus*, il s'agit de contribuer à la surveillance de l'infestation par le parasite dans des foyers de forte enzootie, tout en faisant profiter du savoir-faire moléculaire pour l'identification des espèces présentes. Pour la première fois, des données moléculaires ont ainsi été obtenues en Moldavie, permettant d'identifier *E. granulosus* s.s. chez les ovins et bovins avec de très fortes prévalences se situant autour de 60 % (Umhang et al., 2014a). De plus, il a été démontré que la privatisation des élevages constituait un facteur important d'entretien du cycle parasitaire en raison de l'absence d'inspection sanitaire dans le secteur privé et de la fréquente possibilité de consommation des viscères par les chiens (Chihai et al., 2016). L'autre collaboration majeure pour *E. granulosus* a été effectuée avec le Maroc, où, bien que le pays soit reconnu comme fortement endémique et enzootique depuis très longtemps, peu de données notamment moléculaires, sont disponibles. La réalisation d'une large étude de prévalence de l'infestation par *E. granulosus* à l'abattoir a permis de compléter les données épidémiologiques existantes en confirmant l'omniprésence d'*E. granulosus* s.s (El Berbri et al., 2015).

Les collaborations pour l'étude épidémiologique de l'infestation par *E. multilocularis* sont quasi-uniquement européennes car elles s'inscrivent dans une volonté de compréhension de la transmission du parasite en Europe réalisée à partir des données obtenues par l'utilisation du microsatellite EmsB. Ponctuellement, le LNR peut collaborer à des études de surveillance, comme lors d'une enquête portant sur la présence du parasite chez le chien en Pologne (Karamon et al., 2016). Il s'agit alors d'apporter une expertise technique dans le dépistage, tant au niveau de la stratégie que de l'interprétation des résultats. Toutefois, les collaborations ont majoritairement été réalisées dans le cadre d'études d'épidémiologie moléculaire afin de fournir des éléments de compréhension quant à la présence et à l'expansion du parasite dans ces pays. Ainsi, la description récente d'*E. multilocularis* au Danemark puis en Suède a soulevé la question de l'origine de l'introduction du parasite au nord de l'Europe (Knapp et al. in prep). L'identification de six profils EmsB correspondant uniquement à ceux retrouvés en Europe infirme l'hypothèse d'un foyer autochtone. Seule une connexion très limitée au niveau de

la transmission du parasite entre les deux pays nordiques semble exister car seul un profil EmsB est commun. L'existence d'une frontière terrestre avec l'Allemagne peut expliquer la présence du parasite au Danemark. Le statut de la Suède frontalière de pays non enzootiques que sont la Norvège et la Finlande, interroge quant à l'introduction du parasite *via* un cycle sylvatique, et conduit à envisager la possibilité d'installation du cycle suite à l'arrivée de chiens domestiques infestés. L'intérêt principal de l'étude menée en Pologne a résidé dans la tentative d'élucider les raisons de l'augmentation de la prévalence de l'infestation vulpine constatée dans la moitié est du pays, alors qu'elle est demeurée stable à un faible niveau d'endémie dans la moitié ouest. L'analyse des profils génétiques a montré une absence de lien épidémiologique entre ces deux zones qui sont soumises à des influences d'origines différentes, pouvant contribuer à expliquer partiellement cette différence de niveau d'enzootie (Umhang et al. 2017).

9.1.4. Caractérisation des cycles parasitaires

En l'absence de données concernant l'infestation du chien par les échinocoques en France, le LNR a réalisé plusieurs études qui permettent actuellement de disposer d'éléments pour une meilleure appréhension du rôle du chien en tant que facteur de risque potentiel de transmission d'*E. multilocularis* mais aussi d'*E. canadensis* (G6-7) à l'Homme. La prévalence d'infestation par *E. multilocularis* du chien en zone de haute endémie vulpine en France a pu être estimée entre 0 et 0,5 % (Umhang et al., 2012; Umhang et al., 2014b). La prévalence d'infestation canine obtenue en Corse pour *E. canadensis* (G6-7) est de 1,2 % (Grech-Angelini et al., 2015).

Ces valeurs de prévalence canine sont similaires alors que le chien est l'hôte définitif principal d'*E. canadensis* en Corse et seulement un hôte ponctuel pour *E. multilocularis* en France. Toutefois, ces données concordent avec celles classiquement décrites chez le chien pour *E. multilocularis* et *E. granulosus s.l.* (Carmena and Cardona, 2013). En effet malgré le statut du chien d'hôte définitif principal pour *E. granulosus*, les valeurs de prévalence décrites en zone de forte enzootie sont inférieures à 25 % en Europe et 35 % en Amérique, Asie et Afrique, hormis quelques exceptions (Carmena and Cardona, 2013). A l'inverse pour *E. multilocularis*, si les prévalences canines sont inférieures à 7 % en Europe et ne dépassent que rarement 20 % en Asie, les prévalences chez l'hôte définitif principal, le renard, sont beaucoup plus élevées. En zone de forte enzootie, les prévalences vulpines sont supérieures à 50 % en Asie, Europe et aux Etats-Unis (Carmena and Cardona, 2014). Par exemple en France, la prévalence dans la zone historique d'enzootie de l'est a été estimée à 47 %, cette zone incluant trois départements (Doubs, Meurthe-et-Moselle, Jura) avec une prévalence supérieure à 50 % (Combes et al., 2012).

Ces différences de niveau de prévalence entre *E. multilocularis* et *E. granulosus s.l.* se constatent également chez les hôtes intermédiaires et dans des proportions encore beaucoup plus importantes. En zone de forte enzootie, les prévalences ovines pour *E. granulosus s.s.* sont généralement comprises entre 40 et 60 %, atteignant jusqu'à 70-80 % dans des foyers hyper endémiques comme en Chine, en Italie ou au Pérou (Cardona and Carmena, 2013). S'agissant d'*E. multilocularis*, les prévalences chez les micromammifères sont très faibles (<0,1 %) en dehors des hot spots où la prévalence peut atteindre 10 % mais se limitant alors à une zone géographique très restreinte. Ces différences de prévalences chez les hôtes définitifs et intermédiaires sont le résultat de l'adaptation des espèces parasitaires aux écosystèmes de leurs hôtes. La durée de vie supérieure des animaux de rente en comparaison à celles des rongeurs augmente leur période d'exposition à la contamination environnementale et contribue ainsi grandement à expliquer ces prévalences plus élevées. Les faibles prévalences d'*E. multilocularis* observées chez les micromammifères sont compensées par une très forte fréquence de prédation par le renard. La fréquence d'accès aux viscères d'animaux de rente pour le chien s'avère plus limitée même si cela peut être facilité par l'intervention de l'homme dans des structures d'abattage où les viscères ne sont pas correctement éliminés.

Un autre paramètre révélant une adaptation directe de l'espèce parasitaire à son hôte est la durée de la période patente chez l'hôte définitif. En l'absence de données exactes, celle-ci semble être toutefois plus longue pour *E. granulosus* avec des vers devenant sénescents entre six et 20 mois mais pouvant atteindre plus

de deux ans (Schantz, 1982). Pour *E. multilocularis*, la durée de vie des vers est estimée autour de 80 à 120 jours et jusqu'à six mois dans le cas de très fortes infestations (Kapel et al., 2006). Contrairement à *E. multilocularis*, aucune donnée récente d'infestation expérimentale par *E. granulosus* n'est disponible. L'infestation de renards et de chiens avec 20 000 protoscolex d'*E. multilocularis* a permis de différencier les dynamiques d'excrétion des œufs et de survie des vers dans l'intestin (Kapel et al., 2006; Thompson et al., 2006). Le potentiel biotique du chien (279 910 œufs) s'avère inférieur à celui du renard (346 473 œufs) car moins de vers se développent mais ces vers ont une plus grande longévité que ceux observés chez le renard, ce qui rappelle la plus longue durée de l'infestation par *E. granulosus* chez le chien. De plus, le fort déclin du nombre de vers est observé chez le renard après 90 jours post-infestation qui serait à interpréter comme une optimisation du nombre d'œufs produits et libérés dans l'environnement en favorisant la disponibilité pour les infestations suivantes, qui peuvent être très fréquentes chez le renard. A l'inverse la longue durée de la période patente d'*E. granulosus* chez le chien peut permettre un maintien du cycle parasite en dépit d'une faible fréquence d'infestation. Cet élément semble d'ailleurs constituer un facteur important dans la compréhension de l'existence de foyers isolés d'*E. granulosus* s.s. à travers la France dans un contexte sanitaire où l'accès des chiens aux viscères semble très occasionnel et avec des taux de prévalences chez les hôtes intermédiaires extrêmement faibles.

Parallèlement aux variations de la période patente chez les hôtes définitifs, la variation des taux de fertilité des hôtes intermédiaires apparaît également comme un facteur clé dans la réalisation des cycles parasites. Des travaux récents sur l'infestation expérimentale de différentes espèces de rongeurs ont pu démontrer des taux d'infestations très supérieures chez *M. arvalis* proie préférentielle du renard en comparaison de *M. glareolus* (Woolsey et al., 2015; Woolsey et al., 2016). Pour *E. granulosus* s.s., les taux de fertilité sont généralement compris entre 20 et 60 % chez les ovins. Chez les bovins une absence quasi systématique de protoscolex est observée en Europe alors qu'en Afrique des taux similaires à ceux des ovins sont décrits sans que les causes de cette fertilité aient pu être identifiées (Cardona and Carmena, 2013). Pour *E. ortleppi*, le taux de fertilité est extrêmement élevé chez les bovins ce qui pourrait s'expliquer comme une sélection ou une adaptation du parasite à la faible fréquence de consommation de poumons de bovins par les chiens notamment en Europe (Grenouillet et al., 2014).

L'infestation d'un chien correspondant à un risque zoonotique réel, le LNR s'est attaché à identifier les éléments favorisant ce parasitisme canin. Les chiens de chasse ont été identifiés comme plus à risque d'être infestés par *E. multilocularis*. En Corse, cette catégorie a été très majoritairement ciblée par l'enquête car représentative de la population canine rurale. L'activité de chasse favorise la présence de chiens non tenus en laisse dans un milieu où la possibilité de prédation de rongeurs ou d'accès à des viscères d'animaux sauvages, notamment des sangliers en Corse, est plus importante. Pour les deux espèces parasites, une très faible fréquence de vermifugation a été constatée au cours des études. Il n'y a généralement pas de prise en compte du risque zoonotique lié aux échinocoques par les propriétaires dans le protocole de vermifugation des chiens, par manque de connaissance du parasite et des modes d'infestation du chien et de l'homme. Il en résulte l'utilisation de vermifuges non efficaces et/ou à une fréquence insuffisante, ne serait-ce que pour réduire réellement le risque de contamination humaine. L'activité de chasse étant propice à la prédation de rongeurs ou de viscères d'animaux sauvages, cela souligne un manque global d'information quant au mode d'infestation des chiens et du risque zoonotique associé.

A partir de cas d'infestation naturelle du chat par *E. multilocularis*, il a été possible de corroborer les résultats des infestations expérimentales qui avaient tendu à montrer que ce carnivore domestique n'est pas un bon hôte définitif pour le parasite (Umhang et al., 2015). Le développement retardé des vers ainsi que l'absence d'œufs dans les fèces témoignent d'une possibilité d'infestation mais ne permettant pas la poursuite du cycle parasite. S'il n'est pas exclue totalement que des œufs infectieux d'*E. multilocularis* puissent être émis dans des fèces de chats, le rôle de ce dernier dans le cycle du parasite est actuellement considéré comme insignifiant. Cette étude a également permis d'identifier le premier cas d'infestation chez un chat forestier dont la réceptivité vis-à-vis du parasite semblerait être tout aussi faible.

9.2. Développement de nouvelles méthodes de diagnostic et dépistage

Parmi les méthodes d'analyses en parasitologie « classique », la technique du SCT est considérée comme la référence pour l'identification d'*E. multilocularis* chez le renard. Toutefois dans la perspective d'une surveillance à large échelle géographique nécessitant l'analyse de plusieurs centaines voire milliers d'intestins de renards, l'utilisation d'une méthode plus rapide apparaissait indispensable. En collaboration avec les laboratoires vétérinaires départementaux et l'ADILVA, le LNR a pu valider la méthode SSCT, variante du SCT, mais basée sur la localisation préférentielle des vers dans la partie postérieure de l'intestin (Umhang et al., 2011). L'important gain de temps obtenu dans la réalisation de cette analyse sans que ce soit au détriment de sa spécificité et de sa sensibilité, a permis au LNR de mettre cette méthode à la disposition des laboratoires vétérinaires départementaux. La réalisation de cette méthode par le LRFSN a été reconnue en 2012 par une habilitation du comité français d'accréditation (COFRAC ISO17025). De plus, le LNR a vocation à démocratiser cette méthode à l'étranger. La Suède a adopté très rapidement cette méthode pour la surveillance chez le renard de l'infestation par *E. multilocularis*, ce qui a abouti à l'identification des premiers cas d'infestation vulpine dans le pays (Osterman-Lind et al., 2011). Depuis, la Belgique a également adopté cette méthode pour mener cette surveillance, et elle a aussi été utilisée ponctuellement en Norvège (Davidson et al., 2013).

Le développement de méthodes de dépistage/diagnostic moléculaire constitue un des acquis et atouts majeurs du LNR. Dans cette optique il a pu mettre à profit sa collaboration étroite avec le CNR échinococcose alvéolaire de Besançon pour mettre au point plusieurs méthodes de PCR temps réel permettant principalement de faciliter l'analyse de fèces des hôtes définitifs avec une approche non invasive. L'utilisation de la PCR temps réel permet principalement de réaliser des analyses avec de l'ADN directement extrait à partir de fèces sans avoir à réaliser une étape en amont de concentration des œufs, qui est lourde et chronophage. De plus, l'ajout d'un contrôle interne permet de contrôler la présence potentielle d'inhibiteurs qui peut se révéler très fréquente dans les fèces, sans avoir recours à une analyse supplémentaire. Ces éléments ont été déterminants pour la mise en place de nouvelles études réalisables uniquement parce qu'il devenait possible de disposer de fèces collectées en grand nombre, contrairement aux intestins, dont l'utilisation comme prélèvement n'est par ailleurs pas envisageable pour réaliser des études chez les carnivores domestiques (Grech-Angelini et al., 2015; Knapp et al., 2016; Umhang et al., 2015). Toutefois, il est important de préciser que si les tests de PCR temps réel offrent une meilleure sensibilité, il s'agit de détection de l'ADN du parasite, ce qui n'indique pas forcément sa présence sous une forme viable et infectieuse. L'exemple de la mise en évidence de l'ADN d'*E. multilocularis* dans les fèces de chats malgré l'absence d'œufs (Umhang et al., 2015) illustre parfaitement la nécessité de garder à l'esprit cette distinction afin de ne pas tirer des conclusions épidémiologique erronées.

La mise au point de la qPCR pour la détection d'*E. multilocularis* (Knapp et al., 2014) pose désormais la question de son utilisation dans le cadre de la surveillance de l'infestation par le parasite qui est actuellement réalisée principalement par l'analyse d'intestins de renards. Cet outil s'est avéré doté d'une sensibilité suffisante pour la détection de fèces infestées, même dans des zones *a priori* de faible enzootie, comme la Seine Maritime et les Hautes-Alpes (Umhang et al., 2016a). En utilisant un test qPCR différent, la Suède a également mis récemment en avant l'intérêt de cette méthode pour la surveillance de l'infestation de fèces par le parasite dans un contexte de très faible enzootie (Isaksson et al., 2014). Si des études complémentaires sont à mener pour juger de la pertinence de l'utilisation de cet outil dans le cadre de la surveillance, il ne faut cependant pas négliger les différences associées à la réalisation pratique de la collecte des échantillons. Ainsi, si souvent les mêmes acteurs sont concernés par la collecte, à savoir principalement les chasseurs, ceux-ci pourraient être moins motivés pour la collecte de fèces que pour le tir de renards.

L'extraction d'ADN directement à partir de fèces permet d'identifier simultanément la ou les espèce(s) parasitaire(s) et l'espèce animale ayant émise les fèces. En effet, le développement de la qPCR multiplex carnivores permet une l'identification précise et fiable de l'espèce animale concernée (Knapp et al., 2016).

L'identification morphologique étant loin d'être infaillible, il apparaît également important de ne pas tirer des conclusions épidémiologiques basées sur des données morphométriques erronées. Par exemple, les taux de prévalence d'infestation par *E. multilocularis* diffèrent grandement entre le renard et les carnivores domestiques. La détection de *Toxocara sp.* par qPCR a également été développée, permettant un multiplexage avec *E. multilocularis* (Knapp et al., 2016). Ce parasite ubiquitaire est intéressant, car il est transmis à l'homme comme *E. multilocularis* par ingestion d'œufs émis par les fèces de carnivores infestés. Il peut donc indirectement constituer un bon indicateur d'un risque de contamination fécale à partir d'un carnivore, et le multiplexage avec *E. multilocularis* permet la détection de ces parasites en une seule analyse. La volonté d'enquêter sur la présence d'*E. granulosus s.l.* chez le chien en Corse a entraîné le développement par le LNR d'une qPCR multiplex pour la détection d'*E. granulosus s.s.* et d'*E. canadensis* G6-7. Cet outil incluant un contrôle interne a permis d'analyser de manière très rapide et très sensible 259 fèces de chiens, dont trois présentaient de l'ADN d'*E. canadensis* G6-7.

