



HAL
open science

Pouvoir pathogène d'*Echinococcus multilocularis* dans son hôte intermédiaire : étude de la cinétique parasitaire dans un modèle expérimental chez la souris

Maryam Mijem

► To cite this version:

Maryam Mijem. Pouvoir pathogène d'*Echinococcus multilocularis* dans son hôte intermédiaire : étude de la cinétique parasitaire dans un modèle expérimental chez la souris. *Médecine vétérinaire et santé animale*. 2024. dumas-04481725

HAL Id: dumas-04481725

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04481725>

Submitted on 28 Feb 2024

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Année 2024

**POUVOIR PATHOGÈNE D'*ECHINOCOCCUS
MULTILOCULARIS* DANS SON HÔTE INTERMÉDIAIRE :
ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE PARASITAIRE DANS UN
MODÈLE EXPÉRIMENTAL CHEZ LA SOURIS**

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de
DOCTEUR VÉTÉRAIRE
présentée et soutenue publiquement devant
la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)
le 26 janvier 2024

par

Maryam, Daouya MIJEM

sous la direction de
Veronica RISCO CASTILLO

JURY

Présidente du jury :	Mme Julie RIVIÈRE	Professeur à l'EnvA
Directrice de thèse :	Mme Veronica RISCO CASTILLO	Maître de Conférences à l'EnvA
Examineur :	M. Pascal ARNÉ	Maître de Conférences à l'EnvA
Membre invité :	M. Gérald UMHANG	Chef de projet au LRFS de Nancy (ANSES)
Membre invité :	M. Franck BOUÉ	Directeur adjoint du LRFS de Nancy (ANSES)

Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire



version Janvier 2024

Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigié	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
Mme	Benckroun	Ghita	Maître de conférences HDR	DEPEC
M	Blaga	Radu	Professeur	DSBP
M	Blot	Stéphane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
Mme	Chastant	Sylvie	Professeur	DPASP
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valerie	Professeur	DEPEC
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquibet	Loïc	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Federighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Professeur	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences HDR	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guéneq	Christelle	Professeur	DEPEC
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Rivière	Julie	Professeur	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Arné	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barbarino	Alix	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Coudry	Virginie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Crozet	Guillaume	Maître de conférences	DPASP
Mme	De Paula Reis	Alline	Maître de conférences	DPASP
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences	DPASP
Mme	Denis	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guérin	Virginie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Guétin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Kurtz	Maxime	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagrée	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Dudal	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
M	Mammeri	Mohamed	Maître de conférences	DSBP
Mme	Manguin	Estelle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
Mme	Marotto	Stéphanie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Maurice	Emeline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mespoullhes-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mtimet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Quéré	Émilie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Ravary-Plumioën	Bérangère	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP
M	Tanquerel	Ludovic	Maître de conférences	DEPEC

Remerciements

À la Présidente du Jury de cette thèse, Madame Julie Rivière, Maître de conférences à l'EnvA,

Pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Hommages respectueux.

À Madame Veronica Risco-Castillo, Maître de conférences à l'EnvA,

Pour m'avoir encouragée à choisir ce sujet, pour m'avoir encadrée et aiguillée. Sincère reconnaissance.

À Monsieur Pascal Arné, Maître de conférences à l'EnvA,

Pour avoir accepté d'examiner mon travail et pour avoir été un membre de jury bienveillant en 2018 lors de mon oral de concours. Sincère reconnaissance.

À Messieurs Franck Boué et Gérald Umhang, respectivement Directeur adjoint et Chef de projet au LRFSN,

Pour leur confiance, pour m'avoir encadrée, relue et soutenue lors des différentes étapes. Pour m'avoir intégrée à leur équipe et fait aimer le monde de la recherche. Sincère reconnaissance.

À Madame Justine Pellegrini, technicienne au LRFSN,

Pour m'avoir guidée avec patience lors des étapes techniques de ce travail. Sincères remerciements.

À mes parents, famille et amis,

Pour leur soutien sans faille.

Table des matières

Liste des figures	3
Liste des tableaux	5
Liste des abréviations	6
Introduction	9
Première partie : bibliographie	11
1. Taxonomie des échinocoques	11
A. L'embranchement : les Plathelminthes	11
B. La classe : les Cestodes	11
C. L'ordre : les Cyclophyllidea	11
D. La famille : les Tænidæ	12
E. Le genre : <i>Echinococcus</i>	12
2. Présentation de l'échinocoque d'intérêt : <i>Echinococcus multilocularis</i>	13
A. Morphologie du parasite	13
a. Au stade adulte	13
b. Au stade œuf	14
c. Au stade metacestode	14
B. Cycle évolutif du parasite	15
a. Chez l'hôte définitif	15
b. Chez l'hôte intermédiaire	15
c. Place de l'Homme dans le cycle	17
C. Distribution géographique d' <i>Echinococcus multilocularis</i>	17
a. Distribution mondiale	17
b. En Europe	18
c. En France	19
3. Présentation de la maladie chez l'Homme : l'échinococcose alvéolaire	20
A. Symptômes liés à <i>Echinococcus multilocularis</i>	20
a. Chez les hôtes définitifs	20
b. Chez les hôtes intermédiaires principaux : les rongeurs	20
c. Chez les hôtes accidentels : l'Homme	21
B. Diagnostic et traitement de la maladie chez l'homme	22
a. Diagnostic morphologique par imagerie médicale	22
b. Diagnostic de confirmation par biologie spécifique	24
c. Le traitement de l'échinococcose alvéolaire	25
d. La prophylaxie de l'échinococcose alvéolaire	25
C. Diagnostic de la maladie chez les hôtes définitifs	26
a. Diagnostic intestinal du parasite	26
b. Diagnostic coprologique du parasite	29
D. Diagnostic de la maladie chez les hôtes intermédiaires principaux	29
Deuxième partie : travail expérimental	31
1. Présentation du laboratoire	31
2. Présentation des études et de leurs objectifs	32

3. Matériels et méthodes	33
A. Organisation des locaux	33
B. Protocole d'infestation par voie intrapéritonéale (2017)	34
C. Protocole d'infestation par voie orale (2022-2023)	35
a. Protocole de récupération d'œufs d' <i>E. multilocularis</i>	35
b. Protocole d'infestation orale de souris dans le P3	36
c. Protocole de suivi de la présence macroscopique d' <i>E. multilocularis</i> au sein des organes de la souris	38
D. Biologie moléculaire : identification et suivi de la détection de l'ADN d' <i>E. multilocularis</i> dans les organes de la souris	40
a. Lyse des échantillons, extraction/purification de l'ADN	40
b. Protocole de PCR quantitative : qPCR-Em	42
4. Résultats	46
A. Infestation intra-péritonéale (2017)	46
B. Infestation par voie orale (2022-2023)	49
a. Evolution du poids vif des souris au cours du temps	49
b. Evolution de l'aspect macroscopique des foies au cours du temps	50
c. Résultats de la détection de l'ADN d' <i>E. multilocularis</i> par qPCR à partir des différents organes	52
5. Discussion	54
A. Infestation intra-péritonéale (2017)	54
B. Infestation par voie orale (2022-2023)	55
Conclusion	57
Liste des références bibliographiques	59
Annexes	63

Liste des figures

Figures 1a et 1b : Stade adulte d' <i>E. multilocularis</i> (d'après Thompson <i>et al.</i> , 1995)	13
Figures 2a et 2b : Stade œuf d' <i>E. multilocularis</i>	14
Figure 3 : Les différents stades d' <i>Echinococcus</i> spp. au cours du cycle parasitaire	16
Figure 4 : Cycle d' <i>E. multilocularis</i> et place de l'Homme.....	17
Figure 5 : Prévalence combinée d' <i>E. multilocularis</i> chez les renards roux et les renards arctiques au sein de l'Union Européenne et des pays adjacents (données obtenues après 2000).....	18
Figure 6 : Localisation des renards contaminés (en rouge) par <i>E. multilocularis</i> en France entre 2005 et 2011	19
Figure 7 : Campagnol roussâtre (<i>Myodes glareolus</i>) présentant des lésions d' <i>E. multilocularis</i> au niveau du foie.....	21
Figure 8 : Aspect macroscopique des lésions d' <i>E. multilocularis</i> au niveau d'un foie humain	22
Figure 9 : Aspect échographique de l'échinococcose alvéolaire correspondant à une lésion débutante	23
Figure 10 : Conseils de prévention de l'échinococcose alvéolaire	26
Figure 11 : Principales étapes de la techniques SSCT (source personnelle)	28
Figure 12 : Photographies illustrant l'étape de récupération des organes de souris.....	35
Figure 13 : Etapes de l'infestation orale des souris.....	37
Figure 14 : Illustrations de différentes étapes réalisées dans le P3 (source personnelle)	39
Figure 15 : Principe de la procédure iPrep™ ChargeSwitch® gDNA Tissue (source : thermofisher.com)	41
Figure 16 : Principe de fonctionnement des sondes de qPCR (source : programme pédagogique DUT MGB).....	44
Figure 17 : Masse parasitaire d'une souris après 6 semaines d'infestation visible avant ouverture de l'abdomen (gauche) et après ouverture (droite), source personnelle	47
Figure 18 : Evolution du poids des souris au cours du temps	49
Figure 19 : Exemple de différence de profil abdominal entre J0 et le 4 ^{ème} mois	50
Figure 20 : Aspect sain d'un foie de souris (Bastard, 2009)	50
Figure 21 : Proportion des organes contaminés au cours du temps	52

Figure 22 : Diagrammes radar de répartition des échantillons positifs pour chaque mois53

Liste des tableaux

Tableau 1 : Position taxonomique d' <i>Echinococcus multilocularis</i>	12
Tableau 2 : Composition du Mix réactionnel (source : LRFSN).....	43
Tableau 3 : Séquences des sondes et amorces de la qPCR-Em.....	43
Tableau 4 : Conditions d'amplification de la PCR	45
Tableau 5 : Tableau décisionnel d'interprétation des résultats de la PCR (source : LRFSN)	46
Tableau 6 : Récapitulatif des résultats de l'infestation intra-péritonéale des souris.....	48
Tableau 7 : Evolution macroscopique des foies des souris au cours du temps.....	51

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AFSSET : Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail

AP : Agent pathogène

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CI : Contrôle Interne

CNR : Centre National de Référence

dNTPs : désoxyNucléotides Tri-Phosphates

DUT : Diplôme universitaire technologique

EDTA : éthylène-Diamine-tétra-Acétique

ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (technique de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée)

Em : EM : *E. multilocularis* : *Echinococcus multilocularis*

EPI : équipement de protection individuelle

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

IST : Intestinal Scraping Technique (technique de grattage intestinal)

IP : Intra-Péritonéal

LNR : Laboratoire National de Référence

LRFSN : Laboratoire de la Rage et de la Faune Sauvage de Nancy

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

MGB : Minor Groove Binding (agent de liaison au sillon mineur)

PCR : Polymérase Chain Reaction (réaction de polymérase en chaîne)

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérase en chaîne quantitative)

SCT : Sedimentation and Counting Technique (technique de sédimentation et de comptage)

SSCT : Segmental Sedimentation and Counting Technique (technique de sédimentation segmentaire et de comptage)

TAE : tampon Tris-Acétate-EDTA

Introduction

L'échinococcose alvéolaire est une zoonose parasitaire cosmopolite non soumise à déclaration obligatoire, d'après le Ministère de l'Agriculture. Cette maladie est causée par le parasite *Echinococcus multilocularis*. Plutôt rare, elle présente néanmoins un intérêt scientifique et médical majeur. Elle se caractérise notamment par une très grande latence clinique : la période entre la contamination et l'apparition des premiers symptômes chez l'Homme peut aller jusqu'à 15 ans et on décompte en moyenne 35 nouveaux cas annuels en France au cours de la dernière décennie (CNR échinococcose).

Le cycle de la maladie qui sera présenté par la suite inclus un hôte définitif (principalement le renard), et des hôtes intermédiaires (les rongeurs). L'Homme joue un rôle d'hôte accidentel et est considéré comme un cul-de-sac épidémiologique.

D'un point de vue historique, l'échinococcose alvéolaire est identifiée pour la première fois en Allemagne dans les années 1850. À l'époque, elle était considérée comme une forme particulière de cancer mais elle fut très vite identifiée comme étant une parasitose. Le premier diagnostic date quant à lui des années 1890, le premier patient identifié étant un Français né en Haute-Savoie (Vuitton *et al.*, 2011). Le nombre de cas n'a cessé d'augmenter au début du 20^e siècle avec un épicode localisé en Franche-Comté. C'est ainsi que le CHU de Besançon est devenu centre Collaborateur de l'OMS en 1995 et Centre National de Référence depuis 2012 (Bresson-Hadni et Angèle Vuitton, 2016).

En 2017, à l'occasion d'un travail de fin d'études de diplôme universitaire technologique, j'ai été accueillie au sein du Laboratoire de la Rage et de la Faune Sauvage de Nancy (LRFSN) pour travailler sur l'échinococcose alvéolaire. À l'époque, mon travail se séparait en deux axes majeurs : une étude d'évaluation de l'impact de la présence d'œufs du parasite sur le sol sur le taux d'infestation des rongeurs et une étude de suivi de l'infestation expérimentale de souris. Cette étude avait notamment pour but d'approfondir les connaissances sur le développement des métacestodes chez les rongeurs, des lésions ayant été observées dans plusieurs organes autres que le foie chez les rongeurs sauvages. C'est ce deuxième axe que j'ai eu à cœur de développer dans le cadre de l'exercice de ma thèse vétérinaire. J'ai eu la chance de pouvoir reprendre mes travaux avec l'équipe du LRFSN, de les poursuivre, et d'en affiner les conclusions.

Ce travail de thèse propose une synthèse bibliographique permettant de mieux comprendre le cycle parasitaire et la place de l'homme dans ce cycle ainsi qu'une partie expérimentale séparée en deux volets. D'une part les travaux réalisés en 2017 qui consistaient en l'infestation

expérimentale de souris par injection de matériel larvaire par voie intra-péritonéale avec suivi moléculaire de la présence de l'ADN du parasite dans les différents organes au cours du temps seront présentés. Les travaux réalisés en 2022 et 2023 qui reprennent le suivi de la présence de l'ADN du parasite dans différents organes chez des souris infestées expérimentalement, mais cette fois, par ingestion orale d'œufs infectieux d'*Echinococcus multilocularis*, représentant la voie naturelle d'infestation des hôtes intermédiaires seront détaillés, avant une discussion générale.

Première partie : bibliographie

1. Taxonomie des échinocoques

A. L'embranchement : les Plathelminthes

L'embranchement des Plathelminthes regroupe plus de 20 000 espèces qui ont pour caractéristiques d'avoir à un corps aplati au stade adulte et des ventouses ou structure similaire pour s'accrocher à leur hôte. La plupart des espèces de Plathelminthes sont hermaphrodites et la surface de leur corps (tégument) est métaboliquement active.

Le terme Plathelminthe englobe deux classes parasitiques majeures que sont les Cestodes et les Trématodes. La différence entre ces deux classes se situe au niveau morphologique et physiologique : les Cestodes adultes ont un corps segmenté et en forme de long ruban alors que les Trématodes ont un corps non segmenté. Les Cestodes ne possèdent pas de tractus alimentaire et utilisent leur tégument pour absorber des nutriments. A l'inverse, les Trématodes sont pourvus d'une ventouse orale et d'un système digestif interne incomplet (Jacobs *et al.*, 2016).

B. La classe : les Cestodes

Anatomiquement, les Cestodes ont un corps formé de trois parties : un scolex pourvu de ventouses et de crochets, un cou siège d'une croissance intense et un tronc aussi appelé strobile formé de segments : les proglottis. Le cycle évolutif des Cestodes est hétéroxène : les hôtes successifs sont d'espèces différentes. L'hôte définitif est un vertébré, l'hôte intermédiaire peut être invertébré ou dans ce contexte un vertébré (Chermette et Bussiéras, 1993).

Au stade adulte, les Cestodes ne provoquent que des altérations mineures malgré leur taille imposante allant parfois jusqu'à plusieurs mètres de long. Le stade larvaire cause les dommages les plus importants tant en pratique vétérinaire qu'humaine et c'est pourquoi il constitue une préoccupation importante pour la santé publique (Jacobs *et al.*, 2016).

C. L'ordre : les Cyclophyllidea

Anatomiquement les Cyclophyllidea sont des cestodes au scolex constitué de quatre ventouses (tétracestodes). Ils ne sont pas pourvus d'orifices de pontes mais de segments ovigères contenant des œufs embryonnés munis chacun une oncosphère aussi appelée embryon hexacanthé (Chermette et Bussiéras, 1993).

D. La famille : les Tænidæ

Les espèces appartenant à la famille des Tænidæ ont la particularité de posséder un scolex avec un rostre non rétractile muni de deux couronnes de crochets et d'effectuer leurs échanges métaboliques à travers leur revêtement extérieur : le tégument. Ce qui différencie le genre *Echinococcus* des autres Tænidæ concerne sa morphologie : le stade adulte sous forme de ver ne mesure que quelques millimètres de long (2 à 7 mm) tandis que les espèces de *Taenia* peuvent atteindre plusieurs mètres. De plus, les échinocoques n'ont généralement pas plus de six segments alors que certains *Taenia* en possèdent plusieurs milliers (Chermette et Bussiéras, 1993).

Malgré ces caractéristiques qui différencient les échinocoques des autres Taenias, les cycles parasites de ces différentes espèces sont les mêmes et il est impossible de les différencier microscopiquement au stade de l'œuf (Jacobs *et al.*, 2016).

E. Le genre : *Echinococcus*

Le genre *Echinococcus* regroupe neuf espèces connues à l'heure actuelle : *E. multilocularis* (Tableau 1), *E. oligarthra*, *E. vogeli*, *Echinococcus granulosus* sensu stricto, *E. equinus*, *E. ortleppi*, *E. felidis*, *E. canadensis*, et *E. shiquicus*. Le point commun de ces espèces est le cycle de vie : l'hôte définitif est un carnivore qui porte les vers dans son intestin et les hôtes intermédiaires sont des mammifères herbivores ou omnivores qui s'infestent en ingérant accidentellement les œufs (Romig *et al.*, 2017 ; Thompson, 2017).

Tableau 1 : Position taxonomique d'*Echinococcus multilocularis*

Embranchement	Plathelminthes
Classe	Cestodes
Sous-classe	Eucestodes
Ordre	<i>Cyclophyllidae</i>
Famille	<i>Taenidae</i>
Genre	<i>Echinococcus</i>
Espèce	<i>multilocularis</i>

Comme les autres Cestodes, le corps des échinocoques est constitué d'un strobile composé de différents segments de reproduction qui se développent de manière indépendante : les proglottis. À l'extrémité antérieure de cette chaîne se trouve un organe appelé scolex qui constitue la « tête » du parasite. Les nouveaux proglottis sont synthétisés à intervalles de temps réguliers à partir du « cou » à la base du scolex. Le scolex est muni de deux couronnes de crochets et de quatre ventouses de manière à ce que le ver puisse s'accrocher à la muqueuse intestinale (Jacobs *et al.*, 2016)

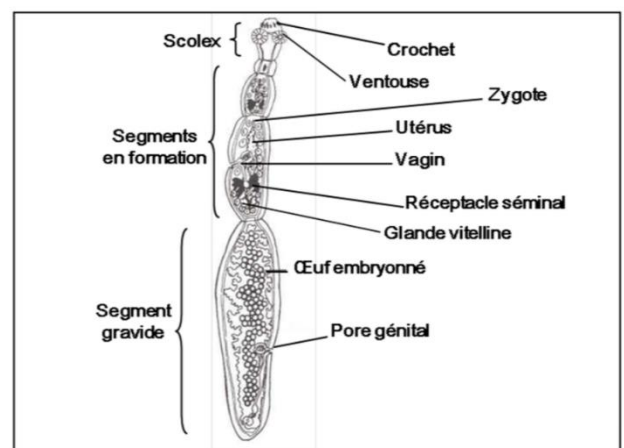
2. Présentation de l'échinocoque d'intérêt : *Echinococcus multilocularis*

A. Morphologie du parasite

a. Au stade adulte

Le ver adulte retrouvé chez l'hôte définitif mesure 1,2 à 4,5 mm de long et est constitué de 4 à 5 proglottis (Figures 1a et 1b, (Thompson *et al.*, 1995)). Le segment postérieur terminal est un proglottis mature appelé segment ovigère. Celui-ci est rempli d'embryophores (œufs embryonnés) et, tout comme les autres segments, il est muni d'organes sexuels mâles et femelles ce qui confère au ver son caractère hermaphrodite (Organisation mondiale de la santé et Office international des épizooties, 2001)

Figures 1a et 1b : Stade adulte d'*E. multilocularis*
(d'après Thompson *et al.*, 1995)

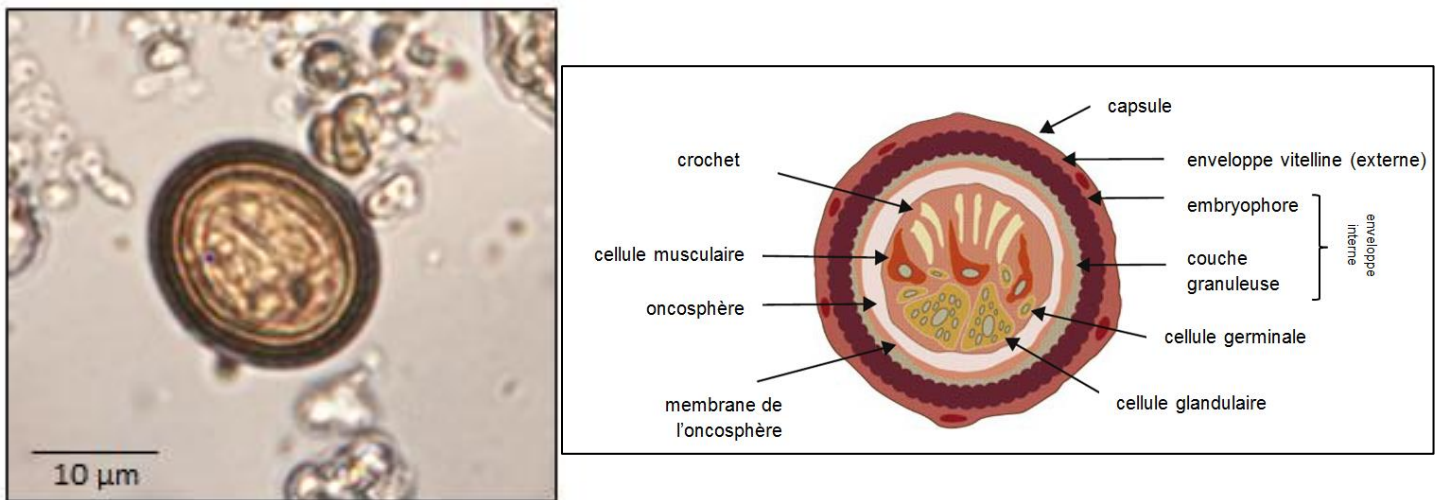


b. Au stade œuf

Les œufs d'*Echinococcus multilocularis* sont de forme ovoïde et d'environ 30 à 40 µm de diamètre (Figures 2a et 2b, (Thompson, 2017)). Chaque œuf contient une larve embryonnée hexacanthe appelée oncosphère qui est le premier stade larvaire.

Figures 2a et 2b : Stade œuf d'*E. multilocularis*

(sources : photographie d'après Anses et schéma d'après Thompson, 2017)



L'oncosphère est entourée de plusieurs membranes dont l'embryophore qui est une membrane kératinisée à l'aspect strié. Ces membranes assurent protection et survie à l'embryon dans le milieu extérieur. Si les conditions d'humidité et de température sont favorables c'est-à-dire dans un environnement humide et à basse température (entre 4 et 15 °C), les œufs peuvent survivre pendant des mois en climat tempéré, jusqu'à plus de 240 jours en automne-hiver et plus de 78 jours en été (Veit *et al.*, 1995).

Lorsque l'hôte définitif défèque, les œufs d'*Echinococcus multilocularis* sont disséminés dans l'environnement au niveau du sol, puis par dispersion passive potentiellement dans l'eau ou encore sur des végétaux (Losson et Hanosset, 2004).

c. Au stade métacestode

Le métacestode est le stade larvaire constitué d'un ensemble hétérogène de microkystes parasites. Il est divisé en une couche externe stratifiée composée de polysaccharides et une couche interne riche en cellules parasites dite couche germinale. L'intérieur des

microkystes est rempli d'un liquide appelé fluide vésiculeux. Des protoscolex (scolex invaginés) sont contenus dans ce fluide (Autier, 2022).

B. Cycle évolutif du parasite

a. Chez l'hôte définitif

Le cycle du parasite est principalement sylvatique et l'homme constitue un hôte accidentel. En Europe, l'hôte définitif est principalement le renard (les genres *Vulpes* et *Alopex*) mais il arrive que le parasite soit retrouvé chez d'autres canidés comme le chien (*Canis lupus familiaris*), le loup (*Canis lupus*) et le chien viverrin (*Nyctereutes procyonoides*) ou encore chez un félinidé comme le chat (*Felis catus*).