Le développement de ces outils de qPCR est essentiellement destiné à l'analyse de fèces plutôt qu'à celle de prélèvements de métacystes. La détection d'ADN parasitaire à partir de kystes ne requiert pas de manière indispensable le seuil de détection plus faible qu'apporte la qPCR en comparaison à la PCR classique, en raison des grandes quantités d'ADN parasitaire présentes. De plus, l'utilisation de la qPCR facilite l'obtention des résultats, car elle ne nécessite pas le recours à une étape d'électrophorèse sur gel d'agarose pour visualiser les résultats.

Dans certaines situations, ce n'est pas la méthode de détection qui constitue un frein mais la collecte d'échantillons. Dans des contextes de forte température coïncidant avec la difficulté de disposer de moyens de congélation des prélèvements, les cartes FTA se sont révélées comme une excellente alternative pour la collecte d'ADN de kystes parasitaires et notamment hydatiques (Boué et al., 2017). Le LNR a développé et validé cette méthode de collecte d'échantillons afin de faciliter l'obtention d'échantillons biologiques permettant de produire des données moléculaires d'*E. granulosus s.l.* chez les hôtes intermédiaires qui sont cruellement manquantes alors qu'il s'agit généralement de zones fortement enzootiques. La disponibilité de ces données doit permettre de mieux déterminer les espèces concernées et d'affiner les connaissances épidémiologiques en vue de pouvoir proposer des actions de lutte efficace. De plus, cela permet de faciliter l'échantillonnage dans des zones très difficiles, notamment en vue d'explorer l'implication de différentes espèces animales de la faune sauvage lorsque les hôtes intermédiaires des cycles parasitaires ne sont pas encore totalement identifiés, comme c'est le cas actuellement pour *E. felidis* (Huttner et al., 2008).

Le microsatellite EmsB permettant des études d'épidémiologie moléculaire pour *E. multilocularis* n'a pas été développé par le LNR mais par le CNR EA (Bart et al., 2006a; Knapp et al., 2007). Cependant, face à l'impossibilité technique de continuer à réaliser des analyses EmsB à Besançon, le LNR s'est organisé dès 2010 afin de disposer d'un séquenceur et de pouvoir réaliser ce type d'analyses à Nancy, dans le cadre de sa collaboration avec le CNR. Cette acquisition de méthode était également motivée par le souhait de valoriser l'échantillonnage de vers collectés dans les différents départements au cours de la vaste étude menée par l'ELIZ (Combes et al., 2012; Combes et al., 2013). Ainsi, même si quelques rares autres équipes européennes (Italie, Allemagne) ont réalisé ponctuellement des analyses EmsB, le LNR a très largement contribué jusqu'à présent à étoffer le nombre d'échantillons analysés au cours de différentes études qu'il a menées en France ou dans le contexte de collaborations internationales. Il a aussi participé avec le CNR à la caractérisation génomique de ce microsatellite en déterminant le nombre exact de copies et leur localisation sur un même chromosome (Valot et al., 2015). Suite à la description de la transmission du parasite en Europe par un système île-continent (Knapp et al., 2009a), le LNR a participé à la réalisation d'études d'épidémiologie moléculaire en France (Umhang et al., 2014d) puis en Suède et au Danemark (Enemark et al., 2013; Knapp et al. in prep), ainsi qu'en Estonie (Laurimaa et al., 2015). Par la suite, le LNR a développé lui-même ses collaborations en s'impliquant dans les programmes de surveillance d'*E. multilocularis* chez le renard en Belgique mais aussi à travers toute la Pologne (Umhang et al. 2017) dans le but de compléter les données de profils EmsB en Europe. La récolte de l'ensemble de ces données permet d'affiner chaque fois un peu plus la compréhension de la

transmission du parasite en Europe et de son expansion. A une échelle plus locale, l'utilité de cet outil moléculaire a déjà été prouvée (Knapp et al., 2008). L'observation des profils EmsB communs chez les échantillons provenant d'animaux captifs et sauvages du parc animalier a ainsi constitué un argument irréfutable pour statuer sur l'origine autochtone de l'infestation des lémuriens (Umhang et al., 2016c).

9.3. Adéquation des travaux réalisés avec le rôle du LNR

La désignation du LRFSN comme LNR *Echinococcus spp.* a coïncidé avec la période de mon arrivée au laboratoire. En tant que chargé de projet, mes travaux avaient donc vocation à remplir les missions du LNR, notamment dans le cadre du développement de méthodes d'analyses et de la surveillance nationale de l'infestation par les échinocoques. Si les travaux menés ont évolué au cours de ces dix années, ils sont toujours restés en adéquation avec le rôle du LNR, tout en étant complétés par des études internationales et par d'autres études à orientation plus cognitive.

Le développement, l'optimisation et la validation de méthodes constituent ainsi un socle nécessaire pour disposer de méthodes d'analyse fiables. En fonction des méthodes déjà publiées, il a été choisi soit de les mettre en place au laboratoire soit d'en développer de nouvelles lorsque les méthodes existantes ne convenaient pas. En parasitologie classique, la méthode SCT, méthode de référence pour la détection d'*E. multilocularis* dans l'intestin, a longtemps été utilisée avant de s'orienter vers une modification de celle-ci pour aboutir à la méthode SSCT grâce à la forte collaboration avec les LVDs (Umhang et al., 2011). La volonté d'obtenir un gain de temps significatif dans le cadre d'une surveillance de grande ampleur, avec des analyses réalisées par les LVDs, avait motivé ce développement de méthode. Une fois la validation effectuée par le LNR, une formation pratique a été proposée à tous les LVDs participant à l'étude de surveillance du parasite, afin de pouvoir y être appliquée de manière uniforme (Combes et al., 2012; Combes et al., 2013). Cette méthode SSCT a d'ailleurs été ensuite validée par le COFRAC. Concernant l'analyse de fèces, le LNR s'est d'abord appuyé sur le protocole de flottaison/filtration précédemment développé pour la concentration des œufs (Mathis et al., 1996). Cette méthode permettait ensuite la réalisation d'une PCR classique pour la détermination de l'espèce impliquée. Dans ce cadre de dépistage moléculaire, le LNR a contribué en collaboration avec l'Université de Salford (Angleterre) à la fourniture d'échantillons et à la validation de deux tests PCR pour la détection d'*E. multilocularis* et d'*E. granulosus* (G1), notamment à partir de fèces (Boufana et al., 2013). L'avènement de la qPCR a incité au développement d'outils de dépistage non invasifs particulièrement utiles pour l'épidémiologie des échinocoques car permettant de faciliter la recherche de l'infestation chez les hôtes définitifs et en particulier les carnivores domestiques, avec un test plus rapide et plus sensible qu'auparavant. Des tests pour la détection d'*E. multilocularis*, d'*E. granulosus* s.s., d'*E. canadensis* G6-7 mais aussi *Toxocara sp.* ainsi que pour l'identification de l'espèce de carnivore ayant émis les fèces (Grech-Angelini et al., 2015; Knapp et al., 2014; Knapp et al., 2016) constituent désormais un panel d'outils qPCR permettant de disposer de méthode moins contraignantes, plus spécifiques et sensibles, particulièrement pour le dépistage de l'infestation des hôtes définitifs. La validation des cartes FTA pour l'échantillonnage d'ADN de kystes parasitaires s'inscrit également dans cette démarche de facilitation d'acquisition d'informations fiables. Mon travail au sein du LNR a donc ainsi permis d'améliorer la gamme de méthodes disponibles pour les études épidémiologiques, que ce soit en simplifiant les méthodes d'analyse mais aussi en facilitant la collecte des prélèvements.

Le LNR se doit aussi d'animer son réseau de laboratoires même si dans ce cas il ne s'agit pas de laboratoires agréés, car il n'y a pas d'analyses officielles pour les échinocoques. Les LVDs ont été placés au centre de la partie opérationnelle lors de l'étude de surveillance de l'infestation par *E. multilocularis*. En plus de la formation à la méthode SSCT accompagnée de rappels sur les échinocoques, le LNR réalisait la confirmation de l'espèce de vers identifiés en première intention par les LVDs. Dans le contexte du plan de surveillance d'*E. granulosus* à l'abattoir, le LNR a également sensibilisé les agents des DDPP au diagnostic de l'échinococcose kystique et a réalisé la confirmation moléculaire systématique à partir des kystes identifiés en première intention. Cet accompagnement du LNR s'est aussi réalisé auprès des LVDs, en proposant un diagnostic de

confirmation des cas suspects d'échinococcose larvaire constatés lors des autopsies, afin d'étoffer les données disponibles. Cela a notamment permis de confirmer plusieurs cas d'infestation par *E. granulosus* s.s. dans la faune sauvage (Umhang et al., 2014e).

Parmi toutes ces missions du LNR, la surveillance apparaît comme la plus importante. Les travaux menés ont permis de redéfinir complètement la zone d'enzootie connue de l'infestation par *E. multilocularis*, qui correspond désormais mieux à la distribution des cas humains. En effet, si la majorité des cas humains demeure localisée dans le foyer historique d'endémie de l'Est de la France, la recrudescence de cas hors de cette zone laissait penser que le parasite pouvait y être présent même à des niveaux de prévalence d'infestation vulpine plus faible. Le scénario spatio-temporel obtenu par analyse génétique suggère d'ailleurs une présence du parasite dans le nord et l'ouest datant d'au moins plusieurs décennies (Umhang et al., 2014d), et pouvant donc expliquer les premiers cas humains détectés hors de la zone historique d'enzootie. La surveillance de l'infestation par *E. multilocularis* menée en France par le LNR a été réalisée par différentes approches au niveau du choix de l'hôte ciblé, qu'il soit définitif ou intermédiaire, et sans se limiter aux hôtes de la faune sauvage de ce cycle classiquement sylvaïque, mais en enquêtant également chez les carnivores domestiques pouvant jouer un rôle zoonotique potentiel. Cette surveillance diversifiée a aussi nécessité la maîtrise de plusieurs méthodes d'analyses. Le renard a été la cible principale car il est l'hôte définitif principal du cycle sylvaïque du parasite. Les études menées en France chez le chat et le chien ont permis de mettre en évidence des taux de prévalence bien plus faibles chez ces hôtes domestiques que ceux observés dans les mêmes zones chez le renard. En prenant en compte le potentiel biotique pour *E. multilocularis* et les estimations de populations pour chaque espèce d'hôte définitif (renard, chien et chat), le renard a été décrit comme le contributeur majoritaire de la contamination environnementale par les œufs du parasite (Hegglin and Deplazes, 2013). Cette différence de prévalence au sein d'une même zone géographique, entre le renard et les autres carnivores domestiques ou sauvages comme le chien viverrin, s'observe également à travers toute l'Europe (Casulli et al., 2015). Parmi les hôtes intermédiaires, seuls les rongeurs aquatiques constituent une alternative pertinente dans une optique de surveillance de l'infestation par *E. multilocularis*, dès lors que la zone d'étude constitue un milieu favorable à la présence de ces espèces comme cela a pu être démontré dans l'ouest de la France (Umhang et al., 2013b).

La surveillance de l'infestation par *E. granulosus* s.l. a été entreprise plus tardivement et à la seule initiative du LNR soutenu par la DGAL. La possibilité d'identifier des cas en abattoir facilite grandement la mise en place des protocoles d'échantillonnage. Dans ce contexte, le plan national de surveillance de 2012 apparaît comme une avancée majeure pour l'étude de la répartition épidémiologique d'*E. granulosus* s.l. en France. Les foyers principaux selon les espèces du complexe *E. granulosus* sont désormais bien identifiés alors que précédemment l'absence de technique de diagnostic moléculaire ne permettait pas d'avoir une appréhension correcte de la situation épidémiologique. L'observation à l'abattoir du maintien de cas bovins d'infestation par *E. granulosus* s.s. à travers presque tout le pays a été très surprenante. A nouveau, l'identification de l'espèce et la confirmation de l'absence de fertilité chez ces bovins met en avant une faille dans la maîtrise de l'abattage actuel des ovins au niveau de l'élevage, qui permettrait ponctuellement l'infestation des chiens. Tous ces éléments transmis à la DGAL devront permettre au LNR d'explorer désormais plus précisément les raisons du maintien du cycle parasitaire en France. En outre, il semble important de signaler que la disponibilité de ces nouvelles données de présence d'*E. granulosus* s.l. en France a interpellé l'Insitut de Veille Sanitaire (devenu Santé Publique France). Dans ce contexte, une étude rétrospective nationale a ainsi été menée en collaboration avec le CHU de Besançon, sur la période 2005-2014 afin de déterminer l'incidence des cas d'échinococcose kystique par région (van Cauteren et al., 2016). A défaut de l'existence d'une déclaration obligatoire des cas humains, une extraction des données de la base de données du programme de médicalisation des systèmes d'information (PMSI) a été utilisée pour identifier indirectement les cas humains. Les incidences les plus élevées ont été décrites en Corse (1,76 cas pour 100 000) et dans la région Provence-Alpes-Côte d'Azur (0,85 cas pour 100 000) ce qui coïncide avec les deux principaux foyers décrits chez l'animal par le LNR. Cette sensibilisation accrue des pouvoirs publics à la problématique de la circulation d'*E. granulosus* s.l. au sein de cycles autochtones en France a conduit à l'élargissement du mandat du CNR échinococcose alvéolaire qui

englobe également, depuis son renouvellement en 2017 l'échinococcose kystique en plus de l'échinococcose alvéolaire. Un des objectifs du CNR consiste d'ailleurs désormais à combler le manque d'informations sur les cas humains par la création d'un observatoire français des cas d'échinococcose kystique.

L'expertise du LNR a été reconnue au fil des différentes études menées. Ce statut a permis notamment au LNR d'intégrer un projet européen financé par l'AESA portant sur la réalisation à partir des données actuellement disponibles de revues systématiques sur la présence d'*E. multilocularis* chez l'animal. En parallèle, plusieurs collaborations internationales ont pu être mises en œuvre. Il s'agissait d'apporter une expertise et une compétence technique, comme par exemple la validation de tests PCR (Boufana et al., 2012), ou pour l'étude de la présence d'*E. multilocularis* chez le chien en Pologne (Karamon et al., 2016) ou afin de mener des analyses EmsB avec la Pologne (Umhang et al., 2017), l'Estonie (Laurimaa et al., 2015), la Suède et le Danemark (Knapp et al. in prep). L'autre type de collaborations menées par le LNR consiste à fournir une aide à des pays ne disposant pas des moyens nécessaires pour mener les études. Il s'agit alors pour le LNR de mettre en place une étude, généralement de surveillance, afin de permettre aux collaborateurs étrangers de disposer d'informations scientifiques et pertinentes quant à la présence du parasite. Ce type de collaboration a été mené par le LNR au Maroc et en Moldavie, deux zones de très forte endémie et enzootie d'infestation par *E. granulosus*, qui pourtant ne disposaient pas d'informations sur les espèces d'*E. granulosus* s.l. impliquées ni d'une estimation précise des niveaux de prévalence actuelle. La collaboration avec ces partenaires a pour but de produire des résultats scientifiques en vue de la mise en place ou de l'adaptation des moyens de lutte.

9.4. Perspectives

Au fil des études menées sur les échinocoques au niveau national, la France s'est avérée constituer un terrain épidémiologique très intéressant, car hébergeant plusieurs espèces du genre *Echinococcus*, avec une répartition spécifique pour chacune d'elle. La diversité de climats et de paysages ainsi que la variété d'espèces animales domestiques et sauvages explique cette diversité de cycles parasitaires impliquant différentes espèces d'échinocoques. De plus, la surveillance de l'évolution spatio-temporelle de la présence d'*E. multilocularis* et d'*E. granulosus* apparaît comme très intéressante car elle a révélé respectivement une expansion et une régression de leurs aires de répartition avec la prédominance de foyers majeurs. Les informations épidémiologiques disponibles actuellement permettent ainsi d'envisager de nombreuses perspectives relatives à une meilleure connaissance des zones d'enzootie, au rôle des différentes espèces animales dans le maintien des cycles parasitaires mais aussi au développement de nouveaux outils en vue d'une nouvelle approche principalement moléculaire.

9.4.1. Perspectives de surveillance de l'infestation par *E. multilocularis* et *E. granulosus*

Dans le Centre de la France, le foyer auvergnat d'infestation par *E. multilocularis* décrit depuis la fin des années 1970 (Petavy and Deblock, 1983; Rey et al., 1977) reste surprenant car il apparaît isolé. Cependant, aucun des départements voisins n'a jamais encore été échantillonné. La question se pose donc de savoir s'il s'agit d'un foyer autochtone ou non. Avec 9% de renards infestés, la prévalence d'infestation vulpine reste bien inférieure à celle du foyer historique de l'est de la France (Combes et al., 2012). Des cas d'infestation de renards sont surtout présents au nord et au centre du département mais aussi à l'est et à l'ouest, juste à la frontière des départements de la Haute-Loire (43), de la Lozère (48), du Puy-de-Dôme (63) et du Lot (46) (Figure 43). La mise en place d'une future étude dans cette région permettrait de juger du statut enzootique des départements voisins et donc de mieux cerner la situation épidémiologique de la région. L'analyse par microsattellites EmsB de l'ADN de vers et/ou de lésions de rongeurs de cette région constituerait un moyen pertinent pour juger du statut autochtone ou non de ce foyer comme cela a pu être précédemment réalisé pour le foyer alpin italien (Casulli et al., 2009).