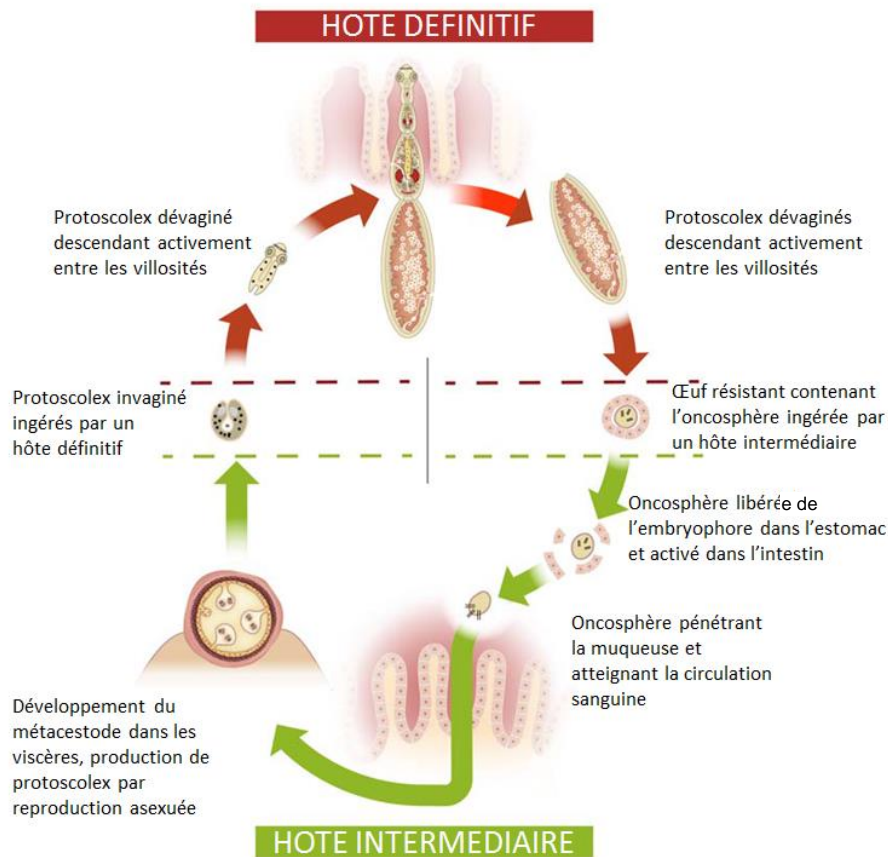
La contamination des hôtes définitifs se fait par la relation proie-prédateur avec les hôtes intermédiaires. Le ver sous forme adulte se situe dans l'intestin de l'hôte définitif où il s'y accroche entre les villosités à l'aide de crochets et de ventouses. Le ver poursuit ensuite son développement en produisant plusieurs segments jusqu'à la formation d'un segment ovigère qui contient des œufs et qui sera libéré dans le contenu intestinal et éliminé avec les fèces.

Il s'écoule une période d'environ 28 à 35 jours appelée période prépatente où aucun œuf n'est émis dans les fèces. Cette période s'étend de l'infestation c'est-à-dire l'ingestion de protoscolex lors d'un acte de prédation jusqu'au développement des vers conduisant à la production des œufs. Ensuite, la période patente de production des œufs dure environ 3 à 4 mois et c'est durant cette période que les œufs sont libérés dans l'environnement (Umhang et Boue, 2014).

b. Chez l'hôte intermédiaire

La contamination des hôtes intermédiaires se fait de façon indirecte par ingestion d'œufs ou d'aliments souillés par les déjections de l'hôte définitif. Les hôtes intermédiaires sont majoritairement les micromammifères comme le campagnol terrestre (*Arvicola terrestris*), le campagnol des champs (*Microtus arvalis*) ou encore le campagnol agreste (*Microtus agrestis*).

Figure 3 : Les différents stades d'*Echinococcus* spp. au cours du cycle parasitaire (d'après Thompson, 2017)



Le rongeur va ingérer des œufs d'*Echinococcus multilocularis* ce qui va provoquer un développement larvaire de vésicules interconnectées principalement au niveau du foie.

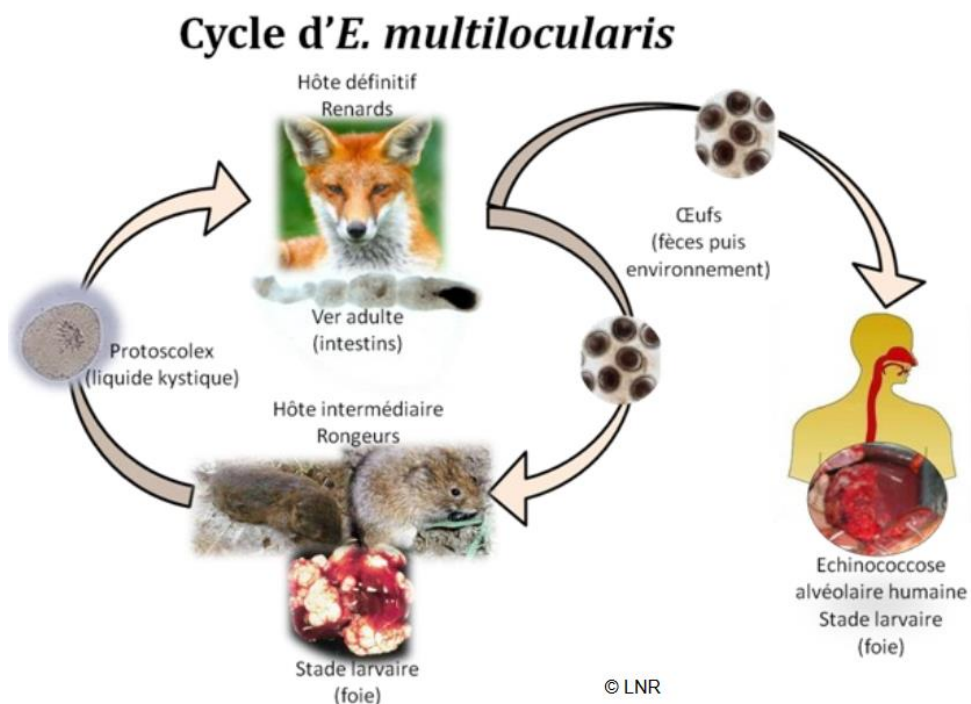
Une fois que l'œuf est ingéré par le rongeur, les enzymes digestives libèrent l'oncosphère de son embryophore. L'oncosphère ou larve hexacanthé rejoint la circulation sanguine pour être généralement stoppé au niveau du foie où elle se développe sous forme de vésicule (Figure 3).

Les lésions observées au niveau du foie et des autres organes sont de forme alvéolaire et contiennent de nombreux protoscolex. Plus les lésions prolifèrent, plus l'organe est touché et plus l'animal sera affaibli ce qui fait de lui une proie de choix pour les prédateurs et facilite la poursuite du cycle (Organisation mondiale de la santé et Office international des épizooties, 2001 ; Thompson, 2017)

c. Place de l'Homme dans le cycle

De la même manière que les rongeurs, l'homme se contamine par ingestion accidentelle des œufs issus d'aliments souillés ou par contact main-bouche ou direct avec un hôte définitif (Figure 4). Cependant contrairement aux rongeurs, l'homme constitue une impasse parasitaire dans le cycle (Deplazes et Eckert, 2001).

Figure 4 : Cycle d'*E. multilocularis* et place de l'Homme
(d'après Anses.fr)



C. Distribution géographique d'*Echinococcus multilocularis*

a. Distribution mondiale

Echinococcus multilocularis est principalement retrouvé dans les zones de climat continental et plus particulièrement dans l'hémisphère nord. Cette distribution s'explique principalement par la sensibilité de l'œuf à la chaleur et à la dessiccation. Au départ, *Echinococcus multilocularis* est originaire des régions du Grand Nord telles que l'Alaska, le Canada et la Sibérie. Actuellement, les régions les plus endémiques sont l'Europe centrale, une grande partie de l'Eurasie du nord et du centre et certaines régions d'Amérique du Nord (Organisation mondiale de la santé et Office international des épizooties, 2001)

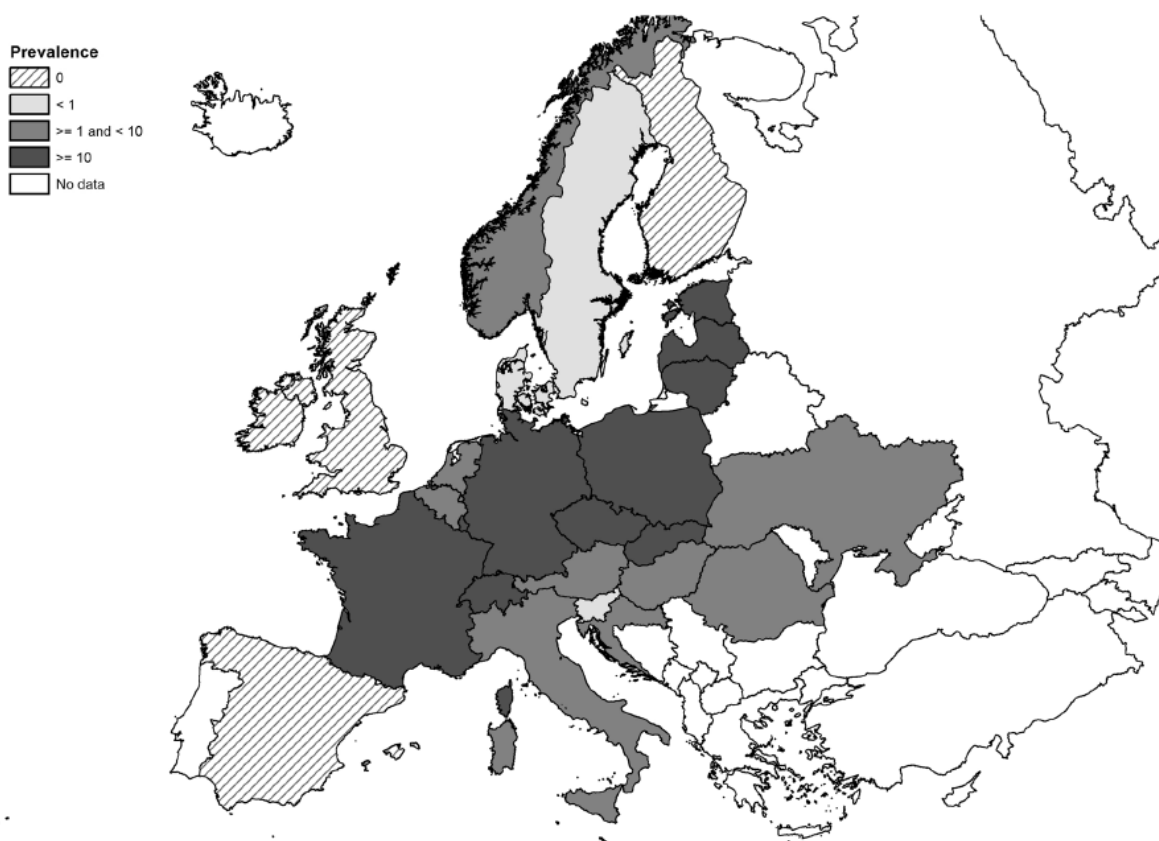
b. En Europe

A la fin des années 1980, seuls quatre pays étaient considérés comme des zones endémiques mais les études qui ont suivi cette période ont permis de montrer que la situation épidémiologique européenne d'endémie pour *Echinococcus multilocularis* a évolué. Ce changement a été surtout observé en Allemagne dans les années 1990 avec la mise en évidence de l'augmentation de la prévalence du portage chez le renard et l'extension vers le nord de l'aire de distribution du parasite (Boué *et al.*, 2010).

A l'heure actuelle, le parasite est présent chez le renard roux dans de nombreux pays avec des prévalences différentes. Une faible prévalence (≤ 1 %) est décrite par exemple au Danemark, en Slovénie et en Suède, une prévalence moyenne (>1 % jusqu'à <10 %) en Autriche, en Belgique ou encore dans le nord de l'Italie et les zones de forte prévalence (>10 %) se trouvent plutôt en Estonie, en République Tchèque, en France, en Allemagne ou encore en Pologne et en Suisse (Figure 5). Cette augmentation de l'aire de distribution du parasite s'explique notamment par l'augmentation des populations de renards roux qui sont les principaux hôtes définitifs (Oksanen *et al.*, 2016)

Figure 5 : Prévalence combinée d'*E. multilocularis* chez les renards roux et les renards arctiques au sein de l'Union Européenne et des pays adjacents (données obtenues après 2000)

(d'après Oksanen *et al.*, 2016)

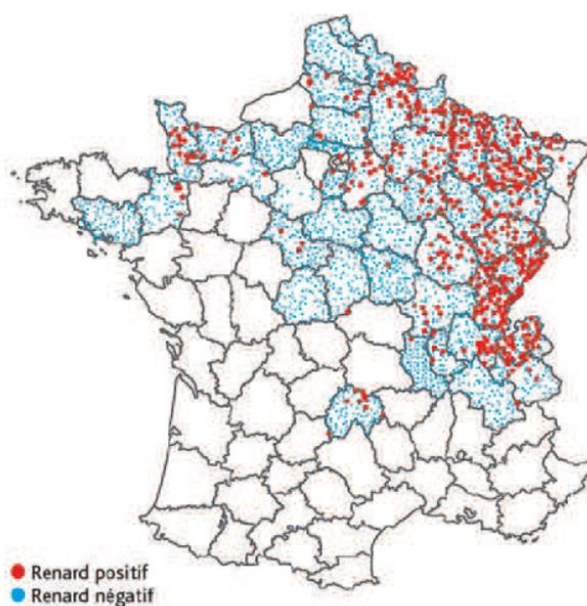


c. En France

De la même manière qu'en Europe, le parasite s'est répandu en France depuis le foyer historique situé en Franche-Comté vers l'ouest englobant toutes les régions de l'Est, de l'Île de France et du Nord (Figure 6).

Une étude menée entre 2006 et 2010 démontre une augmentation de la prévalence d'*E. multilocularis* chez le renard en comparaison aux données des années 1984 à 1987. En Lorraine par exemple, la prévalence vulpine est passée de 28,1 à 42,8 % en vingt ans. En plus d'une augmentation significative de la population de renards, il est important de remarquer l'implantation croissante de cet animal en zone urbaine. Ces données poussent à craindre que l'augmentation et l'expansion géographique de la zone d'endémie d' *E. multilocularis* se poursuivront dans les années à venir (Combes *et al.*, 2013).

Figure 6 : Localisation des renards contaminés (en rouge) par *E. multilocularis* en France entre 2005 et 2011
(d'après Combes *et al.*, 2013)



3. Présentation de la maladie chez l'Homme : l'échinococcose alvéolaire

L'échinococcose alvéolaire est considérée comme l'une des plus dangereuses maladies parasitaires pour l'Homme en Europe (CNR échinococcose). Lorsque l'Homme est contaminé, le parasite se développe dans son organisme et plus particulièrement au niveau du foie dont l'aspect devient tumoral. L'invasion gagne parfois les tissus et organes voisins. Asymptomatique pendant cinq à quinze ans chez les patients immunocompétents, l'échinococcose alvéolaire est une maladie pernicieuse puisque lorsque le diagnostic est posé, les altérations sont souvent déjà très importantes. Cependant, depuis l'augmentation de la fréquence des différents examens d'imagerie (échographie, IRM, scanner), les formes asymptomatiques représentent actuellement plus de la moitié des cas diagnostiqués (CNR échinococcose).

A. Symptômes liés à *Echinococcus multilocularis*

Les hôtes définitifs et intermédiaires ne sont pas soumis aux mêmes enjeux face au parasite. Seuls les hôtes intermédiaires présentent des symptômes liés à l'infestation par le stade larvaire. En effet, selon le type d'hôte (définitif ou intermédiaire), le parasite se manifeste à différents stades et à différents endroits de l'organisme.

a. Chez les hôtes définitifs

Les hôtes définitifs développent une cestodose imaginaire sans symptôme visible et handicapant de la maladie. La présence du parasite adulte dans l'intestin est bénigne sauf dans certains cas où l'infestation est massive et où certains troubles apparaissent comme un prurit anal ou une entérite (Entente de lutte interdépartementale contre les zoonoses, 2024)

b. Chez les hôtes intermédiaires principaux : les rongeurs

Une fois que l'infestation a eu lieu chez les hôtes intermédiaires, certains signes cliniques caractéristiques apparaissent à plus ou moins court terme. Souvent, une dégradation de l'état général de l'animal est observée de l'extérieur ainsi qu'un gonflement de l'abdomen. Au niveau interne, le metacestode attaque le foie principalement de la même façon qu'une tumeur (Figure 7, (Umhang *et al.*, 2016)). Les lésions induisent une réaction inflammatoire qui peut entraîner d'autres complications (Losson et Hanosset, 2004).

Figure 7 : Campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*) présentant des lésions d'*E. multilocularis* au niveau du foie d'après Umhang *et al.*, 2016

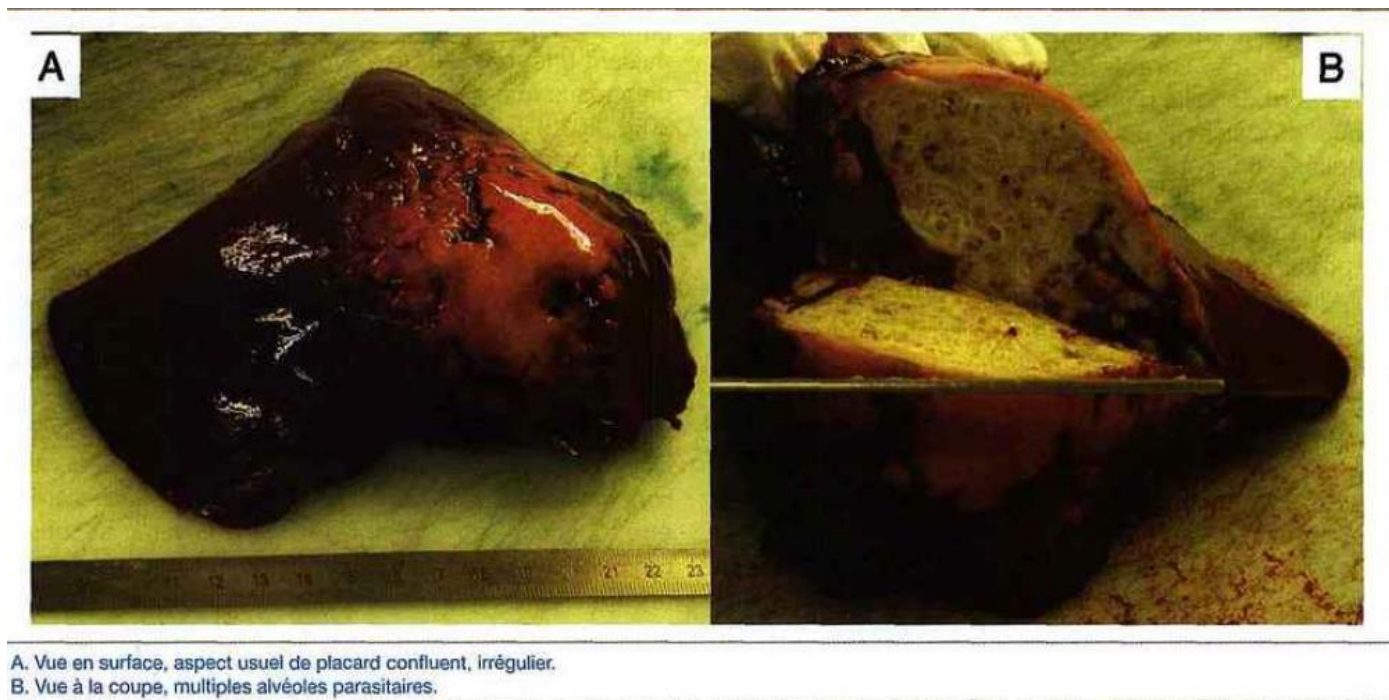


c. Chez les hôtes accidentels : l'Homme

Les lésions parasitaires au niveau du foie chez l'Homme peuvent varier d'un petit foyer de quelques millimètres à une large zone d'infiltration pouvant aller jusqu'à 20 cm de diamètre (Figure 8, (Bresson-Hadni *et al.*, 2014)). Les lésions tendent au fur et à mesure à s'étendre aux organes adjacents au foie tels que les organes de la cavité abdominale et il est possible de retrouver le parasite au niveau d'organes plus éloignés comme les muscles, les poumons ou encore le cerveau (Piarroux *et al.*, 2011).

Une personne atteinte d'échinococcose alvéolaire présente dans un tiers des cas une cholestase primaire suivie d'un ictère et dans un tiers des cas de fortes douleurs abdominales. Dans le tiers restant des cas, la maladie est détectée de manière fortuite lors d'un examen médical chez un patient présentant une dégradation globale de son état.

Figure 8 : Aspect macroscopique des lésions d'*E. multilocularis* au niveau d'un foie humain d'après Bresson-Hadni *et al.*, 2014



La particularité de la maladie chez l'Homme est la longue période asymptomatique de 5 à 15 ans avant l'apparition des premiers troubles. Cette période d'incubation est un problème majeur puisqu'elle empêche la mise en place rapide d'un traitement. L'issue s'avérait souvent fatale pour le malade il y a quelques années encore lors d'un diagnostic trop tardif.

En termes de nombre de cas, le Centre National de Référence de l'Echinococcose Alvéolaire (CNR-EA) du CHU de Besançon a enregistré plus de 600 cas d'échinococcose alvéolaire en France à ce jour. Ce chiffre est le fruit d'une surveillance rétroactive des cas diagnostiqués depuis 1982 et d'une surveillance active qui enregistre les nouveaux cas soit environ 35 nouveaux cas par an actuellement (« CNR Echinococcoses », s. d.).

B. Diagnostic et traitement de la maladie chez l'homme

a. Diagnostic morphologique par imagerie médicale

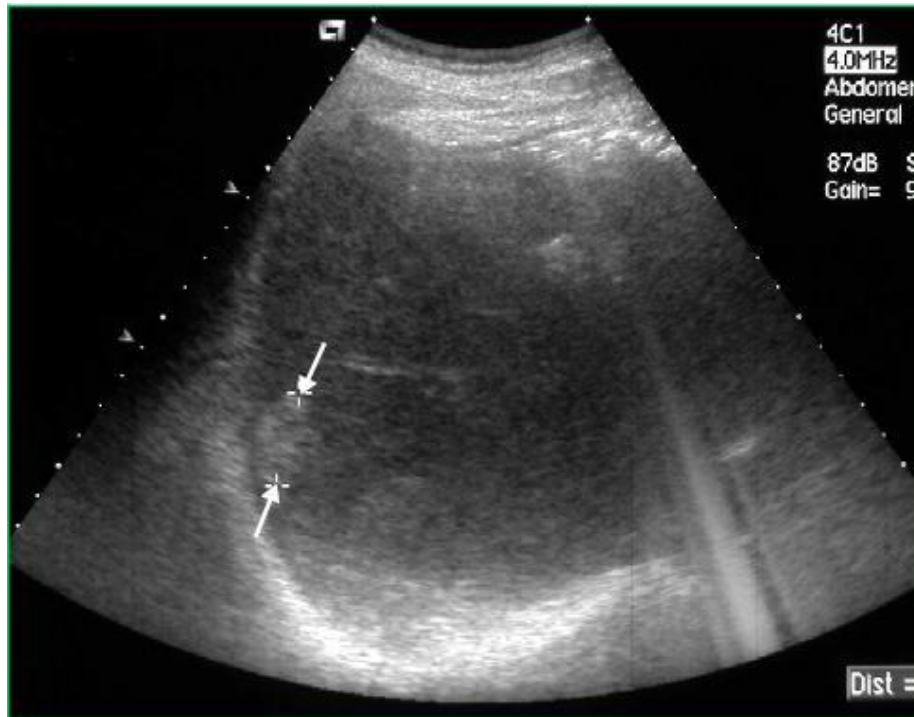
L'échographie

L'échographie abdominale est la méthode de base de diagnostic de l'échinococcose alvéolaire. Elle permet d'effectuer un repérage précis de la lésion et d'en identifier l'aspect

(Figure 9). C'est une méthode très fiable car les clichés échographiques sont très caractéristiques dans le cas d'une échinococcose alvéolaire (Bresson-Hadni *et al.*, 2014).

Figure 9 : Aspect échographique de l'échinococcose alvéolaire correspondant à une lésion débutante

(d'après Bresson-Hadni *et al.*, 2014)



Deux aspects de la lésion sont principalement retrouvés :

- L'**aspect typique** représente trois quarts des cas. Dans ce cas, la lésion est intra-hépatique et son allure est hétérogène. Certaines zones de la lésion sont néoplasiques avec des contours irréguliers et le centre de la lésion présente parfois des plages de nécrose. Une échographie Doppler hépatique couleur et spectrale permet de visualiser les principaux vaisseaux hépatiques et d'évaluer le respect ou non de leur perméabilité (engainement ou refoulement par la lésion parasitaire), (Bresson-Hadni *et al.*, 2008, 2014).