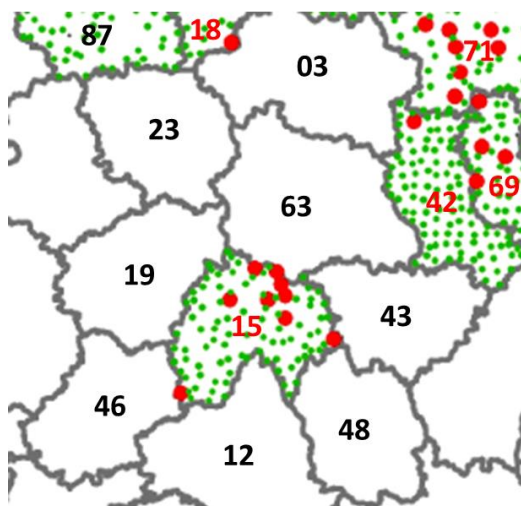


Figure 43 : Situation épidémiologique actuelle pour *E. multilocularis* dans le Cantal (15) et les départements voisins enzootiques (en rouge : 18, 71, 42, 69) ou non (en noir : 23, 03, 63, 19, 43, 46, 12, 48) d'après Combes et al. (2012).

Suite au cas d'infestation d'un renard en Isère mais situé à l'extrémité sud du département, s'est posée la question du statut des autres départements alpins voisins pouvant offrir un contexte climatique favorable au parasite. L'analyse rétrospective de fèces de renards provenant de la Drôme et des Hautes-Alpes a été réalisée dans cette intention de pouvoir identifier le cas échéant des cas d'infestation plus au sud (Umhang et al., 2016a). L'identification du parasite dans les Hautes-Alpes a donc permis de repousser plus au sud la zone d'enzootie connue en France. Toutefois, l'échantillon à résultat positif situé autour de Gap pose la question des hôtes intermédiaires impliqués en l'absence de *M. arvalis*. De futures études dans cette zone apparaissent nécessaires pour caractériser le cycle parasitaire, principalement au niveau des hôtes intermédiaires qui y sont régulièrement piégés, d'autant que le climat méditerranéen de la zone devrait supposément jouer un rôle au moins aussi important dans la survie des œufs dans l'environnement.

Depuis 2016, une nouvelle étude de surveillance de l'infestation par *E. multilocularis* chez le renard a été initiée par l'ELIZ pour ses départements adhérents, en collaboration avec le LNR et l'Université de Franche-Comté. Aucun nouveau département ne s'est ajouté par rapport à l'étude précédente (Combes et al., 2012; Combes et al., 2013), en revanche plusieurs autres ont décliné leur participation. Il en résulte malheureusement que la couverture géographique sera moins importante que pour l'étude précédente. Environ 10 ans après l'étude précédente, il est tout de même probable que de nouveaux départements s'ajouteront à la liste actuelle des 39 départements enzootique. En effet, en zone de très faible enzootie (<5 %), l'analyse de 100 renards peut ne pas être suffisante pour exclure la présence du parasite. De plus, il a également été constaté au cours des 20 dernières années (1984-1987 à 2006-2010) une forte tendance à l'augmentation des taux de prévalence d'infestation vulpine dans les zones historiques d'enzootie en France. Dans un contexte européen similaire d'augmentation de la prévalence d'infestation vulpine (Karamon et al., 2014; Karamon et al., 2015; König et al., 2005), l'observation de l'évolution en France constitue certainement le point épidémiologique d'intérêt majeur de l'étude. Le protocole d'échantillonnage et d'analyse des intestins par SSCT (Umhang et al., 2011) sera le même, ce qui facilitera les comparaisons des niveaux de prévalence. Toutefois, l'échantillonnage des renards étant souvent réalisé majoritairement sur une année, il sera nécessaire de prendre en compte l'effet de potentielles variations interannuelles qui demeurent encore actuellement inconnues. Une nuance importante dans le protocole consistera cette fois dans le fait que le LNR sera amené à recevoir des vers de tous les renards ayant fourni un résultat positif au cours de l'étude. En plus de la confirmation du diagnostic, il s'agira de pouvoir disposer du matériel biologique nécessaire pour réaliser une étude génétique plus complète avec le microsatellite EmsB, afin de conforter ou revoir le scénario spatio-temporel précédemment décrit (Umhang et al., 2014d).

La présence d'échinocoques chez les hôtes définitifs a été étudiée par le LNR chez le renard, le chien et le chat mais d'autres carnivores sauvages présents en France tels le loup, le chat forestier et le chien viverrin peuvent être potentiellement infestés. Dans le cadre d'une collaboration avec l'ONCFS, le LNR envisage donc d'aller explorer la présence du parasite chez ces espèces afin de pouvoir disposer d'une évaluation globale de leur rôle épidémiologique respectif mais aussi à une échelle plus locale. L'infestation du chat forestier a déjà été abordée par l'analyse des intestins de cinq individus collectés dans les Ardennes et semble être similaire à celle du chat domestique (Umhang et al., 2015). L'analyse de nouveaux échantillons permettra d'affiner les connaissances actuellement rares sur le potentiel biotique de cette espèce pour *E. multilocularis*. Les effectifs de populations de chien viverrin sont très réduits en France (Léger and Ruetten, 2014). Pourtant, le chien viverrin devrait voir ses effectifs augmenter dans les prochaines décennies du fait de l'expansion de son aire de répartition constatée en Europe de l'est depuis l'ex-Union Soviétique. Les infestations expérimentales ont démontré qu'il a un très bon potentiel biotique pour *E. multilocularis*. Les informations provenant d'Allemagne (Schwarz et al., 2011) et d'Europe de l'est démontrent que les prévalences sont toutefois plus faibles chez cette espèce que chez le renard au sein d'une même zone. Son expansion prévue en France en provenance de l'est coïncide d'ailleurs avec la zone historique d'enzootie de l'infestation par *E. multilocularis*, où les prévalences sont les plus fortes actuellement. La mise en place d'une surveillance alors que les effectifs de cette espèce sont encore faibles apparaît intéressante afin de pouvoir suivre l'évolution de leur prévalence avec les augmentations de densité de population. En raison de sa proximité génétique avec le chien et de son régime alimentaire pouvant aller du chevreuil au rongeur en passant par le mouton, le loup apparaît comme un hôte définitif potentiel à la fois pour *E. granulosus* s.s. et pour *E. multilocularis*. Une analyse moléculaire actuellement en cours des fèces de loups collectées dans le cadre de l'évaluation des effectifs de populations dirigée par l'ONCFS devrait pouvoir permettre d'obtenir des informations quant à la fréquence d'infestation de ce carnivore par *E. granulosus*. La collecte des fèces est basée sur des critères morphologiques qui ne sont pas infaillibles. Afin de s'assurer de l'espèce animale concernée, une analyse moléculaire permettra de distinguer les fèces de loup de celles de chiens ou encore de renard. Ainsi, il sera possible d'évaluer le rôle du loup dans l'épidémiologie d'*E. granulosus* mais aussi celui du chien dans les mêmes zones. L'étude de l'infestation des chiens principalement dans les zones d'alpages n'a pu encore être réalisée en raison des difficultés logistiques à collecter en grand nombre des fèces et constituera donc une donnée inédite. L'analyse des intestins des loups tués accidentellement ou dans le cadre du protocole de régulation de la population permettra de compléter ces données.

La présence de cas d'infestation par *E. granulosus* s.l. à travers toute la France a été très surprenante dans le contexte sanitaire actuel de l'abattage obligatoire des animaux de rente à l'abattoir. Il apparaît ainsi intéressant de pouvoir identifier les raisons précises et actuelles du maintien du cycle parasitaire dans les élevages. A partir de zones regroupant plusieurs élevages présentant des cas d'infestation par *E. granulosus* s.s. ou *E. ortleppi*, Le LNR envisage de mener une enquête épidémiologique intégrant les différents acteurs que sont les éleveurs, les agents des abattoirs, les vétérinaires ainsi que la DGAI. Le but sera d'identifier les différentes failles potentielles dans le système sanitaire actuel conduisant à la consommation des viscères parasités par les chiens qui constituent l'étape clé de la lutte contre *E. granulosus* s.l.

A l'international, les collaborations actuelles se poursuivent, notamment pour l'expertise des analyses EmsB concernant *E. multilocularis* de manière ponctuelle, mais aussi dans le cadre d'études plus globales. Ainsi, à l'échelle européenne, la transmission d'*E. multilocularis* a été précédemment décrite à partir du foyer historique (sud de l'Allemagne, Suisse, est de la France, Autriche) (Knapp et al., 2009a). Cependant les nouvelles données obtenues à partir du microsatellite EmsB dans des pays de l'Europe de l'est comme la Pologne (Umhang et al. 2017) et l'Estonie (Laurimaa et al., 2015) posent question quant à l'existence de l'influence d'un autre foyer plus à l'est, vers la Russie et l'Asie, où le foyer chinois est très important. Les données de type EmsB de l'Europe de l'est disponibles actuellement ne permettent pas de confirmer ou d'infirmer l'existence et le rôle éventuel de la connexion avec un second foyer. J'ai ainsi initié une étude concernant les pays endémiques de l'Europe de l'est afin de pouvoir statuer sur l'influence du foyer historique de l'Europe de l'ouest et sur l'existence d'un second foyer. Une meilleure compréhension de la transmission du

parasite permettrait d'interpréter de manière plus juste l'expansion et l'augmentation des prévalences d'infestation vulpines constatées dans ces pays.

Les collaborations portant sur *E. granulosus* ont pour principal sujet l'épidémiologie de l'infestation par le parasite dans le pays concerné. Ainsi, une étude en cours avec la Moldavie va explorer la présence d'*E. granulosus s.l.* chez les porcs élevés en extérieur. L'examen de 12 700 suidés provenant de l'élevage intensif n'avait pas permis lors des études précédentes l'identification de cas (Chihai et al., 2016). Les porcs sont sensibles à *E. granulosus s.s.* hyper endémique en Moldavie (Umhang et al., 2014a) et à *E. canadensis* G6-7, qui a notamment déjà été identifié en Roumanie voisine (Morariu et al., 2011). Ces deux espèces sont celles ayant le plus gros impact zoonotique au sein du complexe *E. granulosus s.l.* (Alvarez Rojas et al., 2014). L'identification moléculaire à partir de kystes hydatiques provenant de porcins mais aussi de cas humains devrait permettre de disposer d'une vision plus précise de la présence potentielle d'*E. canadensis* G6-7 en Moldavie afin de pouvoir adapter au plus juste les mesures de lutte nécessaires. En parallèle, l'initiation d'une collaboration avec le laboratoire de parasitologie-mycologie médicale et moléculaire de Monastir en Tunisie a pour but initial de réaliser une surveillance en abattoir des cas d'infestation par *E. granulosus* à travers tout le pays afin de disposer d'une vision de la situation épidémiologique du pays qui ne soit pas fondée uniquement sur les cas humains. Dans un second temps, il est aussi convenu de contribuer au développement d'outils d'épidémiologie moléculaire pour l'identification d'*E. granulosus*.

9.4.2. Développement de méthodes d'analyses : de la parasitologie classique à l'épidémiologie moléculaire

La méthode SSCT de dépistage d'*E. multilocularis* a été validée par le LNR uniquement chez le renard. Pourtant, dans un nombre grandissant de pays européens, le chien viverrin constitue également une cible potentielle de la surveillance de l'infestation par ce parasite. Le LNR envisage donc de valider cette technique pour ce carnivore afin de faciliter les analyses qui, en l'absence de validation du SSCT, doivent s'effectuer par SCT, et donc nécessiter le grattage et l'observation de l'ensemble du contenu intestinal. L'infestation expérimentale de chien viverrins devrait permettre de comparer les données avec celles obtenues pour le renard, afin de pouvoir proposer une combinaison de segments intestinaux réduisant le temps d'analyse sans nuire à la sensibilité requise.

Afin d'acquérir des données nouvelles quant à la transmission du parasite à l'homme, le LNR a pour perspectives de développer des méthodes permettant d'identifier la présence du parasite à partir de matrices environnementales telles que le sol, l'eau, les fruits et légumes. Cette démarche n'a été initiée que très récemment pour les échinocoques alors que des méthodes pour la détection dans ces matrices d'autres parasites tels que *Toxocara sp.* et *T. gondii* ont été décrites précédemment. Dans le cadre de la réalisation d'une thèse sur les risques de contamination parasitaire dans les potagers (RISKOJARDIN), le sol a été la matrice choisie par le LNR pour la première mise au point de méthodes. Une technique de flottaison/filtration a été retenue pour la concentration des œufs afin de permettre, après extraction de l'ADN du culot obtenu, une identification moléculaire par PCR temps-réel (Umhang et al. 2017). Le développement de méthodes à partir des autres types de matrices environnementales va se poursuivre. La disponibilité de ce type de données devrait permettre d'affiner la connaissance des facteurs de risque de contamination humaine dont la recherche est actuellement basée uniquement sur la collecte d'informations auprès de patients infestés par le parasite.

Actuellement l'épidémiologie moléculaire d'*E. granulosus* ne s'effectue que par l'analyse de séquences de gènes ou de portions de gènes principalement d'origine mitochondriale. En plus d'une très faible diversité génétique fréquemment observée, cette approche s'avère fastidieuse. Tirant profit de l'expérience accumulée avec EmsB, le LNR en collaboration avec le CNR a choisi de développer des outils microsatellites pour explorer la diversité génétique d'*E. granulosus s.s.* principalement. Contrairement à EmsB, il s'agissait cette fois d'obtenir des microsatellites classiques (simple locus) à partir d'une recherche *in silico* dans le génome d'*E. granulosus* récemment publié (Tsai et al., 2013; Zheng et al., 2013). L'utilisation de microsatellites doit

permettre de mettre en évidence une diversité génétique potentiellement plus importante et ce, de manière plus rapide et moins lourde en comparaison du séquençage classique de gènes mitochondriaux ou nucléaires classiquement utilisé. Ainsi deux cibles microsatellites ont déjà été identifiées et s'avèrent extrêmement discriminantes, pouvant laisser envisager leur utilisation pour étudier la variabilité génétique intra-individuelle présente au niveau d'un hôte, actuellement peu abordée et ce, uniquement par l'analyse de séquences partielles de gènes mitochondriaux (Umhang et al. en préparation). L'accès à cette diversité génétique accrue pourra être mise à profit dans le but d'améliorer la compréhension de la dispersion du parasite à une échelle locale mais aussi potentiellement plus large au niveau national et continental.

10. Conclusion

Les travaux que j'ai pu mener pendant dix ans au sein du LNR et avec ses collaborateurs ont grandement contribué à améliorer les connaissances épidémiologiques sur *E. multilocularis* et *E. granulosus s.l.* en France. Ces travaux ont porté sur des études de surveillance du parasite avec une couverture géographique très largement supérieure à celles réalisées auparavant, mais ils ont aussi été complétés par l'exploration de différents hôtes et matrices biologiques. Les études d'épidémiologie moléculaire menées ont permis d'améliorer la compréhension de la dynamique d'expansion d'*E. multilocularis* en Europe, et d'obtenir les premières identifications des espèces d'*E. granulosus s.l.* en France afin de caractériser les cycles parasitaires actuellement actifs.

Ces études ont entraîné le développement et la maîtrise de plusieurs méthodes de diagnostic/dépistage et d'épidémiologie moléculaire, à la pointe de ce qui est réalisé dans le domaine des échinocoques dans le monde, permettant désormais au LNR de disposer d'un statut reconnu sur le plan de l'expertise ainsi que de collections biologiques (ADN, fèces, vers, kystes) précieuses pour de nouvelles études. Les collaborations nationales ou internationales du LNR qui se sont largement développées au cours des dernières années ont été indispensables pour mener une approche multidisciplinaire, mêlant principalement parasitologie, épidémiologie, écologie et biologie moléculaire, afin d'obtenir une exploitation maximale des données recueillies. Tout cela s'est notamment matérialisé par une valorisation des travaux du LNR à travers plus de 30 publications scientifiques dans des revues internationales à comité de lecture entre 2011 et 2016. Ainsi, le LNR n'a eu cesse d'accroître sa crédibilité en tant qu'interlocuteur auprès de la DGAI mais aussi de l'AESA, du laboratoire de référence européen des parasites de Rome et de ces divers autres partenaires.