- L'**aspect atypique** représente le quart restant des cas. Plusieurs formes peuvent exister : les formes focales homogènes qui sont des lésions débutantes de la maladie (< 2cm), les formes pseudo-kystiques ou cavitaires dues à une nécrose centrale et purement liquidiennes

et les formes massivement calcifiées qui sont de petite taille et souvent rétractées qui sont souvent des lésions parasitaires abortives et séquellaires (Bresson-Hadni *et al.*, 2008, 2014)

La tomodensitométrie avec scanner multi-détecteur

Pour le diagnostic des calcifications, l'examen de choix est la tomodensitométrie. Souvent l'examen tomodensitométrique permet la mise en évidence d'une hypertrophie compensatrice de la partie saine du foie en cas de lésion volumineuse. L'utilisation d'un scanner multi-détecteur permet de faire le bilan de l'extension de la lésion lors d'une démarche de traitement et d'évaluer l'opérabilité de la zone (Bresson-Hadni *et al.*, 2014).

L'IRM

Pour l'analyse des différents constituants de la lésion, l'IRM est considérée comme la meilleure des techniques d'imagerie. De plus, elle présente une sensibilité plus importante que la tomodensitométrie pour détecter les formes débutantes de la maladie.

Les techniques d'imagerie médicales permettent d'orienter le diagnostic de l'échinococcose alvéolaire mais seuls des tests sérologiques et moléculaires permettent d'établir un diagnostic définitif (Bresson-Hadni *et al.*, 2014).

b. Diagnostic de confirmation par biologie spécifique

Les techniques sérologiques

Dans 95 % des cas, c'est le diagnostic sérologique qui permet de confirmer le diagnostic réalisé par imagerie médicale. Il est divisé en deux étapes : le dépistage réalisé avec des tests d'hémagglutination indirecte utilisant des globules rouges sensibilisés ou avec l'ELISA et le test de confirmation qui repose sur l'immunoempreinte ou le Western Blot (Bresson-Hadni *et al.*, 2008, 2014).

Les techniques de biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire peuvent également permettre de poser le diagnostic définitif de l'échinococcose alvéolaire. Des cibles PCR spécifiques d'*Echinococcus multilocularis* ou du genre *Echinococcus* couplées à un séquençage pour le diagnostic de l'espèce peuvent être réalisées à partir d'échantillons de tissus. Ces échantillons sont prélevés lors de biopsies ou après opération chirurgicale.

Lorsque les techniques sérologiques ou de biologie moléculaire ne parviennent pas à confirmer une suspicion de diagnostic établie à partir d'une imagerie douteuse, une ponction transcutanée peut être réalisée mais cela reste exceptionnel (Bresson-Hadni *et al.*, 2014).

c. Le traitement de l'échinococcose alvéolaire

La prise en charge thérapeutique des patients atteints d'échinococcose alvéolaire a longtemps été un échec. Il y a trente ans la maladie apparaissait encore comme difficilement curable. A l'heure actuelle, la mise à disposition de traitements médicamenteux comme l'albendazole et les diagnostics plus précoces permettent une nette amélioration du pronostic. Ainsi, en 1970 chez un patient type atteint d'échinococcose alvéolaire, l'espérance de vie était réduite de 18,2 ans alors qu'en 2005, elle n'était plus réduite que de 3,5 ans. Néanmoins, malgré un traitement chirurgical suivi de différents traitements médicamenteux et d'une approche pluridisciplinaire de la prise en charge, la guérison n'est possible que dans 30 à 40 % des cas. Sans traitement, un taux de mortalité de 80 % est observé dans les dix ans après le diagnostic (Bresson-Hadni *et al.*, 2014).

Le traitement chirurgical

Actuellement le traitement chirurgical consiste à réaliser l'exérèse radicale de la masse parasitaire avec une marge de sécurité de 2 centimètres au niveau de la tranche de la section de manière à éviter les récurrences et assurer la guérison.

Lorsque les patients présentent de graves complications et ne réagissent pas aux différents traitements, une transplantation hépatique peut avoir lieu (Mantion *et al.*, 2008).

Les traitements médicamenteux et les méthodes alternatives

Le traitement médical par l'albendazole est effectué actuellement quelle que soit l'option thérapeutique envisagée. L'albendazole est un médicament qui agit directement sur le métaceste en bloquant le cycle du glucose ce qui les empêche d'en consommer.

L'effet d'un traitement continu reste en général uniquement parasitostatique : l'albendazole permet de stabiliser les lésions en empêchant le métaceste de proliférer et le traitement doit être suivi à vie.

Compte tenu de la gravité des symptômes et de la limitation en termes de traitements, il est nécessaire de développer des mesures de prophylaxie (Mantion *et al.*, 2008).

d. La prophylaxie de l'échinococcose alvéolaire

Pour la prévention de la maladie, il est nécessaire de mettre en place des mesures simples pour qu'elles soient efficaces (Figure 10).

Figure 10 : Conseils de prévention de l'échinococcose alvéolaire
d'après (Entente de lutte interdépartementale contre les zoonoses, 2024)



Les œufs d'*Echinococcus multilocularis* sont très résistants et ni une congélation domestique ni aucun antiseptique ne peut les détruire. Il est préconisé de cuire les végétaux récoltés dans des zones d'endémie. Il est fortement déconseillé de toucher des renards même morts. En cas de contact indispensable avec l'animal, il faut porter des gants. Pour déparasiter les animaux domestiques seul le praziquantel est actif contre les vers.

Enfin, suivre des règles élémentaires d'hygiène de base comme le lavage des mains et la limitation des contacts excessifs avec les animaux familiers permettent de réduire les risques et de protéger de l'échinococcose alvéolaire et d'un grand nombre d'autres zoonoses (Mantion *et al.*, 2008).

C. Diagnostic de la maladie chez les hôtes définitifs

a. Diagnostic intestinal du parasite

Différentes techniques existent pour le diagnostic intestinal d'*Echinococcus multilocularis* chez le renard comme la technique SCT (Sedimentation and Counting Technique) de sédimentation et de comptage qui consiste à récolter le contenu de l'intestin de l'animal et d'évaluer la charge parasitaire totale. Bien que sensible à 100 % en théorie et considéré comme le gold standard, cette technique demeure longue et fastidieuse.

De manière à réduire les temps d'analyse et de lecture, une technique de « scraping intestinal » appelée IST (Intestinal Scraping Technique) a été développée. Elle consiste à racler à plusieurs endroits la muqueuse intestinale avec une lame en verre et à observer ce qui a été récolté. Cette technique permet de faciliter les études épidémiologiques à grande échelle mais s'avère moins sensible (Umhang *et al.*, 2011).

Actuellement, pour permettre un gain de temps encore plus important, une technique a été validée par le LNR : la SSCT (Segmental SCT) pour la recherche d'*Echinococcus multilocularis* chez le renard (Figure 11). Cette technique est basée sur la répartition hétérogène des vers dans l'intestin. L'intestin grêle est coupé en 5 segments égaux et l'analyse des segments 4 et 1 (ou 4 et 2) uniquement permet d'obtenir une sensibilité de 98,3 % (Umhang *et al.*, 2011).

Figure 11 : Principales étapes de la techniques SSCT (source personnelle)



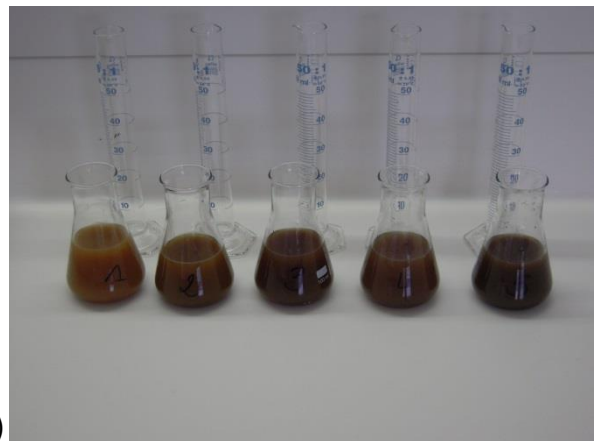
(a)



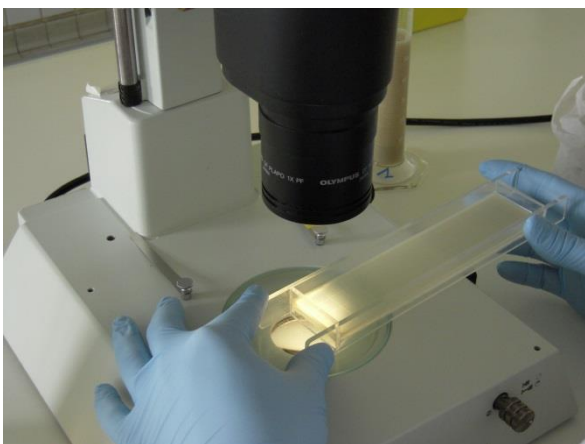
(b)



(c)



(d)



(e)

Légende :

- (a) : récupération de l'intestin de l'animal
- (b) : découpe de l'intestin en 5 segments égaux
- (c) : récolte du contenu des segments d'intestin
- (d) : contenu des 5 segments en attente de sédimentation
- (e) : observation sous loupe binoculaire des éventuels vers

b. Diagnostic coprologique du parasite

Le diagnostic coprologique permet de mettre en évidence le parasite dans les fèces des carnivores contaminés. L'avantage est que cette technique est non invasive pour l'animal.

Dans les années 1990, des tests ELISA de détection de copro-antigènes ont été développés. Cette technique présentait une sensibilité théorique de 95 % pour des animaux infectés avec plus de 100 vers. À l'heure actuelle, ces tests ne sont plus commercialisés en raison d'un manque de sensibilité et de spécificité (ANSES, Echinote 4, 2014).

L'alternative de la biologie moléculaire est possible avec la PCR pour laquelle deux approches sont possibles. Auparavant, avant d'effectuer une extraction d'ADN, il était nécessaire d'isoler les œufs des fèces par une étape de concentration des œufs par flottaison permettant de récolter les œufs de la famille des Taenidae. Ces œufs ne sont toutefois pas différenciables morphologiquement au niveau du genre c'est pourquoi seule la biologie moléculaire permet d'évaluer la présence d'*Echinococcus multilocularis*. Une PCR multiplex peut notamment permettre ensuite d'identifier simultanément les œufs d'*Echinococcus multilocularis*, d'*Echinococcus granulosus* et de *Taenia* spp (Trachsel *et al.*, 2007).

Actuellement, pour gagner en temps et en sensibilité, des techniques de copro-qPCR (PCR temps réel) ont été développées et ont permis d'incorporer un témoin d'inhibition à chaque réaction. A l'heure actuelle, un diagnostic par copro-qPCR à partir de l'ADN directement extrait des fèces pour évaluer la présence d'*Echinococcus multilocularis* constitue un examen de routine (Knapp *et al.*, 2016, 2014).

D. Diagnostic de la maladie chez les hôtes intermédiaires principaux

En ce qui concerne les hôtes intermédiaires, le diagnostic se fait généralement sur les animaux capturés ou tués à la chasse lors de l'autopsie par observation macroscopique de lésions hépatiques. Le diagnostic du genre *Echinococcus* peut se faire par observation des protoscolex contenus dans le liquide kystique mais l'identification de l'espèce nécessite obligatoirement d'autres approches notamment l'utilisation de la biologie moléculaire.

L'ADN est isolé de la masse parasitaire et le fragment d'intérêt est amplifié par PCR avec des couples d'amorces spécifiques d'*Echinococcus multilocularis*. L'utilisation de techniques de biologie moléculaire est indispensable étant donné que de nombreux cestodes dont certains *Taenidae* peuvent être confondus avec *Echinococcus multilocularis* à l'observation macroscopique du stade larvaire (Trachsel *et al.*, 2007).

De manière générale, le LNR a pour rôle de surveiller et d'étudier le rôle des animaux sauvages et domestiques dans la circulation des échinocoques. Une collaboration avec le CNR des échinococcoses du CHU de Besançon est en place de manière à partager les résultats observés sur la faune pour faire avancer la recherche de la maladie chez l'Homme.

Deuxième partie : travail expérimental

1. Présentation du laboratoire

L'Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) est un établissement qui résulte de la fusion réalisée en 2010 de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) et de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (AFSSET). L'établissement a pour but d'assurer des missions de veille, d'expertise, de recherche et de référence dans de nombreux domaines tels que la santé, le bien-être animal ainsi que la santé végétale.

L'agence est notamment composée d'une douzaine de laboratoires répartis sur le territoire français avec des spécialités bien définies pour chacun. L'unité INTERFAS (INfecTologie - Eco-épidémiologie - Risque - FAune Sauvage) du Laboratoire de la Rage et de la Faune Sauvage (LRFSN) est une unité multidisciplinaire de 23 personnes, située à Malzéville. Elle contribue, au travers de projets en propre et de collaborations nationales et internationales, à une meilleure connaissance de l'état sanitaire de la faune sauvage et à la compréhension de son rôle dans la circulation d'agents pathogènes (AP) notamment responsables de zoonoses ou de maladies affectant les animaux domestiques.

L'Unité porte plusieurs thématiques scientifiques (virologie-immunologie, virologie moléculaire, parasitologie, tiques et AP transmis par les tiques, épidémiologie) et des mandats de référence (Laboratoires nationaux de référence pour la rage et pour *Echinococcus* spp., Laboratoires de référence européens pour la rage et la sérologie rage).

Ses activités scientifiques ciblent notamment les virus de la rage, les échinocoques, les coronavirus, les tiques et agents pathogènes qu'elles vectorisent ainsi que *Mycobacterium bovis* (l'agent de la tuberculose bovine). Les espèces animales étudiées sont variées, avec des modèles expérimentaux et des études *in natura*.

Depuis 2010, grâce à des fonds européens, l'agence est équipée d'un laboratoire de niveau 3 d'une superficie de 450 m² dédié principalement aux études sur la rage et les coronavirus de la faune sauvage. Cette zone confinée permet de réaliser diverses activités : des pratiques autour des rongeurs en animalerie (prélèvements, autopsies, ...), des activités plus techniques de biologie moléculaire ou de sérologie, et des activités de recherche notamment en virologie.

Mon stage s'est déroulé dans le groupe Parasitologie de l'unité INTERFAS chargée, dans le cadre du mandat LNR (Laboratoire National de Référence) *Echinococcus* spp. de développements diagnostiques, ainsi que de l'épidémiologie descriptive et moléculaire de l'échinococcose alvéolaire (*E. multilocularis*) et kystique (*E. granulosus sensu lato*) principalement (« Laboratoire de la rage et de la faune sauvage de Nancy », 2023).

2. Présentation des études et de leurs objectifs

En 2017 à l'occasion d'un stage de fin de DUT (Diplôme universitaire et technologique) j'ai eu l'occasion de réaliser une étude pour effectuer un suivi de l'infestation par *Echinococcus multilocularis* sur les organes de la souris. En effet, il a été remarqué que chez des rongeurs sauvages, la présence du parasite ne se limitait pas qu'au foie : il arrive que des lésions macroscopiques soient présentes au niveau d'autres organes principalement les poumons. Plus précisément encore, l'ADN du parasite est parfois détecté au niveau du foie sans qu'aucune lésion ne soit visible. Il est possible de se demander si la présence du parasite précède seulement une lésion primaire encore non visible macroscopiquement ou bien s'il est possible que l'ADN soit présent dans des organes sans qu'aucune lésion n'apparaisse avec le temps. Il est également possible de se demander par quel moyen l'ADN du parasite se propage dans tout l'organisme. Ainsi, des prélèvements de tous les organes de souris infestées expérimentalement avaient été réalisés ainsi que des prises de sang à différentes périodes post-infestation ; et les échantillons ont été analysés pour évaluer l'éventuelle présence de l'ADN d'*Echinococcus multilocularis*. Toutefois, à l'époque, il n'était pas possible de mimer une infestation in vivo naturelle (ingestion d'œufs infectieux par la souris). De ce fait, les souris avaient été infestées par injection intrapéritonéale de matériel larvaire.

En 2022, j'ai eu l'opportunité de participer à nouveau à un travail expérimental avec le LRFSN, dans la continuité de l'étude de 2017. Les avancées des cinq dernières années ont ainsi permis de réaliser une infestation proche de l'infestation naturelle. Des œufs d'*Echinococcus multilocularis* ont été isolés à partir de fèces de renards de la station expérimentale carnivores du LRFSN. Ces œufs infectieux sont alors ingérés par les souris via une méthode de gavage œsophagien. Des lots de souris sont euthanasiés à 2, 3, 4 et 5 mois post-infestation et les organes sont prélevés. Les échantillons sont analysés pour évaluer l'éventuelle présence de l'ADN d'*Echinococcus multilocularis* mais également la variabilité éventuelle au sein d'un même groupe ou encore la variabilité de la présence de cet ADN au cours du temps pour un même organe.

Une autorisation pour l'utilisation des animaux à des fins scientifiques a été accordée par un comité éthique du Ministère chargé de la recherche dans le cadre de cette étude.

3. Matériels et méthodes

A. Organisation des locaux

- Locaux de biologie moléculaire :

De manière à limiter au maximum les risques de contamination, les étapes relatives aux manipulations en biologie moléculaire sont séparées dans l'espace.

Les manipulations dites « pré-PCR » c'est-à-dire l'extraction d'ADN, la préparation du mélange réactionnel et l'ajout de l'ADN extrait sont réalisées au rez-de-chaussée du laboratoire (**Annexe 1** salles 204, 231 et 212). Les étapes de « pré-PCR » sont toutes les étapes réalisées avant que l'ADN soit amplifié. Les manipulations de qPCR sont réalisées dans une salle à part au rez-de-chaussée (**Annexe 1** salle 211). Ceci est possible puisque les échantillons amplifiés par qPCR ne sont pas manipulés (ouverts) après réaction.

Les manipulations de PCR classique c'est-à-dire de « post –PCR » lorsque les échantillons sont amplifiés sont réalisées au premier étage (**Annexe 1** salle 309).

Chaque salle nécessite le port d'équipements de protection individuelle (EPI) et la marche en avant est respecté dans l'intégralité des salles (progression logique du plus sain au plus contaminé sans retour en arrière).

Une telle séparation dans l'espace permet de séparer les manipulations et d'éviter de contaminer les échantillons. Cela permet également d'avoir des espaces de stockage des échantillons propres aux différents stades de la manipulation ; les échantillons contenant de l'ADN ne sont pas stockés aux côtés des réactifs.

- Laboratoire niveau P3 :

La définition réglementaire d'un laboratoire de niveau P3 est la suivante : « Un laboratoire P3 est un laboratoire confiné dans lequel sont analysés des agents pathogènes de classe 3, i.e. des micro-organismes qui peuvent provoquer une maladie grave chez l'homme mais pour lesquels il existe une prophylaxie ou un traitement efficace (ex : rage, SARS-Cov2) » (CNR échinococcose).

En pratique, les manipulations dans le P3 du LRFSN nécessitent une formation, une vaccination contre la rage à jour et le port d'équipements de protections spécifiques (aucun vêtement personnel, combinaison intégrale, plusieurs paires de gants jetables, visière, masque...). Une douche intégrale est également obligatoire avant la sortie.

B. Protocole d'infestation par voie intrapéritonéale (2017)

BUT : Cette étude avait pour but de suivre au fil du temps la présence potentielle d'*E. multilocularis* au sein des différents organes de la souris lors d'une infestation par injection intrapéritonéale de matériel larvaire.

PRINCIPE : Le matériel larvaire utilisé pour l'injection a été obtenu grâce à des souris infestées par voie intrapéritonéale pendant plusieurs semaines. En effet, une souche d'*E. multilocularis* obtenue avec du matériel parasitaire de rongeurs sauvages a été maintenue pendant plusieurs années chez des souris de l'animalerie du laboratoire P3.

Quarante souris ont été infestées par injection intrapéritonéale d'une solution de masse parasitaire obtenue à partir de souris de cette souche.

MODE OPERATOIRE :

Deux souris infestées depuis plus d'un mois ont été euthanasiées par dislocation cervicale. L'abdomen était ouvert ainsi que le péritoine et toutes les lésions parasitaires visibles étaient prélevées. Ces lésions étaient soit présentes sous formes de microkystes au niveau du foie ou de la peau au niveau de la zone d'injection, soit « libres » dans la cavité abdominale.

Au total sur les deux individus, 4,04g de lésions ont été obtenus et broyés avec un pilon et une passoire afin de vider les kystes de leur contenu. Cette étape a été renouvelée avec ajout de PBS 1X stérile jusqu'à que le broyage soit total. Au total, 40 mL de solution de broyat ont été récupérés.

Chacune des 40 souris était infestée avec 0,8 mL de solution parasitaire. Du jour de l'infestation (J0) jusqu'à 6 mois post infection une euthanasie d'un lot de quatre souris a été réalisé aux fréquences suivantes : J0 (2 souris témoins), 1 semaine, 2 semaines, 3 semaines et 4 semaines. Les échantillons des autres souris ne seront pas inclus dans cette étude.

Chaque semaine, les souris euthanasiées étaient sorties du laboratoire P3, avant dissection les souris étaient pesées et prises en photo pour évaluer la répartition parasitaire si elle était visible (déformation abdominale).

La dissection pour récupérer les organes (Figure 12) doit être méticuleuse pour ne pas contaminer accidentellement les organes entre eux. Pour cela, un jeu unique de pince fine et de ciseaux fins a été attribué à chaque organe.

Les prélèvements étaient réalisés dans un ordre précis allant de l'organe potentiellement le moins contaminé au plus contaminé : peau, cerveau, poumon, cœur, rate, rein, intestins, vessie, foie, masse parasitaire (lorsqu'il y en avait). Chaque prélèvement était pesé pour

obtenir 20 ± 3 mg afin d'essayer d'évaluer quantitativement par qPCR l'infestation des organes.

Une extraction d'ADN a été effectuée sur chacun de ces prélèvements et soumis à une qPCR afin d'identifier la présence éventuelle d'ADN d'*E. multilocularis*.

Figure 12 : Photographies illustrant l'étape de récupération des organes de souris (source personnelle)



C. Protocole d'infestation par voie orale (2022-2023)

a. Protocole de récupération d'œufs d'*E. multilocularis*

BUT : Produire et collecter des œufs d'*Echinococcus multilocularis* via l'hôte définitif qu'est le renard roux (*Vulpes vulpes*).

MODE OPERATOIRE : Les renards évoluent dans la station expérimentale carnivores du laboratoire. Ils ont tout d'abord été soumis à un protocole de vermifugation au praziquantel (opération répétée 2 fois à 48 heures d'intervalle). Les renards « sains » ont été séparés des renards infestés dans des zones bien délimitées. Afin de réaliser l'infestation, les renards ont été soumis à une anesthésie fixe par injection intra-musculaire de chlorhydrate de

médétomidine à 80-100 µg/kg (DOMITOR®, Vetoquinol), une intubation œsophagienne puis une préparation de protoscolex d'*Echinococcus multilocularis* était alors injectée directement dans l'estomac. Les animaux ont été reversés avec un volume d'Atipamézole équivalent à celui du chlorhydrate de médétomidine. Le cycle parasitaire était alors initié, avec le développement de la forme adulte du parasite dans les intestins et la production d'œufs dans les selles (au bout de 30 jours). Une collecte quotidienne de fèces était alors réalisée et celles-ci étaient conservées à 4°C. Les fèces de J28 à J35 ont été soumises à un protocole d'isolation et concentration des œufs.

Cette technique consiste à prélever 5g de matière fécale et de les mélanger avec 50mL d'eau distillée dans un mortier. Après broyage avec un pilon, la matière fécale est filtrée sur un filtre nylon de maille 120µm afin d'éliminer les gros débris. Le filtrat est ensuite lavé en répétant plusieurs centrifugations après lesquelles le surnageant est éliminé puis le tube complété jusqu'à 50 mL avec de l'eau distillée. Après au moins 5 lavages, une partie du culot est déposée sur une boîte de Petri et observée sous loupe binoculaire. Les fèces contenant le plus d'œufs vont permettre d'isoler individuellement les œufs afin de constituer un pool. Après un dernier lavage, la solution est stockée dans du PBS 1X. Une solution de 300 µL contenant 500 œufs est préparée pour chacune des souris à infester.

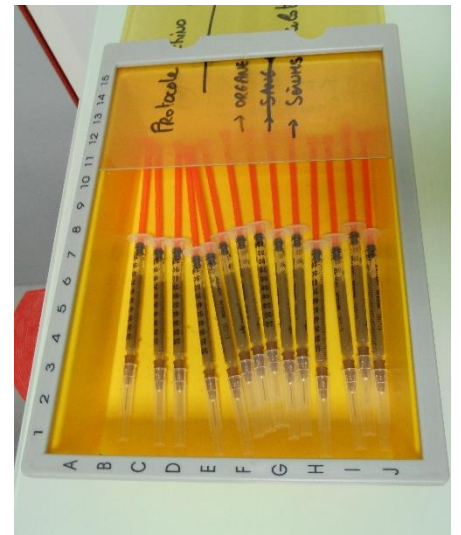
b. Protocole d'infestation orale de souris dans le P3

BUT : La procédure visait à infester par voie orale des souris avec des œufs embryonnés d'*Echinococcus multilocularis* obtenus à partir de fèces de renard infecté par la forme adulte du parasite, afin de reproduire au plus près le cycle de développement de la phase larvaire.