La disponibilité de ces nouvelles données épidémiologiques a permis d'aboutir à une meilleure appréhension du risque zoonotique lié aux échinocoques en France principalement dans les zones où le niveau de prévalence devient préoccupant, ce qui a conduit à des actions de santé publique basées sur la diffusion d'informations concernant les zones et le niveau d'enzootie, mais également du risque zoonotique lié aux carnivores domestiques. Les travaux menés de front sur les hôtes intermédiaires et définitifs d'*E. multilocularis* et d'*E. granulosus s.l.* ont permis de souligner les similitudes et les différences au niveau écologique et biologique dans leurs stratégies de transmission. La fréquence d'infestation potentiellement plus faible des hôtes définitifs pour *E. granulosus*, car liée à un cycle domestique, est compensée par une période patente beaucoup plus longue ainsi que par une durée d'exposition des hôtes intermédiaires également très supérieure, par rapport au cycle sylvatique d'*E. multilocularis*. Ainsi, il est intéressant de souligner que certaines caractéristiques de la relation hôte parasite semblent persister au-delà de l'espèce parasitaire infestante concernée. La durée supérieure de la période prépatente d'*E. multilocularis* chez le chien par rapport au renard peut être mise en relation avec celle très longue d'*E. granulosus s.s.* chez le chien. Pour chacune des espèces parasitaires *E. granulosus* et *E. multilocularis*, une espèce de carnivore est clairement identifiée comme hôte définitif principal et une espèce ou souvent un groupe d'espèces de mammifères constituent les hôtes intermédiaires principaux. Cela peut être considéré comme la résultante de l'optimisation de l'évolution de ces espèces d'échinocoques en vue de la perpétuation des cycles parasitaires. Toutefois le spectre d'hôtes est beaucoup plus large, impliquant d'autres espèces animales, mais celles-ci ont un potentiel biotique souvent moindre voire inexistant et/ou une probabilité de contribution à la perpétuation du cycle très faible. Cette diversité d'espèces au niveau de l'infestation témoigne en tout état de cause de la plasticité d'adaptation des échinocoques, surtout au niveau du metacestode, qui a pu conduire à la diversité actuelle des hôtes.

Si la lutte contre les échinocoques en France ne consiste pas une des missions principales du LNR, des évaluations de l'efficacité de méthodes de lutte contre *E. multilocularis* ont été réalisées. Le LNR apparaît comme un interlocuteur privilégié dans l'éventualité de nouvelles expérimentations. Les données acquises sur l'infestation des hôtes définitifs et intermédiaires pourront être complétées prochainement par des données

nouvelles concernant l'identification du parasite dans des matrices environnementales, notamment la terre. L'exploitation de ces données de contamination des hôtes et de l'environnement devrait contribuer à une meilleure connaissance de l'épidémiologie des échinocoques et des sources d'infestation pour l'homme ainsi qu'à une meilleure caractérisation des risques pour ce dernier.

Références bibliographiques

- Abbas, A., 1991. Feeding strategy of coypu (*Myocastor coypus*) in central western France. *Journal of Zoology* 224, 385-401.
- Abbasi, I., Branzburg, A., Campos-Ponce, M., Abdel Hafez, S.K., Raoul, F., Craig, P.S. and Hamburger, J., 2003. Copro-diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in dogs by amplification of a newly identified repeated DNA sequence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 69, 324-330.
- Addy, F., Wassermann, M., Banda, F., Mbaya, H., Aschenborn, J., Aschenborn, O., Koskei, P., Umhang, G., De La Rue, M., Elmahdi, I.E., Mackenstedt, U., Kern, P. and Romig, T., 2016. Genetic polymorphism and population structure of *Echinococcus orteppi*. *Parasitology* 144, 450-458.
- Al-Sabi, M.N., Kapel, C.M., Deplazes, P. and Mathis, A., 2007. Comparative copro-diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes. *Parasitology Research* 101, 731-736.
- Allan, J.C., Craig, P.S., Garcia Noval, J., Mencos, F., Liu, D., Wang, Y., Wen, H., Zhou, P., Stringer, R., Rogan, M. and et al., 1992. Coproantigen detection for immunodiagnosis of echinococcosis and taeniasis in dogs and humans. *Parasitology* 104 (Pt 2), 347-356.
- Alvarez Rojas, C.A., Romig, T. and Lightowers, M.W., 2014. *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes infecting humans - review of current knowledge. *International Journal for Parasitology* 44, 9-18.
- Anonyme. 2013. Delivering alien invasive species inventories for Europe (DAISIE). Available at: <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/data/external/daisie-delivering-alien-invasive-species>.
- Artois, M., 1989. Le renard roux (*Vulpes vulpes Linnaeus, 1758*) SFEPM, Puceul, Nort s/Erdre, 90 p.
- Ashford, R.W. and Crewe, W., 1998. The parasites of Homo sapiens. Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, United Kingdom.
- Azlaf, R. and Dakkak, A., 2006. Epidemiological study of the cystic echinococcosis in Morocco. *Veterinary Parasitology* 137, 83-93.
- Azlaf, R., Dakkak, A., Chentoufi, A. and El Berrahmani, M., 2007. Modelling the transmission of *Echinococcus granulosus* in dogs in the northwest and in the southwest of Morocco. *Veterinary Parasitology* 145, 297-303.
- Bagrade, G., Kirjuina, M., Vismanis, K. and Ozoli, J., 2009. Helminth parasites of the wolf *Canis lupus* from Latvia. *Journal of Helminthology* 83, 63-68.
- Bardonnet, K., Benchikh-Elfegoun, M.C., Bart, J.M., Harraga, S., Hannache, N., Haddad, S., Dumon, H., Vuitton, D.A. and Piarroux, R., 2003. Cystic echinococcosis in Algeria: cattle act as reservoirs of a sheep strain and may contribute to human contamination. *Veterinary Parasitology* 116, 35-44.
- Barrat, J., Richomme, C. and Moinet, M., 2010. The accidental release of exotic species from breeding colonies and zoological collections. *Revue Scientifique et Technique de l' Office International des Epizooties* 29, 113-122.
- Bart, J.M., Knapp, J., Gottstein, B., El-Garch, F., Giraudoux, P., Glowatzki, M.L., Berthoud, H., Maillard, S. and Piarroux, R., 2006a. EmsB, a tandem repeated multi-loci microsatellite, new tool to investigate the genetic diversity of *Echinococcus multilocularis*. *Infection, Genetics and Evolution* 6, 390-400.
- Bart, J.M., Morariu, S., Knapp, J., Ilie, M.S., Pitulescu, M., Anghel, A., Cosoroaba, I. and Piarroux, R., 2006b. Genetic typing of *Echinococcus granulosus* in Romania. *Parasitology Research* 98, 130-137.
- Benito, A. and Carmena, D., 2005. Double-antibody sandwich ELISA using biotinylated antibodies for the detection of *Echinococcus granulosus* coproantigens in dogs. *Acta Tropica* 95, 9-15.
- Bichet, H. and Dorchies, P., 1998. Estimation du taux de prevalence de l'hydatidose bovine en Midi-Pyrénées. *Parasite* 5, 61-68.
- Bondari, L. 1992. Echinococcosis in animals in the Republic of Moldova (biology, epizootology, chemotherapy and prevention). Ph D Thesis, Institute of Zoology, Academy of Sciences of Moldova, Stiinta, Chisinau.
- Borecka, A., Gawor, J., Malczewska, M. and Malczewski, A., 2007. Prevalence of *Echinococcus multilocularis* tapeworm in red foxes in central Poland. *Medycyna Weterynaryjna*. 63, 1333-1335.
- Borecka, A., Gawor, J., Malczewska, M. and Malczewski, A., 2008. Occurrence of *Echinococcus multilocularis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in southern Poland. *Helminthologia* 45, 24-27.
- Borgsteede, F.H.M., Tibben, J.H. and Van Der Giessen, J.W.B., 2003. The musk rat (*Ondatra zibethicus*) as intermediate host of cestodes in the Netherlands. *Veterinary Parasitology* 117, 29-36.
- Boubaker, G., Macchiaroli, N., Prada, L., Cucher, M.A., Rosenzvit, M.C., Ziadinov, I., Deplazes, P., Saarma, U., Babba, H., Gottstein, B. and Spiliotis, M., 2013. A multiplex PCR for the simultaneous detection and genotyping of the *Echinococcus granulosus* complex. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7, e2017.

- Boué, F., El Berbri, I., Hormaz, V., Boucher, J.-M., El Mamy, A.B., Traore, A., Fassi Fihri, O., Petavy, A.-F., Dakkak, A. and Umhang, G., 2017. Use of FTA® card methodology for sampling and molecular characterization of *Echinococcus granulosus sensu lato* in Africa. *Experimental Parasitology* 173, 29-33.
- Boufana, B., Stidworthy, M.F., Bell, S., Chantrey, J., Masters, N., Unwin, S., Wood, R., Lawrence, R.P., Potter, A., McGarry, J., Redrobe, S., Killick, R., Foster, A.P., Mitchell, S., Greenwood, A.G., Sako, Y., Nakao, M., Ito, A., Wyatt, K., Lord, B. and Craig, P.S., 2012. *Echinococcus* and *Taenia spp.* from captive mammals in the United Kingdom. *Veterinary Parasitology* 190, 95-103.
- Boufana, B., Umhang, G., Qiu, J., Chen, X., Lahmar, S., Boue, F., Jenkins, D. and Craig, P., 2013. Development of three PCR assays for the differentiation between *Echinococcus shiquicus*, *E. granulosus* (G1 genotype), and *E. multilocularis* DNA in the co-endemic region of Qinghai-Tibet plateau, China. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 88, 795-802.
- Boufana, B., Lahmar, S., Rebai, W., Ben Safta, Z., Jebabli, L., Ammar, A., Kachti, M., Aouadi, S. and Craig, P.S., 2014. Genetic variability and haplotypes of *Echinococcus* isolates from Tunisia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 108, 706-714.
- Boufana, B.S., Campos-Ponce, M., Naidich, A., Buishi, I., Lahmar, S., Zeyhle, E., Jenkins, D.J., Combes, B., Wen, H., Xiao, N., Nakao, M., Ito, A., Qiu, J. and Craig, P.S., 2008. Evaluation of three PCR assays for the identification of the sheep strain (genotype 1) of *Echinococcus granulosus* in canid feces and parasite tissues. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 78, 777-783.
- Boussinesq, M., Bresson, S., Liance, M. and Houin, R., 1986. Un nouvel hôte intermédiaire naturel d'*Echinococcus multilocularis* en France : le rat musqué (*Ondatra zibethicus* L.). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 61, 431-434.
- Bowles, J., Blair, D. and McManus, D.P., 1992. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular Biochemistry and Parasitology* 54, 165-173.
- Bowles, J. and McManus, D.P., 1993. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *International Journal for Parasitology* 23, 969-972.
- Bowles, J., Blair, D. and McManus, D.P., 1994. Molecular genetic characterization of the cervid strain ('northern form') of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 109 (Pt 2), 215-221.
- Bowles, J., Blair, D. and McManus, D.P., 1995. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. *Parasitology* 110 (Pt 3), 317-327.
- Bresson Hadni, S., Grenouillet, F., Chauchet, A., Richou, C., Knapp, J., Delabrousse, E., Adrian-Félix, S., Blagosklonov, O., Vuitton, D.A. and Millon, L., 2014. Diagnostic de l'échinococcose alvéolaire. *Revue Francophone des Laboratoires*, (464), 77-87.
- Bretagne, S., Guillou, J.P., Morand, M. and Houin, R., 1993. Detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in fox faeces using DNA amplification. *Parasitology* 106 (Pt 2), 193-199.
- Bretagne, S., Assouline, B., Vidaud, D., Houin, R. and Vidaud, M., 1996. *Echinococcus multilocularis*: microsatellite polymorphism in U1 snRNA genes. *Experimental Parasitology* 82, 324-328.
- Brunetti, E., Kern, P. and Vuitton, D.A., 2010. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Tropica* 114, 1-16.
- Bruzinskaite, R., Sarkunas, M., Torgerson, P.R., Mathis, A. and Deplazes, P., 2009. Echinococcosis in pigs and intestinal infection with *Echinococcus spp.* in dogs in southwestern Lithuania. *Veterinary Parasitology* 160, 237-241.
- Budke, C.M., Deplazes, P. and Torgerson, P.R., 2006. Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerging Infectious Diseases* 12, 296-303.
- Buishi, I.E., Njoroge, E.M., Bouamra, O. and Craig, P.S., 2005. Canine echinococcosis in northwest Libya: assessment of coproantigen ELISA, and a survey of infection with analysis of risk-factors. *Veterinary Parasitology* 130, 223-232.
- Cabrera, M., Canova, S., Rosenzvit, M. and Guarnera, E., 2002. Identification of *Echinococcus granulosus* eggs. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 44, 29-34.
- Callait, M.P. 2003. *Marmota marmota*, intermediate host of *Echinococcus multilocularis*: Identification of three cases in French Alps. In: Ramousse, R., , Allainé, D., Le Berre, M. (Eds), *Adaptive strategies and diversity in marmots / Stratégies adaptatives et diversité chez les marmottes*. International Marmot Network Publisher, Lyon, pp. 9-10.
- Cannon, R.M. and Roe, R.T., 1982. *Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians*. Australian Government Publishing Service, Canberra.
- Cardona, G.A. and Carmena, D., 2013. A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. *Veterinary Parasitology* 192, 10-32.

- Carmena, D. and Cardona, G.A., 2013. Canine echinococcosis: Global epidemiology and genotypic diversity. *Acta Tropica* 128, 441-460.
- Carmena, D. and Cardona, G.A., 2014. Echinococcosis in wild carnivorous species: epidemiology, genotypic diversity, and implications for veterinary public health. *Veterinary Parasitology* 202, 69-94.
- Casabianca, F. 1996. Viandes et produits de charcuterie, Corse : produits du terroir et recettes traditionnelles. Albin Michel, Paris, 335 p.
- Casulli, A., Bart, J.M., Knapp, J., La Rosa, G., Dusher, G., Gottstein, B., Di Cerbo, A., Manfredi, M.T., Genchi, C., Piarroux, R. and Pozio, E., 2009. Multi-locus microsatellite analysis supports the hypothesis of an autochthonous focus of *Echinococcus multilocularis* in northern Italy. *International Journal for Parasitology* 39, 837-842.
- Casulli, A., Szell, Z., Pozio, E. and Sreter, T., 2010. Spatial distribution and genetic diversity of *Echinococcus multilocularis* in Hungary. *Veterinary Parasitology* 174, 241-246.
- Casulli, A., Interisano, M., Sreter, T., Chitimia, L., Kirkova, Z., La Rosa, G. and Pozio, E., 2012. Genetic variability of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in Europe inferred by mitochondrial DNA sequences. *Infection, Genetics and Evolution* 12, 377-383.
- Casulli, A., Possenti, A., La Torre, G., Boue, F., Busani, L., Colamesta, V., Conraths, F.J., d'Aguzzo, S., De Giusti, M., De Vito, C., Karamon, J., Maas, M., Mannocci, A., Maffongelli, E., Mipatrini, D., Oksanen, A., Probst, C., Saulle, R., Siles-Lucas, M., Umhang, G., van den End, S., van Der Giessen, J.W.B. and Villari, P. 2015. *Echinococcus multilocularis* infection in animals. GP/EFSA/AHAW/2012/01 External Scientific Report, EFSA, 168 p.
- Chihai, O., Umhang, G., Erhan, D., Boue, F., Talambuta, N., Rusu, S. and Zamornea, M., 2016. Slaughterhouse survey of cystic echinococcosis in cattle and sheep from the Republic of Moldova. *Journal of Helminthology* 90, 279-283.
- Clement, M., Posada, D. and Crandall, K.A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9, 1657-1659.
- Combes, B., Comte, S., Raton, V., Raoul, F., Boue, F., Umhang, G., Favier, S., Dunoyer, C., Woronoff, N. and Giraudoux, P., 2012. Westward spread of *Echinococcus multilocularis* in foxes, France, 2005–2010. *Emerging Infectious Diseases* 18, 2059-2062.
- Combes, B., Comte, S., Raton, V., Raoul, F., Boue, F., Umhang, G., Favier, S., Dunoyer, C., Woronoff-Rehn, N. and Giraudoux, P., 2013. Expansion géographique du parasite *Echinococcus multilocularis* chez le renard en France. *Bulletin Épidémiologique, Santé Animale et Alimentation*, (57), 16-18.
- Comte, S., Raton, V., Raoul, F., Hegglin, D., Giraudoux, P., Deplazes, P., Favier, S., Gottschek, D., **Umhang, G.**, Boué, F., Combes B. Fox baiting against *Echinococcus multilocularis*: contrasted achievements among two medium size cities. *Preventive Veterinary Medicine*, 2013, 111(1-2), 147-155.
- Conraths, F.J. and Deplazes, P., 2015. *Echinococcus multilocularis*: Epidemiology, surveillance and state-of-the-art diagnostics from a veterinary public health perspective. *Veterinary Parasitology* 213, 149-161.
- Contesse, P., Hegglin, D., Gloor, S., Bontadina, F. and Deplazes, P., 2004. The diet of urban foxes (*Vulpes vulpes*) and the availability of anthropogenic food in the city of Zurich, Switzerland. *Mammalian Biology* 69, 81-95.
- Covaly, E.G. 1960. Diagnosis and treatment of hydatid disease of the liver. Ph D Thesis, Institute of Medicine, Chisinau, Moldova.
- Cox, F.E., 2002. History of human parasitology. *Clinical Microbiology Review* 15, 595-612.
- Craig, P., Mastin, A., van Kesteren, F. and Boufana, B., 2015. *Echinococcus granulosus*: Epidemiology and state-of-the-art of diagnostics in animals. *Veterinary Parasitology* 213, 132-148.
- Craig, P.S., Gasser, R.B., Parada, L., Cabrera, P., Parietti, S., Borgues, C., Acuttis, A., Agulla, J., Snowden, K. and Paolillo, E., 1995. Diagnosis of canine echinococcosis: comparison of coproantigen and serum antibody tests with arecoline purgation in Uruguay. *Veterinary Parasitology* 56, 293-301.
- Craig, P.S., 1997. *Echinococcus granulosus*: immunodiagnosis and vaccination, a perspective. *Parassitologia* 39, 345-347.
- Craig, P.S. and Larrieu, E., 2006. Control of cystic echinococcosis/hydatidosis: 1863-2002. *Advances in Parasitology* 61, 443-508.
- Craig, P.S., McManus, D.P., Lightowers, M.W., Chabalgoity, J.A., Garcia, H.H., Gavidia, C.M., Gilman, R.H., Gonzalez, A.E., Lorca, M., Naquira, C., Nieto, A. and Schantz, P.M., 2007. Prevention and control of cystic echinococcosis. *Lancet Infectious Diseases* 7, 385-394.
- Crellin, J.R., Marchiondo, A.A. and Andersen, F.L., 1981. Comparison of suitability of dogs and cats as hosts of *Echinococcus multilocularis*. *American Journal of Veterinary Research* 42, 1980-1981.

- D'Alessandro, A. and Rausch, R.L., 2008. New aspects of neotropical polycystic (*Echinococcus vogeli*) and unicystic (*Echinococcus oligarthrus*) echinococcosis. *Clinical Microbiology Reviews* 21, 380-401.
- Dakkak, A., 2010. Echinococcosis/hydatidosis: A severe threat in Mediterranean countries. *Veterinary Parasitology* 174, 2-11.
- Davidson, R.K., Øines, Ø., Hamnes, I.S. and Schulze, J.E., 2013. Illegal wildlife imports more than just animals-*Baylisascaris procyonis* in raccoons (*Procyon lotor*) in Norway. *Journal of Wildlife Diseases* 49, 986-990.
- de la Rue, M.L., Takano, K., Brochado, J.F., Costa, C.V., Soares, A.G., Yamano, K., Yagi, K., Katoh, Y. and Takahashi, K., 2011. Infection of humans and animals with *Echinococcus granulosus* (G1 and G3 strains) and *E. ortleppi* in Southern Brazil. *Veterinary Parasitology* 177, 97-103.
- De Liberato, C., Berrilli, F., Meoli, R., Friedrich, K.G., Di Cerbo, P., Cocumelli, C. and Eleni, C., 2014. Fatal infection with *Taenia martis* metacestodes in a ring-tailed lemur (*Lemur catta*) living in an Italian zoological garden. *Parasitology International* 63, 695-697.
- Deblock, S., Prost, C., Walbaum, S. and Petavy, A.F., 1989. *Echinococcus multilocularis*: a rare cestode of the domestic cat in France *International Journal for Parasitology* 19, 687-688.
- Debourgogne, A., Blanchet, D., Fior, A., Umhang, G., Simon, S. and Aznar, C., 2017. Neotropical echinococcosis caused by *Echinococcus vogeli* in a 6-year-old child: the second case report in humans in French Guiana. *Paediatrics and International Child Health* 37, 63-65.
- Denzin, N., Schliephake, A., Fröhlich, A., Ziller, M. and Conraths, F.J., 2014. On the Move? *Echinococcus multilocularis* in red foxes of Saxony-Anhalt (Germany). *Transboundary and Emerging Diseases* 61, 239-246.
- Depaquit, J., Gallego, A., Usseglio, F., Liance, M. and Favriel, J.M., 1998. L'echinococcose alveolaire dans le departement francais des Ardennes: cas isolés ou nouveau foyer? *Parasite* 5, 285-287.
- Deplazes, P., Gottstein, B., Eckert, J., Jenkins, D.J., Ewald, D. and Jimenez-Palacios, S., 1992. Detection of *Echinococcus* coproantigens by enzyme-linked immunosorbent assay in dogs, dingoes and foxes. *Parasitology Research* 78, 303-308.
- Deplazes, P., Alther, P., Tanner, I., Thompson, R.C.A. and Eckert, J., 1999. *Echinococcus multilocularis* coproantigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay in fox, dog, and cat populations. *Journal of Parasitology* 85, 115-121.
- Deplazes, P. and Eckert, J., 2001. Veterinary aspects of alveolar echinococcosis--a zoonosis of public health significance. *Veterinary Parasitology* 98, 65-87.
- Deplazes, P., Dinkel, A. and Mathis, A., 2003. Molecular tools for studies on the transmission biology of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology* 127 Suppl, S53-S61.
- Deplazes, P., Hegglin, D., Gloor, S. and Romig, T., 2004. Wilderness in the city: The urbanization of *Echinococcus multilocularis*. *Trends in Parasitology* 20, 77-84.
- Deschiens, R., 1960. Considérations épidémiologiques et sanitaires sur l'hydatidose humaine dans le bassin méditerranéen et en Corse. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 53, 971-990.
- Dinkel, A., von Nickisch-Roseneck, M., Bilger, B., Merli, M., Lucius, R. and Romig, T., 1998. Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 1871-1876.
- Dinkel, A., Njoroge, E.M., Zimmermann, A., Walz, M., Zeyhle, E., Elmahdi, I.E., Mackenstedt, U. and Romig, T., 2004. A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus*-complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa. *International Journal for Parasitology* 34, 645-653.
- Dinkel, A., Kern, S., Brinker, A., Oehme, R., Vaniscotte, A., Giraudoux, P., Mackenstedt, U. and Romig, T., 2011. A real-time multiplex-nested PCR system for coprological diagnosis of *Echinococcus multilocularis* and host species. *Parasitology Research* 109, 493-498.
- Dore, F., Varcasia, A., Pipia, A.P., Sanna, G., Pinna Parpaglia, M.L., Corda, A., Romig, T. and Scala, A., 2014. Ultrasound as a monitoring tool for cystic echinococcosis in sheep. *Veterinary Parasitology* 203, 59-64.
- Dumon, H., Raoult, D., Ramahandridona, N. and Quilici, M., 1981. L'hydatidose en Provence et en Corse. Enquête épidémiologique. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 74, 96-100.
- Duscher, G., Prosl, H. and Joachim, A., 2005. Scraping or shaking - A comparison of methods for the quantitative determination of *Echinococcus multilocularis* in fox intestines. *Parasitology Research* 95, 40-42.
- Duscher, G., Pleydell, D., Prosl, H. and Joachim, A., 2006. *Echinococcus multilocularis* in Austrian foxes from 1991 until 2004. *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 53, 138-144.
- Dyachenko, V., Beck, E., Pantchev, N. and Bauer, C., 2008a. Cost-effective method of DNA extraction from taeniid eggs. *Parasitology Research* 102, 811-813.

- Dyachenko, V., Pantchev, N., Gawlowska, S., Vrhovec, M.G. and Bauer, C., 2008b. *Echinococcus multilocularis* infections in domestic dogs and cats from Germany and other European countries. *Veterinary Parasitology* 157, 244-53.
- Eckert, J., Muller, B. and Partridge, A.J., 1974. The domestic cat and dog as natural definitive hosts of *Echinococcus (alveococcus) multilocularis* in southern federal republic of Germany. *Tropenmedezinin und Parasitologie* 25, 334-337.
- Eckert, J. and Deplazes, P., 1999. Alveolar echinococcosis in humans: the current situation in Central Europe and the need for countermeasures. *Parasitology Today* 15, 315-319.
- Eckert, J. and Deplazes, P., 2001. Immunological and molecular techniques for diagnosing the *Echinococcus multilocularis* infection in definitive and intermediate hosts. *Acta Parasitologica* 46, 1-7.
- Eckert, J., Gemmell, M.A., Meslin, F.X. and Pawlowski, Z.S., 2001. WHO/OIE Manual on echinococcosis in humans and animals : a public health problem of global concern. O.I.E. - O.M.S., Paris.
- Eckert, J., Deplazes, P. and Kern, P. 2011. Alveolar echinococcosis (*Echinococcus multilocularis*): and neotropical forms of echinococcosis (*Echinococcus vogeli* and *Echinococcus oligarthrus*). In: Palmer, S.R., Soulsby, L., Torgerson, P., Brown, D.W.G. (Eds), *Oxford Textbook of zoonoses: biology, clinical practice, and public health control*. Oxford University Press, Oxford, pp. 669-699.
- El Berbri, I., Petavy, A.F., Umhang, G., Bouslikhane, M., Fassi Fihri, O., Boue, F. and Dakkak, A., 2015. Epidemiological investigations on cystic echinococcosis in North-West (Sidi Kacem province) Morocco: Infection in ruminants. *Advances in Epidemiology*, (ID104025), 1-9.
- Enemark, H.L., Al-Sabi, M.N.S., Knapp, J., Staahl, M. and Chriel, M., 2013. Detection of a high-endemic focus of *Echinococcus multilocularis* in red foxes in southern Denmark, January 2013. *Eurosurveillance* 18, 1-4.
- Erhan, D. 2010. Mixed invasions in cattle (*Bos taurus*) in the republic of Moldova (epizootology, diagnostics, morphological and physiological changes, economic loss, prophylaxis and treatment). Ph D Thesis, Institute of Zoology, Academy of Sciences of Moldova, Chisinau, Moldova, 218 p.
- Fischer, C., Reperant, L.A., Weber, J.M., Hegglin, D. and Deplazes, P., 2005. *Echinococcus multilocularis* infections of rural, residential and urban foxes (*Vulpes vulpes*) in the canton of Geneva, Switzerland. *Parasite* 12, 339-346.
- Forin-Wiart, M.A. 2014. Identification des facteurs de variation de la prédation exercée par les chats domestiques (*Felis silvestris catus*) en milieu rural. Ph D Thesis, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, 294 p.
- Frank, B. and Zeyhle, E., 1981. Echinokokken- und andere Bandwurmlarven im Bisam (*Ondatra zibethicus*). *Nachrichtenblatt des deutschen Pflanzenschutzdienstes* 33, 166-170.
- Frank, W. 1987. *Echinococcus multilocularis* in Südwestdeutschland - Persistenz einer Zoonose im mitteleuropäischen Raum. In: Fricke, W., Hinz, E. (Eds), *Räumliche Persistenz und Diffusion von Krankheiten*. Selbstverlag des Geographischen Institutes der Universität Heidelberg, Heidelberg, pp. 86-113.
- Fuglei, E., Stien, A., Yoccoz, N.G., Ims, R.A., Eide, N.E., Prestrud, P., Deplazes, P. and Oksanen, A., 2008. Spatial distribution of *Echinococcus multilocularis*, Svalbard, Norway. *Emerging Infectious Diseases* 14, 73-75.
- Gasser, R.B., Zhu, X. and McManus, D.P., 1998. Display of sequence variation in PCR-amplified mitochondrial DNA regions of *Echinococcus* by single-strand conformation polymorphism. *Acta Tropica* 71, 107-115.
- Gemmell, M.A., 1973. Surveillance of *Echinococcus granulosus* in dogs with arecoline hydrobromide. *Bulletin of the World Health Organization* 48, 649-52.
- Germain, E., Ruette, S. and Poulle, M.L., 2009. Likeness between the food habits of European wildcats, domestic cats and their hybrids in France. *Mammal. Biology* 74, 412-417.
- Giraudoux, P., Delattre, P., Takahashi, K., Raoul, F., Quere, J.P., Craig, P. and Vuitton, D. 2002. Transmission ecology of *Echinococcus multilocularis* in wildlife: what can be learned from comparative studies and multi-scale approaches? In: Craig P, P.Z. (Ed), *Cestode zoonoses: echinococcosis and cysticercosis*. IOS Press, London, pp. 251-266.
- Giraudoux, P., Craig, P.S., Delattre, P., Bao, G., Bartholomot, B., Harraga, S., Quéré, J.P., Raoul, F., Wang, Y., Shi, D. and Vuitton, D.A., 2003. Interactions between landscape changes and host communities can regulate *Echinococcus multilocularis* transmission. *Parasitology* 127, S121-S131.
- Gottstein, B., Saucy, F., Deplazes, P., Reichen, J., Demierre, G., Busato, A., Zuercher, C. and Pugin, P., 2001. Is high prevalence of *Echinococcus multilocularis* in wild and domestic animals associated with disease incidence in humans ? *Emerging Infectious Diseases* 7, 408-412.
- Gottstein, B., Wang, J., Boubaker, G., Marinova, I., Spiliotis, M., Muller, N. and Hemphill, A., 2015. Susceptibility versus resistance in alveolar echinococcosis (larval infection with *Echinococcus multilocularis*). *Veterinary Parasitology* 213, 103-109.

- Grech-Angelini, S., Umhang, G., Richomme, C., Maestriani, O., Peytavin de Garam, C., Boucher, J.M., van Cauteren, D., Grenouillet, F., Casabianca, F. and Boue, F., 2015. Échinococcose kystique en Corse : identification d'*Echinococcus canadensis* chez le chien. Bulletin Epidémiologique, Santé Animale et Alimentation, (69), p 27.
- Grenouillet, F., Knapp, J., Millon, L., Raton, V., Richou, C., Piarroux, M., Piarroux, R., Manton, G., Vuitton, D.A. and Bresson Hadni, S., 2010. L'échinococcose alvéolaire humaine en France en 2010. Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire, (hors série), 24-25.
- Grenouillet, F., Chauchet, A., Richou, C., Vuitton, D.A., Knapp, J., Millon, L. and Bresson-Hadni, S., 2013. Échinococcose alvéolaire : épidémiologie, surveillance et prise en charge. Journal des Anti-infectieux 15, 204-214.
- Grenouillet, F., Umhang, G., Arbez-Gindre, F., Manton, G., Delabrousse, E., Millon, L. and Boue, F., 2014. *Echinococcus ortleppi* infections in humans and cattle, France. Emerging Infectious Diseases 20, 2100-2102.
- Guerra, D., Hegglin, D., Bacciarini, L., Schnyder, M. and Deplazes, P., 2014. Stability of the southern European border of *Echinococcus multilocularis* in the Alps: evidence that *Microtus arvalis* is a limiting factor. Parasitology 141, 1593-1602.
- Guislain, M.H., Raoul, F., Giraudoux, P., Terrier, M.E., Froment, G., Ferte, H. and Poulle, M.L., 2008. Ecological and biological factors involved in the transmission of *Echinococcus multilocularis* in the French Ardennes. Journal of Helminthology 82, 143-151.
- Haag, K.L., Zaha, A., Araújo, A.M. and Gottstein, B., 1997. Reduced genetic variability within coding and non-coding regions of the *Echinococcus multilocularis* genome. Parasitology 115, 521-529.
- Halliez, G., Renault, F., Vannard, E., Farny, G., Lavorel, S. and Giraudoux, P., 2015. Historical agricultural changes and the expansion of a water vole population in an Alpine valley. Agriculture, Ecosystems and Environment 212, 198-206.
- Hamrat, K., Achour, Y., Bouhousse, A. and Cozma, V., 2011. Study of the prevalence of *Echinococcus granulosus* in the south of Algeria (as in the Adrar region). Scientia Parasitologica 12, 219-221.
- Hanosset, R., Saegerman, C., Adant, S., Massart, L. and Losson, B., 2008. *Echinococcus multilocularis* in Belgium: prevalence in red foxes (*Vulpes vulpes*) and in different species of potential intermediate hosts. Veterinary Parasitology 151, 212-217.
- Hegglin, D., Ward, P.I. and Deplazes, P., 2003. Anthelmintic baiting of foxes against urban contamination with *Echinococcus multilocularis*. Emerging Infectious Diseases 9, 1266-1272.
- Hegglin, D., Bontadina, F., Contesse, P., Gloor, S. and Deplazes, P., 2007. Plasticity of predation behaviour as a putative driving force for parasite life-cycle dynamics: The case of urban foxes and *Echinococcus multilocularis* tapeworm. Functional Ecology 21, 552-560.
- Hegglin, D. and Deplazes, P., 2008. Control strategy for *Echinococcus multilocularis*. Emerging Infectious Diseases 14, 1626-1628.
- Hegglin, D. and Deplazes, P., 2013. Control of *Echinococcus multilocularis*: Strategies, feasibility and cost-benefit analyses. International Journal for Parasitology 43, 327-337.
- Henry, C. 2004. Organisation socio-spatiale d'une population de renards roux (*Vulpes vulpes*) en milieu rural : nature des relations et degrés de parenté entre individus de mêmes groupes spatiaux. Thèse Doct. Univ., Université Louis Pasteur, Strasbourg I, 152 p.
- Hiby, E., Eckman, H. and MacFarlane, I. 2014. Cat population management. In: Turner, D.C., Bateson, P. (Eds), The Domestic Cat: The Biology of its Behaviour. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 215-230.
- Hofer, S., Gloor, S., Müller, U., Mathis, A., Hegglin, D. and Deplazes, P., 2000. High prevalence of *Echinococcus multilocularis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) and voles (*Arvicola terrestris*) in the city of Zurich, Switzerland. Parasitology 120, 135-142.
- Houin, R., Deniau, M. and Liance, M., 1980. *Arvicola terrestris* (L.), premier rongeur trouvé naturellement infesté par *Echinococcus multilocularis*, Leuckart, 1863, en France. C.R. Acad. Sci. Paris 290, 1269-1271.
- Huttner, M., Nakao, M., Wassermann, T., Siefert, L., Boomker, J.D., Dinkel, A., Sako, Y., Mackenstedt, U., Romig, T. and Ito, A., 2008. Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. International Journal for Parasitology 38, 861-868.
- Ibrahim, M.M., Craig, P.S., McVie, A., Ersfeld, K. and Rogan, M.T., 1996. *Echinococcus granulosus* antigen B and seroreactivity in natural ovine hydatidosis. Research in Veterinary Science 61, 102-106.
- Inoue, T., Nonaka, N., Kanai, Y., Iwaki, T., Kamiya, M. and Oku, Y., 2007. The use of tetracycline in anthelmintic baits to assess baiting rate and drug efficacy against *Echinococcus multilocularis* in foxes. Veterinary Parasitology 150, 88-96.