MODE OPERATOIRE : 25 souris de la souche Swiss EOPS (réceptionnées le 29/11/2022) ont été infectées vigiles par voie orale le 6 décembre 2022 à l'aide d'une sonde de gavage œsophagienne, avec une suspension de 500 œufs d'*E. multilocularis*, représentant un volume de 0,3 mL. Cette étape de manipulation d'œufs vivants d'*E. multilocularis* était réalisée en zone P3 (figure 13). Les 25 souris étaient également pesées, séparées en 5 lots de 5 souris, et chacune marquée d'une couleur de façon à pouvoir les différencier par la suite au sein d'un lot.

Les différentes étapes sont présentées dans les photographies suivantes (Figure 13) :

Figure 13 : Etapes de l'infestation orale des souris



(a)

(b)



(c)



(d)



(e)

Légende :

- (a) : matériel nécessaire à la manipulation
- (b) : seringues de gavage (1mL dont 0,3 mL étaient inoculés)
- (c) : étape de gavage
- (d) : étape de marquage coloré
- (e) : équipements de protection dans le P3

c. Protocole de suivi de la présence macroscopique d'*E. multilocularis* au sein des organes de la souris

BUT : Cette étude avait pour but de suivre au fil du temps la présence d'*E. multilocularis* au sein des différents organes de la souris lors d'une infestation par voie orale d'œufs du parasite.

MODE OPERATOIRE :

Quatre lots de cinq souris ont été euthanasiés à 2, 3, 4 et 5 mois post infestation, respectivement. Les souris destinées à l'euthanasie à 6 mois post-infestation ont été euthanasiées à 5 mois pour raisons médicales (signes de faiblesse, anorexie, abdomen aigu).

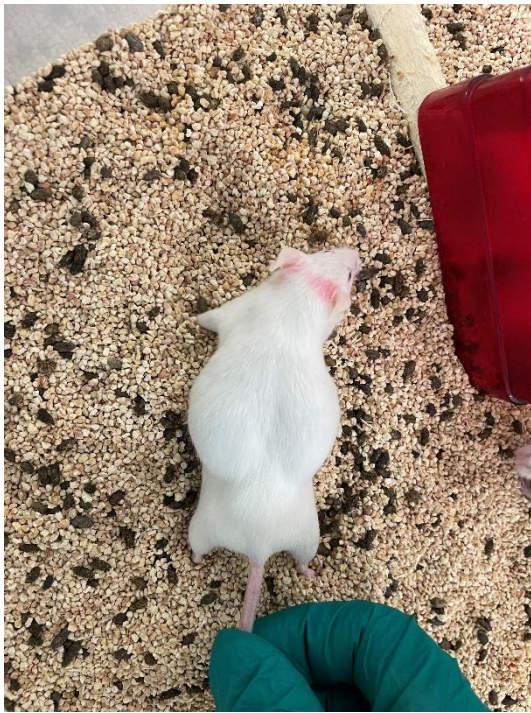
Le jour de la mise à mort, les souris étaient préalablement anesthésiées à l'isoflurane, puis par injection intra-péritonéale d'un mélange kétamine/xylazine (2 fois 0,1 mL) et une prise de sang totale par voie intracardiaque était réalisée. Une analgésie par buprénorphine était pratiquée avant de procéder à la thoracotomie.

La dissection pour récupérer les organes a été réalisée de la même façon qu'en 2017 mais cette fois dans le P3 directement.

Les prélèvements étaient réalisés dans un ordre précis allant de l'organe potentiellement le moins contaminé au plus contaminé : sang, peau, cerveau, poumon, cœur, rate, rein, intestins, vessie, foie, masse parasitaire (lorsqu'il y en a). Chaque prélèvement était pesé pour obtenir 20 ± 3 mg d'échantillon.

Une extraction d'ADN a été effectuée sur chacun de ces prélèvements et soumis à une qPCR afin d'identifier la présence éventuelle d'ADN d'*E. multilocularis*.

Figure 14 : Illustrations de différentes étapes réalisées dans le P3 (source personnelle)



(a)



(b)



(c)

Légende :

- (a) : souris rouge du mois 4, photo ante-mortem
- (b) : étape de prélèvement des échantillons
- (c) : souris rouge du mois 4, photo post-mortem
- (d) : étape de pesée des échantillons



(d)

D. Biologie moléculaire : identification et suivi de la détection de l'ADN d'*E. multilocularis* dans les organes de la souris

Entre 2017 et 2023, les techniques de biologie moléculaire sont restées les mêmes dans le fond mais présentent des différences dans la forme (nouvel automate d'extraction d'ADN, nouveaux logiciels, ...)

La dichotomie entre ces deux périodes est présentée dans la suite de l'étude.

a. Lyse des échantillons, extraction/purification de l'ADN

BUT : extraire l'ADN du parasite contenu dans les organes de rongeurs afin de préparer les échantillons pour la PCR.

MODE OPERATOIRE : L'extraction d'ADN génomique est réalisée grâce à une procédure automatisée qui consiste à extraire l'ADN à l'aide de billes magnétiques. Cette extraction se fait grâce au kit d'extraction iPrep™ ChargeSwitch® gDNA Tissue (2017) ou au kit d'extraction Maxwell RSC 48™ Blood DNA Kit (2023).

- Lyse et séparation des impuretés des échantillons

Infestation intrapéritonéale (2017) : L'extraction de l'ADN se fait à partir d'échantillons d'organes (peau, cerveau, poumon, cœur, rate, rein, intestin, vessie, foie) et de lésions parasitaires. Pour un suivi quantitatif du parasite, 20 ± 3 mg sont prélevés. Les échantillons sont conservés dans des tubes eppendorfs de 1,5 mL puis 1 mL de tampon de lyse et 10 μ L de RNase sont ajoutés dans le tube. Les tubes sont incubés 10 minutes à température ambiante afin d'initier la lyse. Par la suite, 20 μ L de protéinase K sont ajoutés et les échantillons sont incubés 2 heures à 55°C sous agitation orbitale à 800 rpm.

Infestation orale (2023) : L'extraction de l'ADN se fait partir d'échantillons d'organes (peau, cerveau, poumon, cœur, rate, rein, intestin, vessie, foie) mais aussi de sang et de lésions parasitaires quand elles sont présentes. Un morceau de 10 à 20 mg de tissu est prélevé et conservés dans un tube eppendorf de 1,5 mL. Sont ajoutés 30 μ L de protéinase K puis 300 μ L de tampon de lyse. Après passage au vortex, le mélange est incubé 1 heure à 56°C sous agitation. Les tubes sont ensuite centrifugés 1 minute à 10 000g pour culoter les restes de la lyse.

- Extraction automatisée de l'ADN génomique

Infestation intrapéritonéale (2017) : L'automate iPrep™ est préparé pour l'extraction : les barrettes contenant les différents réactifs nécessaires à l'extraction sont déposées dans

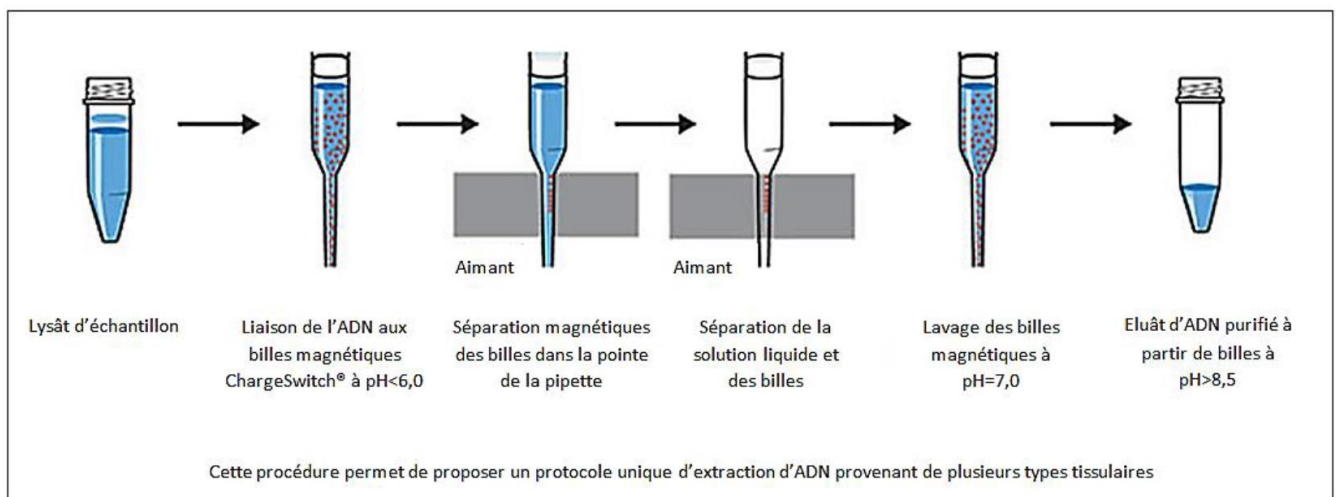
l'appareil (1 barrette/échantillon) et des tubes iPrep vides de 1,5 mL pour la récupération de l'éluât sont disposés sur la ligne E (E= éluât). La ligne T2 de l'automate est remplie avec des pipettes spéciales à usage unique permettant de réaliser les différentes étapes de l'extraction. Une fois l'incubation de l'étape 1 achevée, les échantillons sont centrifugés 5 minutes à 20 000 rpm et le surnageant est récolté dans des microtubes iPrep™ de 1,5mL qui seront déposés sur la ligne S (S= sample) de l'appareil.

Les étapes d'extraction/purification de l'ADN sont réalisées par un automate iPrep™ grâce à un programme spécifique d'extraction d'ADN génomique à partir de tissus (Figure 15). La carte « gDNA tissue » est introduite dans l'appareil afin d'exécuter ce programme spécifique.

Après démarrage, le programme dure environ 32 minutes.

Les tubes contenant l'ADN extrait sont récupérés, fermés, et conservés -20°C.

Figure 15 : Principe de la procédure iPrep™ ChargeSwitch® gDNA Tissue (source : thermofisher.com)



Infestation orale (2023) : L'automate Maxwell™ est préparé pour l'extraction : les cartouches sont placées dans le plateau du Maxwell, le côté étiqueté vers l'extérieur du plateau, à l'opposé du tube d'éluat. La cartouche est soigneusement clipsée et l'adhésif aluminium retiré.

Un plongeur est inséré dans le puit n°8 de chaque cartouche et les tubes d'éluat de 0,5 ml à l'avant du plateau, bouchon ouvert. 100 µl de tampon d'éluat sont ajoutés dans chaque tube et la totalité du surnageant de l'étape de lyse est versé dans le puit N°1.

Le programme est lancé sur le logiciel via la tablette de commande et les plateaux sont alors introduits dans l'automate. A la fin du programme, les tubes contenant l'ADN extrait sont récupérés, fermés, et conservés à 4°C pour une utilisation rapide.

b. Protocole de PCR quantitative : qPCR-Em

Pour ne pas alourdir ce matériels et méthodes, seule la technique utilisée en 2023 est présentée (PCR temps réel par la méthode Taqman). La même technique avait été utilisée en 2017 mais avec un autre thermocycleur (Mastercycler®).

BUT : La qPCR-EmMGB permet la détection d'*E. multilocularis* par PCR en temps réel en présence d'un contrôle interne d'inhibition. Cette méthode permet de détecter l'ADN du parasite à partir d'échantillons de tissus.

PRINCIPE : La qPCR-EmMGB permet de détecter la présence d'ADN d'*E. multilocularis* polymérisé à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent Taqman.

La cible des amorces est un fragment du gène *rrnL* (gène mitochondrial spécifique d'*E. multilocularis*).

Un contrôle interne de qPCR basé sur la détection d'un plasmide exogène est présent de manière à identifier l'éventuelle présence d'inhibiteurs de PCR présents dans les échantillons. Ce plasmide est obtenu après construction artificielle afin d'être amplifié par le même couple d'oligonucléotides qu'*E. multilocularis* (pour avoir la même efficacité d'amplification) mais est détecté de manière spécifique par une sonde dédiée.

Si des inhibiteurs sont présents dans l'échantillon, le contrôle interne ne peut pas être détecté et les résultats obtenus pour l'échantillon en question ne seront pas validés.