- Isaksson, M., Hagstrom, A., Armua-Fernandez, M., Wahlstrom, H., Agren, E., Miller, A., Holmberg, A., Lukacs, M., Casulli, A., Deplazes, P. and Juremalm, M., 2014. A semi-automated magnetic capture probe based DNA extraction and real-time PCR method applied in the Swedish surveillance of *Echinococcus multilocularis* in red fox (*Vulpes vulpes*) faecal samples. *Parasites and Vectors* 7, 583.
- Jenkins, D.J. and Romig, T., 2000. Efficacy of Droncit Spot-on (praziquantel) 4% w/v against immature and mature *Echinococcus multilocularis* in cats. *International Journal for Parasitology* 30, 959-962.
- Jenkins, D.J., Romig, T. and Thompson, R.C., 2005. Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp.-a global update. *International Journal for Parasitology* 35, 1205-1219.
- Kamiya, M., Ooi, H.K. and Ohbayashi, M., 1986. Susceptibility of cats to the Hokkaido isolate of *Echinococcus multilocularis*. *Japanese Journal of Veterinary Science* 48, 763-767.
- Kapel, C.M., Torgerson, P.R., Thompson, R.C. and Deplazes, P., 2006. Reproductive potential of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes, dogs, raccoon dogs and cats. *International Journal for Parasitology* 36, 79-86.
- Karamon, J., Sroka, J., Cencek, T., Michalski, M.M., Zieba, P. and Karwacki, J., 2011. Prevalence of *Echinococcus multilocularis* in red foxes in two eastern provinces of Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute of Pulawy* 55, 429-433.
- Karamon, J., Kochanowski, M., Sroka, J., Cencek, T., Rózycki, M., Chmurzyńska, E. and Bilska-Zajac, E., 2014. The prevalence of *Echinococcus multilocularis* in red foxes in Poland-current results (2009-2013). *Parasitology Research* 113, 317-322.
- Karamon, J., Kochanowski, M., Dabrowska, J., Sroka, J., Rozycki, M., Bilska-Zajac, E. and Cencek, T., 2015. Dynamics of *Echinococcus multilocularis* infection in red fox populations with high and low prevalence of this parasite in Poland (2007–2014). *Bulletin of the Veterinary Institute of Pulawy* 59, 213-217.
- Karamon, J., Samorek-Pieróg, M., Kochanowski, M., Dąbrowska, J., Sroka, J., Gołąb, E., Umhang, G. and Cencek, T., 2016. First detection of *Echinococcus multilocularis* in dogs in a highly endemic area of Poland. *Folia Parasitologica (Praha)* 63, 1-5.
- Karamon, J., Stojęcki, K., Samorek-Pieróg, M., Bilska-Zajac, E., Rózycki, M., Chmurzyńska, E., Sroka, J., Zdybel, J. and Cencek, T., 2017. Genetic diversity of *Echinococcus multilocularis* in red foxes in Poland: the first report of a haplotype of probable Asian origin. *Folia Parasitologica (Praha)* 64, 1-6.
- Kędra, A.H., Swiderski, Z., Tkach, V.V., Dubinský, P., Pawłowski, Z., Stefaniak, J. and Pawlowski, J., 1999. Genetic analysis of *Echinococcus granulosus* from humans and pigs in Poland, Slovakia and Ukraine. A multicenter study. *Acta Parasitologica* 44, 248-254.
- Kern, P., Ammon, A., Kron, M., Sinn, G., Sander, S., Petersen, L.R. and Gaus, W., 2004. Risk factors for alveolar echinococcosis in humans. *Emerging Infectious Diseases* 10, 2088-2093.
- Kittelberger, R., Reichel, M.P., Jenner, J., Heath, D.D., Lightowlers, M.W., Moro, P., Ibrahim, M.M., Craig, P.S. and O'Keefe, J.S., 2002. Evaluation of three enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for the detection of serum antibodies in sheep infected with *Echinococcus granulosus*. *Veterinary Parasitology* 110, 57-76.
- Knapp, J., Bart, J.M., Glowatzki, M.L., Ito, A., Gerard, S., Maillard, S., Piarroux, R. and Gottstein, B., 2007. Assessment of use of microsatellite polymorphism analysis for improving spatial distribution tracking of *Echinococcus multilocularis*. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 2943-2950.
- Knapp, J., Guislain, M.H., Bart, J.M., Raoul, F., Gottstein, B., Giraudoux, P. and Piarroux, R., 2008. Genetic diversity of *Echinococcus multilocularis* on a local scale. *Infection, Genetics and Evolution* 8, 367-373.
- Knapp, J., Bart, J.M., Giraudoux, P., Glowatzki, M.L., Breyer, I., Raoul, F., Deplazes, P., Duscher, G., Martinek, K., Dubinsky, P., Guislain, M.H., Cliquet, F., Romig, T., Malczewski, A., Gottstein, B. and Piarroux, R., 2009a. Genetic diversity of the cestode *Echinococcus multilocularis* in red foxes at a continental scale in Europe. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3, e452.
- Knapp, J., Bart, J.M., Maillard, S., Gottstein, B. and Piarroux, R., 2009b. The genomic *Echinococcus microsatellite* EmsB sequences: from a molecular marker to the epidemiological tool. *Parasitology* 137, 439-449.
- Knapp, J., Nakao, M., Yanagida, T., Okamoto, M., Saarma, U., Lavikainen, A. and Ito, A., 2011. Phylogenetic relationships within *Echinococcus* and *Taenia* tapeworms (*Cestoda: Taeniidae*): An inference from nuclear protein-coding genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61, 628-638.
- Knapp, J., Staebler, S., Bart, J.M., Stien, A., Yoccoz, N.G., Drogemuller, C., Gottstein, B. and Deplazes, P., 2012. *Echinococcus multilocularis* in Svalbard, Norway: Microsatellite genotyping to investigate the origin of a highly focal contamination. *Infection, Genetics and Evolution* 12, 1270-1274.
- Knapp, J., Millon, L., Mouzon, L., Umhang, G., Raoul, F., Said Ali, Z., Combes, B., Comte, S., Gbaguidi-Haore, H., Grenouillet, F. and Giraudoux, P., 2014. Real time PCR to detect the environmental faecal contamination by *Echinococcus multilocularis* from red fox stools. *Veterinary Parasitology* 201, 40-47.

- Knapp, J., Umhang, G., Poulle, M.L. and Millon, L., 2016. Development of a real-time PCR for a sensitive one-step copro-diagnosis allowing both the identification of carnivore feces and the detection of *Toxocara spp.* and *Echinococcus multilocularis*. *Applied Environmental Microbiology* 82, 2950-2958.
- Kondo, H., Wada, Y., Bando, G., Kosuge, M., Yagi, K. and Oku, Y., 1996. Alveolar hydatidosis in a gorilla and a ring-tailed lemur in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 58, 447-449.
- König, A., Romig, T., Thoma, D. and Kellermann, K., 2005. Drastic increase in the prevalence of *Echinococcus multilocularis* in foxes (*Vulpes vulpes*) in southern Bavaria, Germany. *European Journal of Wildlife Research* 51, 277-282.
- Konyaev, S.V., Yanagida, T., Nakao, M., Ingovatova, G.M., Shoykhet, Y.N., Bondarev, A.Y., Odnokurtsev, V.A., Loskutova, K.S., Lukmanova, G.I., Dokuchaev, N.E., Spiridonov, S., Alshinecky, M.V., Sivkova, T.N., Andreyanov, O.N., Abramov, S.A., Krivopalov, A.V., Karpenko, S.V., Lopatina, N.V., Dupal, T.A., Sako, Y. and Ito, A., 2013. Genetic diversity of *Echinococcus spp.* in Russia. *Parasitology* 140, 1637-1647.
- Kouidri, M., Benchaib Khoudja, F., Boukabout, A. and Selles, M., 2012. Prevalence, fertility and viability of cystic echinococcosis in sheep and cattle of Algeria. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 15, 191-197.
- Kouidri, M., Benchaib Khoudja, F., Boukabout, A. and Selles, S.M.A., 2013. Cystic echinococcosis in small ruminants in Tialet (Algeria). *Global Veterinaria* 11, 753-758.
- Kreidl, P., Allerberger, F., Judmaier, G., Auer, H., Aspöck, H. and Hall, A.J., 1998. Domestic pets as risk factors for alveolar hydatid disease in Austria. *American Journal of Epidemiology* 147, 978-981.
- Lahmar, S., Lahmar, S., Boufana, B., Bradshaw, H. and Craig, P.S., 2007. Screening for *Echinococcus granulosus* in dogs: Comparison between arecoline purgation, coproELISA and coproPCR with necropsy in pre-patent infections. *Veterinary Parasitology* 144, 287-292.
- Laurimaa, L., Suld, K., Moks, E., Valdmann, H., Umhang, G., Knapp, J. and Saarma, U., 2015. First report of the zoonotic tapeworm *Echinococcus multilocularis* in raccoon dogs in Estonia, and comparisons with other countries in Europe. *Veterinary Parasitology* 212, 200-205.
- Lavikainen, A., Lehtinen, M.J., Meri, T., Hirvela-Koski, V. and Meri, S., 2003. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 127, 207-15.
- Lavikainen, A., Lehtinen, M.J., Laaksonen, S., Agren, E., Oksanen, A. and Meri, S., 2006. Molecular characterization of *Echinococcus* isolates of cervid origin from Finland and Sweden. *Parasitology* 133, 565-570.
- Lawson, J.R. and Gemmell, M.A., 1983. Hydatidosis and cysticercosis: the dynamics of transmission. *Advances in Parasitology* 22, 261-308.
- Le, T.H., Pearson, M.S., Blair, D., Dai, N., Zhang, L.H. and McManus, D.P., 2002. Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse-dog and sheep-dog strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 124, 97-112.
- Legendre, P. and Legendre, L., 1998. *Numerical ecology*, 2nd ed. Elsevier, Amsterdam.
- Léger, F. and Ruelle, S., 2014. Raton laveur et chien viverrin : le point sur leur répartition en France. *Faune Sauvage*, (302), 9-16.
- Leiby, P.D. and Kritsky, D.C., 1972. The occurrence of *Echinococcus multilocularis* (Leuckart, 1863) in cats near Saskatoon, Saskatchewan. *Journal of Parasitology* 58, 1213-1215.
- Lightowers, M.W., 1990. Immunology and molecular biology of *Echinococcus* infections. *International Journal for Parasitology* 20, 471-478.
- Logvinsky, G.B. 1952. To the question of the distribution and prevention of *echinococcus* in Moldavia. IXth Scientific Session of Institute of Medicine, Chisinau, Moldova, pp. 32-33.
- Lungu, V., 2012. Epidemiology of human echinococcosis in the Republic of Moldova. *Scientia Parasitologica* 13, 87-91.
- Luzon, M., de la Fuente-Lopez, C., Martinez-Navado, E., Fernandez-Moran, J. and Ponce-Gordo, F., 2010. *Taenia crassiceps* cysticercosis in a ring-tailed lemur (*Lemur catta*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 41, 327-330.
- Lymbery, A.J., Jenkins, E.J., Schurer, J.M. and Thompson, R.C.A., 2015. *Echinococcus canadensis*, *E. borealis*, and *E. intermedius*. What's in a name? *Trends in Parasitology* 31, 23-29.
- Machnicka-Rowinska, B., Rocki, B., Dziemian, E. and Kolodziej-Sobocinska, M., 2002. Raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) – the new host of *Echinococcus multilocularis* in Poland. *Wiadomosci Parazytologiczne* 48, 65-68.
- Magurran, A.E., 2003. *Measuring biological diversity*. Blackwell Science Ltd., Oxford, 264 p.
- Malczewski, A., Rocki, B., Ramisz, A. and Eckert, J., 1995. *Echinococcus multilocularis* (Cestoda), the causative agent of alveolar echinococcosis in humans: first record in Poland. *Journal of Parasitology* 81, 318-321.

- Malczewski, A., Gawor, J. and Malczewska, M., 2008. Infection of red foxes (*Vulpes vulpes*) with *Echinococcus multilocularis* during the years 2001-2004 in Poland. *Parasitology Research* 103, 501-505.
- Martínek, K., Kolářová, L., Hapl, E., Literák, I. and Uhrin, M., 2001. *Echinococcus multilocularis* in European wolves (*Canis lupus*). *Parasitology Research* 87, 838-839.
- Mathis, A., Deplazes, P. and Eckert, J., 1996. An improved test system for PCR-based specific detection of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Journal of Helminthology* 70, 219-222.
- Mathis, A. and Deplazes, P., 2006. Copro-DNA tests for diagnosis of animal taeniid cestodes. *Parasitology International* 55, S87-S90.
- McManus, D.P., 2006. Molecular discrimination of taeniid cestodes. *Parasitology International* 55 (Suppl), S31-S37.
- McManus, D.P., 2013. Current status of the genetics and molecular taxonomy of *Echinococcus* species. *Parasitology* 140, 1617-1623.
- Miller, A.L., Olsson, G.E., Walburg, M.R., Sollenberg, S., Skarin, M., Ley, C., Wahlström, H. and Höglund, J., 2016. First identification of *Echinococcus multilocularis* in rodent intermediate hosts in Sweden. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 5, 56-63.
- Moks, E., Jogisalu, I., Valdmann, H. and Saarma, U., 2008. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of 'genotypes' G5-G10. *Parasitology* 135, 647-654.
- Monnier, P., Cliquet, F., Aubert, M. and Bretagne, S., 1996. Improvement of a polymerase chain reaction assay for the detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in faecal samples of foxes. *Veterinary Parasitology* 67, 185-95.
- Morariu, S., Bart, J.M., Cosoroaba, I., Morariu, F., Ilie, M. and Darabus, G., 2011. Prevalence of cystic echinococcosis in sheep, cattle and swine from the western Romania. *Scientia Parasitologica* 12, 47-51.
- Mwambete, K., Ponce-Gordo, F. and Cuesta-Bandera, C., 2004. Genetic identification and host range of the Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Acta Tropica* 91, 87-93.
- Nakao, M., McManus, D.P., Schantz, P.M., Craig, P.S. and Ito, A., 2007. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* 134, 713-722.
- Nakao, M., Xiao, N., Okamoto, M., Yanagida, T., Sako, Y. and Ito, A., 2009. Geographic pattern of genetic variation in the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology International* 58, 384-389.
- Nakao, M., Li, T., Han, X., Ma, X., Xiao, N., Qiu, J., Wang, H., Yanagida, T., Mamuti, W., Wen, H., Moro, P.L., Giraudoux, P., Craig, P.S. and Ito, A., 2010a. Genetic polymorphisms of *Echinococcus* tapeworms in China as determined by mitochondrial and nuclear DNA sequences. *International Journal for Parasitology* 40, 379-385.
- Nakao, M., Yanagida, T., Okamoto, M., Knapp, J., Nkouawa, A., Sako, Y. and Ito, A., 2010b. State-of-the-art *Echinococcus* and *Taenia*: phylogenetic taxonomy of human-pathogenic tapeworms and its application to molecular diagnosis. *Infection, Genetics and Evolution* 10, 444-452.
- Nakao, M., Lavikainen, A., Yanagida, T. and Ito, A., 2013. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *International Journal for Parasitology* 43, 1017-1029.
- Neghina, R., Neghina, A.M., Marincu, I. and Iacobiciu, I., 2010. Epidemiology and epizootology of cystic echinococcosis in Romania 1862-2007. *Foodborne Pathogens and Disease* 7, 613-618.
- Nonaka, N., Hirokawa, H., Inoue, T., Nakao, R., Ganzorig, S., Kobayashi, F., Inagaki, M., Egoshi, K., Kamiya, M. and Oku, Y., 2008. The first instance of a cat excreting *Echinococcus multilocularis* eggs in Japan. *Parasitology International* 57, 519-520.
- Oksanen, A. and Lavikainen, A., 2015. *Echinococcus canadensis* transmission in the North. *Veterinary Parasitology* 213, 182-186.
- Oksanen, A., Siles-Lucas, M., Karamon, J., Possenti, A., Conraths, F.J., Romig, T., Wysocki, P., Mannocci, A., Mipatrini, D., La Torre, G., Boufana, B. and Casulli, A., 2016. The geographical distribution and prevalence of *Echinococcus multilocularis* in animals in the European Union and adjacent countries: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors* 9, 1-23.
- Osterman-Lind, E., Juremalm, M., Christensson, D., Widgren, S., Hallgren, G., Agren, E.O., Uhlhorn, H., Lindberg, A., Cedersmyg, M. and Wahlstrom, H., 2011. First detection of *Echinococcus multilocularis* in Sweden, February to March 2011. *Eurosurveillance* 16, 1-3.
- Ouchene, N., Bitam, I., Zeroual, F. and Ouchene-Khelifi, N.A., 2014. Cystic echinococcosis in wild boars (*Sus scrofa*) and slaughtered domestic ruminants in Algeria. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 9, 767-774.
- Pacoń, J., Sołtysiak, Z., Nicpoń, J. and Janczak, M., 2006. Prevalence of internal helminths in red foxes (*Vulpes vulpes*) in selected regions of Lower Silesia. *Medycyna Weterynaryjna* 62, 67-69.

- Palotay, J.L. and Uno, H., 1975. Hydatid disease in four nonhuman primates. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 167, 615-618.
- Pandey, V.S., Ouhelli, H. and Ouchtou, M., 1986. Hydatidosis in sheep, goats and dromedaries in Morocco. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 80, 525-529.
- Petavy, A.F. and Deblock, S., 1983. Connaissance du foyer auvergnat d'échinococcose alvéolaire. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 58, 439-453.
- Petavy, A.F., Tenora, F., Deblock, S. and Sergent, V., 2000. *Echinococcus multilocularis* in domestic cats in France. A potential risk factor for alveolar hydatid disease contamination in humans. *Veterinary Parasitology* 87, 151-156.
- Pétavy, A.F., Tenora, F. and Deblock, S., 2003. Co-occurrence of metacestodes of *Echinococcus multilocularis* and *Taenia taeniaeformis* (Cestoda) in *Arvicola terrestris* (Rodentia) in France. *Folia Parasitologica* 50, 157-158.
- Piarroux, M., Piarroux, R., Knapp, J., Dumortier, J., Watelet, J., Gerard, A., Beytout, J., Abergel, A., Bresson Hadni, S. and Gaudart, J., 2013. Populations at risk for alveolar echinococcosis, France. *Emerging Infectious Diseases* 19, 721-728.
- Pleydell, D.R., Raoul, F., Tourneux, F., Danson, F.M., Graham, A.J., Craig, P.S. and Giraudoux, P., 2004. Modelling the spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* infection in foxes. *Acta Tropica* 91, 253-265.
- Prisacari, V. and Lungu, V., 2014. Human cystic echinococcosis in the republic of Moldova - an epidemiological study. *Curierul Medical* 57, 59-65.
- Quere, J.P. and Le Louarn, H., 2011. Les rongeurs de France. Faunistique et biologie, 3è ed. Editions Quae, Versailles, 311 p.
- Ramisz, A., Eckert, J., Balicka-Ramisz, A., Grupinski, T., Pilarczyk, B., Krol-Pospieszny and Slowikowski, P., 1997. [Prevalence of *Echinococcus multilocularis* in foxes in western Poland.]. *Medycyna Weterynaryjna* 53, 340-342.
- Raoul, F., Deplazes, P., Nonaka, N., Piarroux, R., Vuitton, D.A. and Giraudoux, P., 2001. Assessment of the epidemiological status of *Echinococcus multilocularis* in foxes in France using ELISA coprotests on fox faeces collected in the field. *International Journal for Parasitology* 31, 1579-1588.
- Raoul, F., Michelat, D., Ordinaire, M., Decote, Y., Aubert, M., Delattre, P., Deplazes, P. and Giraudoux, P., 2003. *Echinococcus multilocularis*: secondary poisoning of fox population during a vole outbreak reduces environmental contamination in a high endemicity area. *International Journal for Parasitology* 33, 945-954.
- Raoul, F., Deplazes, P., Rieffel, D., Lambert, J.C. and Giraudoux, P., 2010. Predator dietary response to prey density variation and consequences for cestode transmission. *Oecologia* 164, 129-139.
- Rausch, R.L. and Richards, S.H., 1971. Observations on parasite-host relationships of *Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863, in North Dakota. *Canadian Journal of Zoology* 49, 1317-1330.
- Rehmann, P., Gröne, A., Gottstein, B., Sager, H., Müller, N., Völlm, J. and Bacciarini, L.N., 2005. Alveolar echinococcosis in the Zoological Garden Basle. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 147, 498-502.
- Reperant, L.A., Hegglin, D., Fischer, C., Kohler, L., Weber, J.M. and Deplazes, P., 2007. Influence of urbanization on the epidemiology of intestinal helminths of the red fox (*Vulpes vulpes*) in Geneva, Switzerland. *Parasitology Research* 101, 605-611.
- Rey, M., Morin, B., Petavy, A.F., Cambon, M. and Baril, A., 1977. Premières observations auvergnates d'échinococcose alvéolaire. *Nouvelle Presse Médicale* 43, 4070-7071.
- Richomme, C., Lacour, S.A., Ducrot, C., Gilot-Fromont, E., Casabianca, F., Maestrini, O., Vallée, I., Grasset, A., van der Giessen, J. and Boireau, P., 2010. Epidemiological survey of trichinellosis in wild boar (*Sus scrofa*) and fox (*Vulpes vulpes*) in a French insular region, Corsica. *Veterinary Parasitology* 172, 150-154.
- Rinder, H., Rausch, R.L., Takahashi, K., Kopp, H., Thomschke, A. and Loscher, T., 1997. Limited range of genetic variation in *Echinococcus multilocularis*. *Journal of Parasitology* 83, 1045-1050.
- Robardet, E., Giraudoux, P., Caillot, C., Boue, F., Cliquet, F., Augot, D. and Barrat, J., 2008. Infection of foxes by *Echinococcus multilocularis* in urban and suburban areas of Nancy, France: Influence of feeding habits and environment. *Parasite* 15, 77-85.
- Rocki, B., Malczewski, A. and Eckert, J., 1999. Studies on the incidence of *Echinococcus multilocularis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in northeast, central and south of Poland. *Wiadomosci Parazytologiczne* 45, 391-393.
- Rodriguez-Morales, A.J. 2015. Echinococcosis in Colombia - A neglected zoonosis? In: Rodriguez-Morales, A.J. (Ed). *Current topics in echinococcosis*, Intech, 220 p.

- Rogan, M.T., Hai, W.Y., Richardson, R., Zeyhle, E. and Craig, P.S., 2006. Hydatid cysts: does every picture tell a story? *Trends in Parasitology* 22, 431-438.
- Romig, T., Bilger, B., Dinkel, A., Merli, M. and Mackenstedt, U., 1999. *Echinococcus multilocularis* in animal hosts: New data from western Europe. *Helminthologia* 36, 185-191.
- Romig, T., Dinkel, A. and Mackenstedt, U., 2006. The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitology International* 55 (Suppl), S187-S191.
- Romig, T., Bilger, B., Dinkel, A., Merli, M., Thoma, D., Will, R., MacKenstedt, U. and Lucius, R., 2007. Impact of praziquantel baiting on intestinal helminths of foxes in southwestern Germany. *Helminthologia* 44, 137-144.
- Romig, T., 2009. *Echinococcus multilocularis* in Europe--state of the art. *Veterinary Research Communications* 33 (Suppl 1), 31-34.
- Romig, T., Kohnke, S., Ziegler, T., Wronna, N., Elliger, A., Dinkel, A., Hüttner, M., Pegel, M. and Mackenstedt, U., 2011. Feral coypu (*Myocastor coypus*) and muskrats (*Ondatra zibethicus*) as intermediate hosts of *Echinococcus multilocularis* and other cestode larvae in southern Germany. XXIV World congress of hydatidology, Urumqi, China, p. 216.
- Romig, T., Ebi, D. and Wassermann, M., 2015. Taxonomy and molecular epidemiology of *Echinococcus granulosis sensu lato*. *Veterinary Parasitology* 213, 76-84.
- Ruette, S., Stahl, P. and Albaret, M., 2003. Applying distance-sampling methods to spotlight counts of red foxes *Journal of Applied Ecology* 40, 32-43.
- Saarma, U., Jogisalu, I., Moks, E., Varcasia, A., Lavikainen, A., Oksanen, A., Simsek, S., Andresiuk, V., Denegri, G., Gonzalez, L.M., Ferrer, E., Garate, T., Rinaldi, L. and Maravilla, P., 2009. A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence. *Parasitology* 136, 317-328.
- Saeed, I., Maddox-Hyttel, C., Monrad, J. and Kapel, C.M., 2006. Helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Denmark. *Veterinary Parasitology* 139, 168-179.
- Sager, H., Moret, C.S., Grimm, F., Deplazes, P., Doherr, M.G. and Gottstein, B., 2006. Coprological study on intestinal helminths in Swiss dogs: Temporal aspects of anthelmintic treatment. *Parasitology Research* 98, 333-338.
- Schantz, P.M. 1982. Echinococcosis. In: Steele, J., Hillyer, G.V., Hopla, C.E. (Eds), *CRC Handbook Series in Zoonoses, Section C: Parasitic Zoonoses*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 231-277.
- Schelling, U., Frank, W., Will, R., Romig, T. and Lucius, R., 1997. Chemotherapy with praziquantel has the potential to reduce the prevalence of *Echinococcus multilocularis* in wild foxes (*Vulpes vulpes*). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 91, 179-186.
- Schwarz, S., Sutor, A., Staubach, C., Mattis, R., Tackmann, K. and Conraths, F.J., 2011. Estimated prevalence of *Echinococcus multilocularis* in raccoon dogs *Nyctereutes procyonoides* in northern Brandenburg, Germany. *Current Zoology* 57, 655-661.
- Schweiger, A., Ammann, R.W., Candinas, D., Clavien, P.A., Eckert, J., Gottstein, B., Halkic, N., Muellhaupt, B., Prinz, B.M., Reichen, J., Tarr, P.E., Torgerson, P.R. and Deplazes, P., 2007. Human alveolar echinococcosis after fox population increase, Switzerland. *Emerging Infectious Diseases* 13, 878-882.
- Scott, J.C., Stefaniak, J., Pawlowski, Z.S. and McManus, D.P., 1997. Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosis*. *Parasitology* 114 (Pt 1), 37-43.
- Seimenis, A., 2003. Overview of the epidemiological situation on echinococcosis in the Mediterranean region. *Acta Tropica* 85, 191-195.
- Shock, B.C., Brooks, J.W., Pokorny, E., Mattive, T. and Yabsley, M.J., 2010. Clinical challenge. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 41, 374-376.
- Soares, M.C.P., Rodrigues, A.L.S., Moreira Silva, C.A., Brito, E.M.F., Gomes-Gouvêa, M.S., Corrêa, I.R.S., Pinho, J.R.R., Malheiros, A.P., Nunes, H.M. and Póvoa, M.M., 2013. Anatomico-clinical and molecular description of liver neotropical echinococcosis caused by *Echinococcus oligarthrus* in human host. *Acta Tropica* 125, 110-114.
- Soule, C., Fabien, J.F. and Maillot, E. 1989. Enquête échinococcose-hydatidose, Rapport DGAL - Brigade Nationale d'Enquêtes Vétérinaires - CNEVA - Unité Parasitologie, Maisons-Alfort, 173 p.
- Soule, C., 1994. L'hydatidose des ruminants : état stationnaire. *Point Vétérinaire* 26, 104-107.
- Staebler, S., Grimm, F., Glaus, T., Kapel, C.M., Haller, M., Hasler, A., Hanosset, R. and Deplazes, P., 2006. Serological diagnosis of canine alveolar echinococcosis. *Veterinary Parasitology* 141, 243-250.

- Stefanic, S., Shaikenov, B.S., Deplazes, P., Dinkel, A., Torgerson, P.R. and Mathis, A., 2004. Polymerase chain reaction for detection of patent infections of *Echinococcus granulosus* ("sheep strain") in naturally infected dogs. *Parasitol Research* 92, 347-351.
- Stieger, C., Hegglin, D., Schwarzenbach, G., Mathis, A. and Deplazes, P., 2002. Spatial and temporal aspects of urban transmission of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology* 124, 631-640.
- Tackmann, K., Loschner, U., Mix, H., Staubach, C., Thulke, H.H., Ziller, M. and Conraths, F.J., 2001. A field study to control *Echinococcus multilocularis*-infections of the red fox (*Vulpes vulpes*) in an endemic focus. *Epidemiology & Infection* 127, 577-587.
- Takumi, K., de Vries, A., Chu, M.L., Mulder, J., Teunis, P. and van der Giessen, J., 2008. Evidence for an increasing presence of *Echinococcus multilocularis* in foxes in The Netherlands. *International Journal for Parasitology* 38, 571-578.
- Tappe, D., Brehm, K., Frosch, M., Blankenburg, A., Schrod, A., Kaup, F.J. and Mätz-Rensing, K., 2007. *Echinococcus multilocularis* infection of several old world monkey species in a breeding enclosure. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77, 504-506.
- Tappe, D., Stich, A. and Frosch, M., 2008. Emergence of polycystic neotropical echinococcosis. *Emerging Infectious Diseases* 14, 292-927.
- Tappe, D., Kern, P. and Frosch, M., 2010. A hundred years of controversy about the taxonomic status of *Echinococcus* species. *Acta Tropica* 115, 167-174.
- Templeton, A.R., 2008. The reality and importance of founder speciation in evolution. *BioEssays* 30, 470-479.
- Thompson, J.P., Bentley, A.G., Crandall, R.B. and Crandall, C.A., 1984a. The histology and ultrastructure of the Meyers-Kouwenaar body in Ferrets infected with *Brugia malayi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 33, 1141-1146.
- Thompson, R.C.A. and Eckert, J., 1983. Observations on *Echinococcus multilocularis* in the definitive host. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 69, 335-345.
- Thompson, R.C.A., Kumaratilake, L.M. and Eckert, J., 1984b. Observations on *Echinococcus granulosus* of cattle origin in Switzerland. *International Journal for Parasitology* 14, 283-291.
- Thompson, R.C.A., 1986. The biology of *Echinococcus* and hydatid disease. Allen & Unwin, London, 290 p.
- Thompson, R.C.A. 1995. Biology and systematics of *Echinococcus*. In: Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J. (Eds), *Echinococcus* and hydatid disease. CAB International, Wallingford, pp. 1-50.
- Thompson, R.C.A. and McManus, D.P., 2002. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends in Parasitology* 18, 452-457.
- Thompson, R.C.A., Deplazes, P. and Eckert, J., 2003. Observations on the development of *Echinococcus multilocularis* in cats. *Journal of Parasitology* 89, 1086-1088.
- Thompson, R.C.A., Kapel, C.M., Hobbs, R.P. and Deplazes, P., 2006. Comparative development of *Echinococcus multilocularis* in its definitive hosts. *Parasitology* 132, 709-716.
- Thompson, R.C.A. 2017. Biology and systematics of *Echinococcus*. In: Thompson R.C.A., D.P., Lymbery A.J. (Eds), *Advances in parasitology. Echinococcus and echinococcosis. Part A*. Academic Press, London, pp. 65-109.
- Tolle, F., Pleydell, D., Combes, B., Cliquet, F., Piarroux, M., Giraudoux, P. and Tourneux, F.P. 2005. Identification of environmental risk factors for the presence of *Echinococcus multilocularis*. 7èmes rencontres de Théo Quant, Besançon, pp. 1-11.
- Torgerson, P.R., 2003. Economic effects of echinococcosis. *Acta Tropica* 85, 113-118.
- Torgerson, P.R., Keller, K., Magnotta, M. and Ragland, N., 2010. The global burden of alveolar echinococcosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4, e722.
- Trachsel, D., Deplazes, P. and Mathis, A., 2007. Identification of taeniid eggs in the faeces from carnivores based on multiplex PCR using targets in mitochondrial DNA. *Parasitology* 134, 911-920.
- Tsai, I.J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garciarrubio, A., Sanchez-Flores, A., Brooks, K.L., Tracey, A., Bobes, R.J., Fragoso, G., Sciutto, E., Aslett, M., Beasley, H., Bennett, H.M., Cai, J., Camicia, F., Clark, R., Cucher, M., De Silva, N., Day, T.A., Deplazes, P., Estrada, K., Fernández, C., Holland, P.W.H., Hou, J., Hu, S., Huckvale, T., Hung, S.S., Kamenetzky, L., Keane, J.A., Kiss, F., Koziol, U., Lambert, O., Liu, K., Luo, X., Luo, Y., MacChiaroli, N., Nichol, S., Paps, J., Parkinson, J., Pouchkina-Stantcheva, N., Riddiford, N., Rosenzvit, M., Salinas, G., Wasmuth, J.D., Zamanian, M., Zheng, Y., Cai, X., Soberón, X., Olson, P.D., Lacleste, J.P., Brehm, K. and Berriman, M., 2013. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 496, 57-63.
- Umhang, G., Woronoff-Rhen, N., Combes, B. and Boue, F., 2011. Segmental sedimentation and counting technique (SSCT): an adaptable method for qualitative diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in fox intestines. *Experimental Parasitology* 128, 57-60.

- Umhang, G., Raton, V., Comte, S., Hormaz, V., Boucher, J.-M., Combes, B. and Boué, F., 2012. *Echinococcus multilocularis* in dogs from two French endemic areas: No evidence of infection but hazardous deworming practices. *Veterinary Parasitology* 188, 301-305.
- Umhang, G., Lahoreau, J., Nicolier, A. and Boue, F., 2013a. *Echinococcus multilocularis* infection of a ring-tailed lemur (*Lemur catta*) and a nutria (*Myocastor coypus*) in a French zoo. *Parasitology International* 62, 561-563.
- Umhang, G., Richomme, C., Boucher, J.M., Guedon, G. and Boue, F., 2013b. Nutrias and muskrats as bioindicators for the presence of *Echinococcus multilocularis* in new endemic areas. *Veterinary Parasitology* 197, 283-287.
- Umhang, G., Richomme, C., Boucher, J.M., Hormaz, V. and Boué, F., 2013c. Prevalence survey and first molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in France. *Parasitology Research* 112, 1809-1812.
- Umhang, G., Chihai, O. and Boue, F., 2014a. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in a hyperendemic European focus, the Republic of Moldova. *Parasitology Research* 113, 4371-4376.
- Umhang, G., Comte, S., Raton, V., Hormaz, V., Boucher, J.M., Favier, S., Combes, B. and Boue, F., 2014b. *Echinococcus multilocularis* infections in dogs from urban and peri-urban areas in France. *Parasitology Research* 113, 2219-2222.
- Umhang, G., Hormaz, V., Peytavin, C., Boucher, J.M., Itié-Hafez, S., Danan, C. and Boue, F., 2014c. Epidémiologie de *Echinococcus granulosus* à l'abattoir : résultats du plan de surveillance 2012. *Bull. Epidémiologique, Santé Animale et Alimentation*, (62), 8-12.
- Umhang, G., Knapp, J., Hormaz, V., Raoul, F. and Boue, F., 2014d. Using the genetics of *Echinococcus multilocularis* to trace the history of expansion from an endemic area. *Infection, Genetics and Evolution* 22, 142-149.
- Umhang, G., Richomme, C. and Boue, F., 2014e. Surveillance de *Echinococcus* spp. en France : la faune sauvage sentinelle. *Bulletin Epidémiologique, Santé Animale et Alimentation*, (61), 2-4.
- Umhang, G., Richomme, C., Hormaz, V. and Boucher, J.M., 2014f. Pigs and wild boar in Corsica harbor *Echinococcus canadensis* G6/7 at levels of concern for public health and local economy. *Acta Tropica* 133, 64-68.
- Umhang, G., Forin Wiart, M.-A., Hormaz, V., Caillot, C., Boucher, J.-M., Poulle, M.-L. and Boue, F., 2015. *Echinococcus multilocularis* detection in the intestines and feces of free-ranging domestic cats (*Felis s. catus*) and European wildcats (*Felis s. silvestris*) from northeastern France. *Veterinary Parasitology* 214, 75-79.
- Umhang, G., Comte, S., Hormaz, V., Boucher, J.M., Raton, V., Favier, S., Raoul, F., Giraudoux, P., Combes, B. and Boue, F., 2016a. Retrospective analyses of fox feces by real-time PCR to identify new endemic areas of *Echinococcus multilocularis* in France. *Parasitology Research* 115, 4437-4441.
- Umhang, G., Knapp, J., Hormaz, V., Raoul, F. and Boue, F., 2016b. Proposition d'un scénario spatio-temporel de l'expansion d'*E. multilocularis* en France grâce à la génétique. *Bulletin Epidémiologique Santé Animale et Alimentation*, (76), 14-18.
- Umhang, G., Lahoreau, J., Hormaz, V., Boucher, J.-M., Guenon, A., Montange, D., Grenouillet, F. and Boue, F., 2016c. Surveillance and management of *Echinococcus multilocularis* in a wildlife park. *Parasitology International* 65, 245-250.
- Umhang, G., Karamon, J., Hormaz, V., Knapp, J., Cencek, T. & Boué F. Investigation of genetic diversity of *Echinococcus multilocularis* by EmsB microsatellite through low to high endemic provinces of Poland. *Infection, Genetics and Evolution*, In press.
- Valot, B., Knapp, J., Umhang, G., Grenouillet, F. and Millon, L., 2015. Genomic characterization of EmsB microsatellite loci in *Echinococcus multilocularis*. *Infection, Genetics and Evolution* 32, 338-341.
- van Cauteren, D., Millon, L., de Valk, H. and Grenouillet, F., 2016. Retrospective study of human cystic echinococcosis over the past decade in France, using a nationwide hospital medical information database. *Parasitology Research* 115, 4261-4265.
- Varcasia, A., Canu, S., Lightowers, M.W., Scala, A. and Garippa, G., 2006. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* strains in Sardinia. *Parasitology Research* 98, 273-277.
- Varcasia, A., Garippa, G., Pipia, A.P., Scala, A., Brianti, E., Giannetto, S., Battelli, G., Poglayen, G. and Micagni, G., 2008. Cystic echinococcosis in equids in Italy. *Parasitology Research* 102, 815-818.
- Veit, P., Bilger, B., Schad, V., Schafer, J., Frank, W. and Lucius, R., 1995. Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasitology* 110 (Pt 1), 79-86.

- Viel, J.F., Giraudoux, P., Abrial, V. and Bresson-Hadnl, S., 1999. Water vole (*Arvicola terrestris scherman*) density as risk factor for human alveolar echinococcosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61, 559-565.
- Vogel, H., 1957. *Echinococcus multilocularis* in South Germany. I. The tapeworm stage of strains from humans and animals. *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie* 8, 404-454.
- Vuitton, D.A., Demonmerot, F., Knapp, J., Richou, C., Grenouillet, F., Chauchet, A., Vuitton, L., Bresson-Hadni, S. and Millon, L., 2015. Clinical epidemiology of human AE in Europe. *Veterinary Parasitology* 213, 110-120.
- Wahlstrom, H., Isomursu, M., Hallgren, G., Christensson, D., Cedersmyg, M., Wallensten, A., Hjertqvist, M., Davidson, R.K., Uhlhorn, H. and Hopp, P., 2011. Combining information from surveys of several species to estimate the probability of freedom from *Echinococcus multilocularis* in Sweden, Finland and mainland Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica* 53, 1-13.
- Wahlstrom, H., Lindberg, A., Lindh, J., Wallensten, A., Lindqvist, R., Plym-Forshell, L., Osterman-Lind, E., Agren, E.O., Widgren, S., Carlsson, U., Christensson, D., Cedersmyg, M., Lindstrom, E., Olsson, G.E., Hornfeldt, B., Barragan, A., Davelid, C., Hjertqvist, M. and Elvander, M., 2012. Investigations and actions taken during 2011 due to the first finding of *Echinococcus multilocularis* in Sweden. *Eurosurveillance* 17, 1-8.
- Wahlström, H., Enemark, H.L., Davidson, R.K. and Oksanen, A., 2015. Present status, actions taken and future considerations due to the findings of *E. multilocularis* in two Scandinavian countries. *Veterinary Parasitology* 213, 172-181.
- Wassermann, M., Aschenborn, O., Aschenborn, J., Mackenstedt, U. and Romig, T., 2015. A sylvatic lifecycle of *Echinococcus equinus* in the Etosha National Park, Namibia. *International journal for parasitology: Parasites and wildlife* 4, 97-103.
- Wobeser, G., 1971. The occurrence of *Echinococcus multilocularis* (Leukart, 1863) in cats near Saskatoon, Saskatchewan. *Canadian Veterinary Journal* 12, 65-68.
- Woolsey, I.D., Bune, N.E., Jensen, P.M., Deplazes, P. and Kapel, C.M., 2015. *Echinococcus multilocularis* infection in the field vole (*Microtus agrestis*): an ecological model for studies on transmission dynamics. *Parasitology Research* 114, 1703-1709.
- Woolsey, I.D., Jensen, P.M., Deplazes, P. and Kapel, C.M.O., 2016. Peroral *Echinococcus multilocularis* egg inoculation in *Myodes glareolus*, *Mesocricetus auratus* and *Mus musculus* (CD-1 IGS and C57BL/6j). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 5, 158-163.
- Xiao, N., Qiu, J., Nakao, M., Li, T., Yang, W., Chen, X., Schantz, P.M., Craig, P.S. and Ito, A., 2005. *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *International Journal for Parasitology* 35, 693-701.
- Yamano, K., Kouguchi, H., Uraguchi, K., Mukai, T., Shibata, C., Yamamoto, H., Takaesu, N., Ito, M., Makino, Y., Takiguchi, M. and Yagi, K., 2014. First detection of *Echinococcus multilocularis* infection in two species of nonhuman primates raised in a zoo: A fatal case in *Cercopithecus diana* and a strongly suspected case of spontaneous recovery in *Macaca nigra*. *Parasitology International* 63, 621-626.
- Yanagida, T., Mohammadzadeh, T., Kamhawi, S., Nakao, M., Sadjjadi, S.M., Hijjawi, N., Abdel-Hafez, S.K., Sako, Y., Okamoto, M. and Ito, A., 2012. Genetic polymorphisms of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in the Middle East. *Parasitology International* 61, 599-603.
- Zait H., Kouidri M., Grenouillet FE., Umhang G., Millon L., Hamrioui B., Grenouillet F. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus sensu stricto* and *Echinococcus canadensis* in humans and livestock from Algeria. *Parasitological Research*, 2016, 115(6):2423-2431.
- Zeyhle, E. 1982. Die Verbreitung von *Echinococcus multilocularis* in Sudwestdeutschland. In: Bähr, R. (Ed), Probleme der Echinokokkose unter Berücksichtigung parasitologischer und klinischer Aspekte. Huber Verlag, Stuttgart, pp. 26-33.
- Zheng, H., Zhang, W., Zhang, L., Zhang, Z., Li, J., Lu, G., Zhu, Y., Wang, Y., Huang, Y., Liu, J., Kang, H., Chen, J., Wang, L., Chen, A., Yu, S., Gao, Z., Jin, L., Gu, W., Wang, Z., Zhao, L., Shi, B., Wen, H., Lin, R., Jones, M.K., Brejova, B., Vinar, T., Zhao, G., McManus, D.P., Chen, Z., Zhou, Y. and Wang, S., 2013. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Nature Genetics* 45, 1168-1175.
- Ziadinov, I., Mathis, A., Trachsel, D., Rysmukhambetova, A., Abdyjaparov, T.A., Kuttubaev, O.T., Deplazes, P. and Torgerson, P.R., 2008. Canine echinococcosis in Kyrgyzstan: using prevalence data adjusted for measurement error to develop transmission dynamics models. *International Journal for Parasitology* 38, 1179-1190.

Title: Surveillance and molecular epidemiology of *Echinococcus multilocularis* and *Echinococcus granulosus sensu lato*

Keywords: *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus granulosus sensu lato*, zoonoses, surveillance, molecular epidemiology.

Abstract:

Among parasites, *Echinococcus* species are of major public health importance due to their worldwide distribution and the potential severity of the diseases they cause. In Europe, the endemic species are *E. multilocularis*, which has a sylvatic lifestyle, and *E. granulosus spp.*, which the hosts are mainly domestic species. When the *Echinococcus spp.* NRL was created in France in 2006, few data were available on the distribution of these parasitic species. The implementation of health measures made it possible to consider a marked reduction of the endemic level and geographical distribution of *E. granulosus* and consequently a reduced or inexistent zoonotic risk. With regard to *E. multilocularis*, the parasite spread already observed in Europe was also suspected in France. The development of classical parasitology and molecular techniques for diagnosis and epidemiology has helped improve understanding of the distribution of these parasitic species in France.

A large-scale surveillance study in foxes, using the SSCT method validated by the NRL, led to the description of significant westward and northward expansion from *E. multilocularis*'s historical endemic focus, which was estimated, using a spatio-temporal scenario deduced by EmsB microsatellite analysis, to have begun several decades ago. Molecular analyses of various types of animal samples confirmed its westward expansion in aquatic rodents. Its extension southward was confirmed thanks to fecal samples of foxes.

Surveillance studies of *E. granulosus* at the slaughterhouse confirmed its presence in southern France and in Corsica. The first molecular characterization of this parasite in France resulted in the identification of *E. granulosus sensu stricto* in southern France and *E. canadensis* G6-7 in Corsica. The presence of *E. granulosus s.s.* throughout continental France was then observed on the basis of a national surveillance study at the slaughterhouse. The prevalence level of infection by *E. granulosus s.s.* estimated per million was 15.3 cases in sheep and 8.3 cases in cattle which was much lower than that described 20 years ago. The two main endemic foci – the Alps for *E. granulosus s.s.* and Corsica for *E. canadensis* G6-7 – still exist, while the identification of *E. ortleppi* confirmed maintenance of this species despite its current rarity in Europe.

In France, the low prevalence of *E. multilocularis* infection in dogs and cats was ascertained, confirming the minor contribution of these hosts to the lifecycle. The zoonotic role of the cat appears to be negligible based on observations of natural infection cases and on data obtained from experimental infection. The regular and adapted deworming of dogs, especially hunting dogs, appears to be necessary. This deworming recommendation is also relevant against *E. canadensis* G6-7 in Corsica where access to viscera of pigs and wild boar adds a sylvatic component at this lifecycle.

An acknowledgment of the NRL's expertise led to several international collaborations which in turn contributed to the diversity of the epidemiological situations studied. Thus, the study of the genetic diversity of *E. multilocularis* by EmsB microsatellite led to a better understanding of the parasite's expansion dynamics throughout Europe. The study of foreign foci of *E. granulosus* led to characterization of the endemic parasitic species and of their prevalence levels in intermediate hosts, which made it possible to plan appropriate control measures. The NRL participated in the testing of control methods against *E. multilocularis*, including deworming of foxes and population regulation, which demonstrated the complexity of the conditions required for these methods to be effective.

The epidemiological data obtained over ten years of studies has led to a better understanding of the current zoonotic risk associated with the *Echinococcus* species in France.

Titre : Surveillance et épidémiologie moléculaire d'*Echinococcus multilocularis* et d'*Echinococcus granulosus sensu lato*

Mots-clés : *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus granulosus sensu lato*, zoonoses, surveillance, épidémiologie moléculaire.

Résumé :

Parmi les parasites, les échinocoques revêtent une importance majeure en santé publique de par leur distribution mondiale et les maladies potentiellement très graves qu'ils occasionnent. En Europe, les espèces présentes sont *E. multilocularis*, qui a un cycle sylvatique et *E. granulosus spp.*, dont les hôtes sont essentiellement domestiques.

En France, peu de données étaient disponibles quant à la distribution de ces espèces parasitaires lors de la création du LNR *Echinococcus spp.* en 2006. Une forte réduction supposée des zones et du niveau d'enzootie pour *E. granulosus* laissait envisager un risque zoonotique moindre voire désormais absent. S'agissant d'*E. multilocularis*, l'expansion constatée en Europe était également suspectée en France. La modification des techniques de parasitologie classique ainsi que le développement d'outils moléculaires par le LNR ont contribué à l'actualisation et à une meilleure connaissance de la distribution des espèces parasitaires en France.

Une large étude de surveillance menée chez le renard avec la méthode SSCT validée par le LNR a révélé une expansion de la zone d'enzootie d'*E. multilocularis* jusqu'en Ille-et-Vilaine. L'analyse par microsatellite EmsB a permis d'estimer à plusieurs décennies la dispersion du parasite vers l'ouest et le nord à partir du foyer historique de l'est. Cette expansion a été confirmée à l'ouest chez des rongeurs aquatiques et rétrospectivement au sud chez le renard.

Des études de surveillance d'*E. granulosus* en abattoir ont confirmé sa présence dans le sud de la France et en Corse. Les caractérisations moléculaires ont permis d'identifier *E. granulosus sensu stricto* dans le sud et *E. canadensis* G6-7 en Corse. Un plan de surveillance national en abattoir a ensuite montré la présence d'*E. granulosus s.s.* à travers l'ensemble du territoire continental. Les niveaux de prévalence d'infestation par *E. granulosus s.s.* estimés chez les ovins à 15,3 et chez les bovins à 8,3 cas pour 1 million de têtes abattues sont très inférieurs à ceux décrits il y a vingt ans. Deux foyers majeurs constitués par les Alpes pour *E. granulosus s.s.* et la Corse pour *E. canadensis* G6-7 demeurent, alors que l'identification d'*E. ortleppi* confirme le maintien de cette espèce zoonotique pourtant désormais rare en Europe.

Les niveaux de prévalence d'infestation par *E. multilocularis* chez le chien et le chat en France confirment leurs importances mineures dans le maintien du cycle parasitaire. Le rôle zoonotique du chat semble négligeable d'après les observations d'infestations naturelles, corroborées par les données obtenues lors d'infestations expérimentales. La vermifugation régulière et adaptée des chiens, en particulier des chiens de chasse, apparaît nécessaire. Cette recommandation de vermifugation canine s'applique également pour *E. canadensis* G6-7 en Corse, où l'accès aux viscères des porcs et des sangliers implique un volet sylvatique dans le cycle.

La reconnaissance de l'expertise du LNR a permis d'initier des collaborations internationales qui ont en retour enrichi la diversité des situations épidémiologiques étudiées. Ainsi, l'étude de la diversité génétique d'*E. multilocularis* (microsatellite EmsB) a contribué à une meilleure compréhension de la dynamique d'expansion du parasite en Europe (Pologne, Suède, Danemark). L'étude des foyers d'hyper enzootie d'*E. granulosus* (Moldavie, Maroc, Algérie) et la caractérisation des espèces présentes et de leurs niveaux d'infestation chez les hôtes intermédiaires a permis d'envisager des actions de lutte adaptées. Le LNR a participé à l'expérimentation de méthodes de lutte contre *E. multilocularis*, ce qui a démontré la complexité des conditions requises pour leur efficacité tant par la vermifugation des renards que par la régulation de leur population. Au bilan, les nouvelles données épidémiologiques obtenues au cours des dix années de travaux ont permis d'aboutir à une meilleure appréhension du risque zoonotique actuel lié aux échinocoques en France.