MODE OPERATOIRE : La PCR en temps réel (qPCR) est réalisée grâce au thermocycleur RotorGene Q MDx (Qiagen).

- Quelques définitions préliminaires

- **Seuil de détection** : Le seuil de détection correspond au seuil au-delà duquel la variation en intensité de fluorescence suit une loi exponentielle. La ligne de seuil ou *threshold* doit être placée au-dessus du bruit de fond, de préférence au milieu de la partie linéaire (en affichage « échelle logarithmique ») commune à l'ensemble des courbes d'amplification.

- **Cycle seuil (Ct)** : Le Ct ou cycle seuil correspond au point de départ de la phase exponentielle d'augmentation de la fluorescence. Sa valeur correspond au nombre de cycles pour lequel l'intensité de la fluorescence a dépassé le seuil de détection. Plus la quantité initiale d'ADN cible dans la réaction de PCR est grande, moins il faut de cycles de PCR pour atteindre ce point.

- Etape 1 : préparation du Mix Réactionnel

Tableau 2 : Composition du Mix réactionnel (source : LRFSN)

MIX qEm SEQ	[initiale]	[finale]	Pour 1 tube (en µl)
M.M. Maxima Probe	2X	1X	10
EmMGB-F	20µM	1,9µM	1,9
EmMGB-R	20µM	1,9µM	1,9
EmMGB_P (FAM)	20µM	0,1µM	0,1
TQ-CI (Cy5)	20µM	0,1µM	0,1
CI-qEm (100 copies/µl)			1

Composition du M.M Maxima Probe ThermoFisher® :

- Taq Polymérase Hot Start
- dNTPs
- Mg²⁺ (cofacteur de la Taq polymérase)
- Tampon nécessaire au bon fonctionnement de la Taq polymérase

Séquences des sondes et des amorces Eurofins Genomics® :

Tableau 3 : Séquences des sondes et amorces de la qPCR-Em

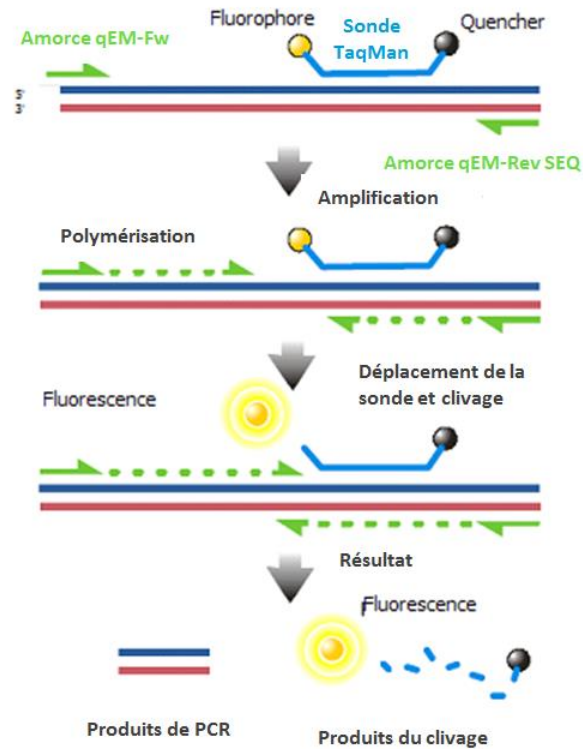
Oligonucléotides	Séquences (5'-3')	Marquage	
		extrémité 5'	extrémité 3'
EmMGB-F	GTGCTGCTYATAAGAGTTTTTG	-	-
EmMGB-R	CTATTAAGTCCTAAACAATACCATA	-	-
EmMGB_P (FAM)	ACAACAATATTCCTATCAATGT	FAM	MGB
Sonde TQ-CI	CAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCG	Cy5	BHQ3

Le couple d'amorces EmMGB-F/EmMGB-R permet d'obtenir des amplicons de 202 pb.

La sonde EmMGB_P est constituée du fluorophore FAM qui cible *Echinococcus multilocularis* et d'un quencher MGB qui permet de concevoir des sondes de qPCR plus courtes, mais très spécifiques. La sonde TQ-CI est constituée du fluorophore Cy5 qui cible le contrôle interne qEm SEQ et d'un quencher BHQ3.

Le quencher permet d'inhiber la fluorescence émise par le fluorophore lorsqu'il est excité par la source de lumière du thermocycleur (Figure 16).

Figure 16 : Principe de fonctionnement des sondes de qPCR
(source : programme pédagogique DUT MGB).



Ces sondes TaqMan sont conçues pour s'hybrider spécifiquement aux séquences d'intérêt. Lorsque la Taq polymérase synthétise le nouveau brin (3'-5') à partir de l'amorce, l'activité exonucléase de la polymérase dégrade la sonde déjà hybridée au brin matrice. Cette dégradation permet de relarguer le fluorophore ce qui le sépare dans l'espace de son quencher et la fluorescence est alors émise. L'appareil mesure la fluorescence émise à chaque cycle et celle-ci est proportionnelle au relargage du fluorophore et donc à la quantité d'ADN d'intérêt.

- Étape 2 : chargement de l'ADN (sous hotte)

Il est réalisé en salle de chargement sous hotte en ajoutant 5 μ L d'extrait d'ADN des échantillons ou des témoins à tester dans 15 μ L de mélange réactionnel avec contrôle interne.

A chaque série d'extraction, sont ajoutés en plus des témoins déjà présents :

- Témoin négatif d'amplification (absence de la séquence cible, T- mix) : constitué d'eau biologie moléculaire (en lieu et place de l'ARN).

- Témoin positif de PCR en limite de détection– Sentinelle d’amplification PCR (désigné FX+) qui permet de valider les étapes à partir de l’amplification et de valider la manipulation via la carte de contrôle associée.

- Étape 3 : lancement de la PCR sur le Rotorgene

Le mode opératoire est le suivant :

Tableau 4 : Conditions d’amplification de la PCR

Étape	Température	Temps	Nombre de cycles
Cycle d’activation de la polymérase	95°C	10 min	1
Dénaturation	95°C	15 sec	45
Hybridation	60°C	60 sec *	

* Lecture de fluorescence

Chaque PCR dure environ 1h et 30 minutes.

- Étape 4 : lecture et validation des différents témoins

Une réaction de PCR est considérée positive lorsqu’une fluorescence est émise au-dessus du seuil de détection avec une courbe d’amplification caractéristique. Une valeur de Ct est alors affectée à la réaction.

Dans le cas où l’interprétation de la présence d’une courbe d’amplification caractéristique est difficile, la réaction PCR concernant cet échantillon est répétée une nouvelle fois pur et si besoin dilué au 1/10ème.

La lecture des résultats est effectuée pour chaque cible en fonction de leur fluorochrome et avec une ligne de seuil (*threshold*) à déterminer lorsque le signal devient significativement supérieur au bruit de fond, en début de phase exponentielle. Ce *threshold* est à déterminer pour chaque analyse, la valeur courante est indiquée pour information entre parenthèses en fonction de la cible et du fluorochrome dédié :

- la cible EmSEQ (FAM) : lecture dans le canal Cycling A. **Green** (*threshold* : 0,03)
- la cible contrôle interne (CY5) : lecture dans le canal Cycling A. **Red** (*threshold* : 0,03).

La validation de la PCR est réalisée dans un premier temps en examinant les résultats des témoins selon le tableau suivant :

Tableau 5 : Tableau décisionnel d'interprétation des résultats de la PCR (source : LRFSN)

Témoin Positif		Contrôle Interne		Témoin négatif mix	Résultat		Action
EmFAM	CI.Cy5	EmFAM	CI.Cy5				
+	-	-	<37	-	Essai validé		Validation des échantillons possible
+	+/-	+	<37	+/-	Contamination possible	Essai non validé	Refaire la qPCR pour tous les échantillons
-	-	-	>37	-	Oubli ou mauvaise qualité d'un réactif / témoin	Essai non validé	Refaire la qPCR pour tous les échantillons
+	-	-	>37	-	Oubli ou mauvaise qualité du plasmide CI-qEm SEQ ou de la sonde TQ-CI		Refaire la qPCR pour tous les échantillons*
					Inhibition possible		
-	-	-	<37	-	Oubli ou mauvaise qualité des ADN témoins ou de la sonde TQ-Em		Refaire la qPCR pour tous les échantillons
-	-	+	Sans objet	+	Essai non validé		Refaire la qPCR pour tous les échantillons

+ : Emission de fluorescence au-dessus du seuil de détection (valeur de Ct<45 pour les échantillons et témoin positif)

- : Pas d'émission de fluorescence au-dessus du seuil de détection (aucune valeur de Ct, considérée >45)

4. Résultats

A. Infestation intra-péritonéale (2017)

Les résultats sont présentés dans le tableau 6.

Pour les deux souris témoins c'est-à-dire n'ayant pas été infestées, aucune trace de l'ADN d'*E. multilocularis* n'a été retrouvée.

Au bout d'une semaine, quatre souris ont été euthanasiées et l'ADN n'a été retrouvé que pour une souris (1.1) au niveau des reins (Ct* = 40) mais aucune lésion parasitaire macroscopique n'a été observée.

Au bout de 2 semaines, aucune lésion macroscopique n'est observée lors de l'autopsie chez les quatre souris euthanasiées mais trois d'entre elles (2.2, 2.3 et 2.4) présentent de l'ADN d'*E. multilocularis* dans leurs organes. La souris 2.2 était contaminée au niveau du foie (moyenne des Ct = 28), des reins (moyenne des Ct = 36) et de la rate (Ct*=35) et la souris 2.4 au niveau de l'intestin (Ct*=44). Quant à la souris 2.3, plusieurs organes de la cavité abdominale étaient touchés : le foie (Ct*=43), la vessie (moyenne Ct = 36), les reins (moyenne Ct = 38) et la rate (Ct*=43). L'ADN parasitaire a également été détecté au niveau de la cage thoracique avec une présence d'ADN au niveau du cœur (Ct*=36). Une trace très faible (Ct* = 40) a été retrouvée au niveau du cerveau.

Au bout de 3 semaines, aucune souris ne présentait de lésion macroscopique et la présence de l'ADN d'*E. multilocularis* a pu être confirmée pour seulement un animal au niveau des reins.

Au bout de 4 semaines, une masse parasitaire a été observée au niveau du foie d'une souris (environ 2 mm de diamètre) et après les résultats d'analyse moléculaire, il y a eu confirmation qu'il s'agissait de lésions d'*E. multilocularis*.

* : échantillons positifs présentant une valeur de Ct en simplicité uniquement.

Concernant les analyses du culot sanguin et du sérum, aucune trace de l'ADN d'*E. multilocularis* n'a été retrouvée pour ces 4 premières semaines.

Au bout de 6 semaines, quatre souris ont été euthanasiées et autopsiées de manière à récupérer les différents organes. Chacune des quatre souris présentait des lésions au niveau du foie (environ 1 mm de diamètre). Pour deux d'entre elles, des lésions ont été observées soit libres dans la cavité abdominale soit prises dans le tissu adipeux. Pour l'une des souris, la présence d'une masse en sous-cutané visible avant ouverture de l'abdomen a été observée (Figure 17). Cette masse était située en regard de la zone d'injection intra-péritonéale. D'autres lésions multiples sont retrouvées dans la cavité abdominale jusqu'au diaphragme qui était lui-même atteint.

Les analyses de biologie moléculaire pour ces souris euthanasiées 6 semaines après infestation n'ont pas été effectuées à l'époque, la période de stage étant dépassée.

Figure 17 : Masse parasitaire d'une souris après 6 semaines d'infestation visible avant ouverture de l'abdomen (gauche) et après ouverture (droite), source personnelle



Tableau 6 : Récapitulatif des résultats de l'infestation intra-péritonéale des souris

Organe	Semaine après infestation						
	1 semaine	2 semaines				3 semaines	4 semaines
		S2.1	S2.2	S2.3	S2.4		
peau	/	/	/	/	/	/	/
cerveau	/	/	/	+	/	/	/
poumon	/	/	/	/	/	/	/
cœur	/	/	/	+	/	/	/
rate	/	/	+	+	/	/	/
rein	S 1.1	/	+	+	/	S 3.3	/
intestin	/	/	/	/	+	/	/
vessie	/	/	/	+	/	/	/
foie	/	/	+	+	/	/	/
masse parasitaire	/	/	/	/	/	/	S 4.4
culot sanguin	/	/	/	/	/	/	/
sérum	/	/	/	/	/	/	/
Total de souris positives	0/4	3/4				1/4	1/4

Légende : S 2.1 : souris 1 de la semaine 2

+ : échantillon positif

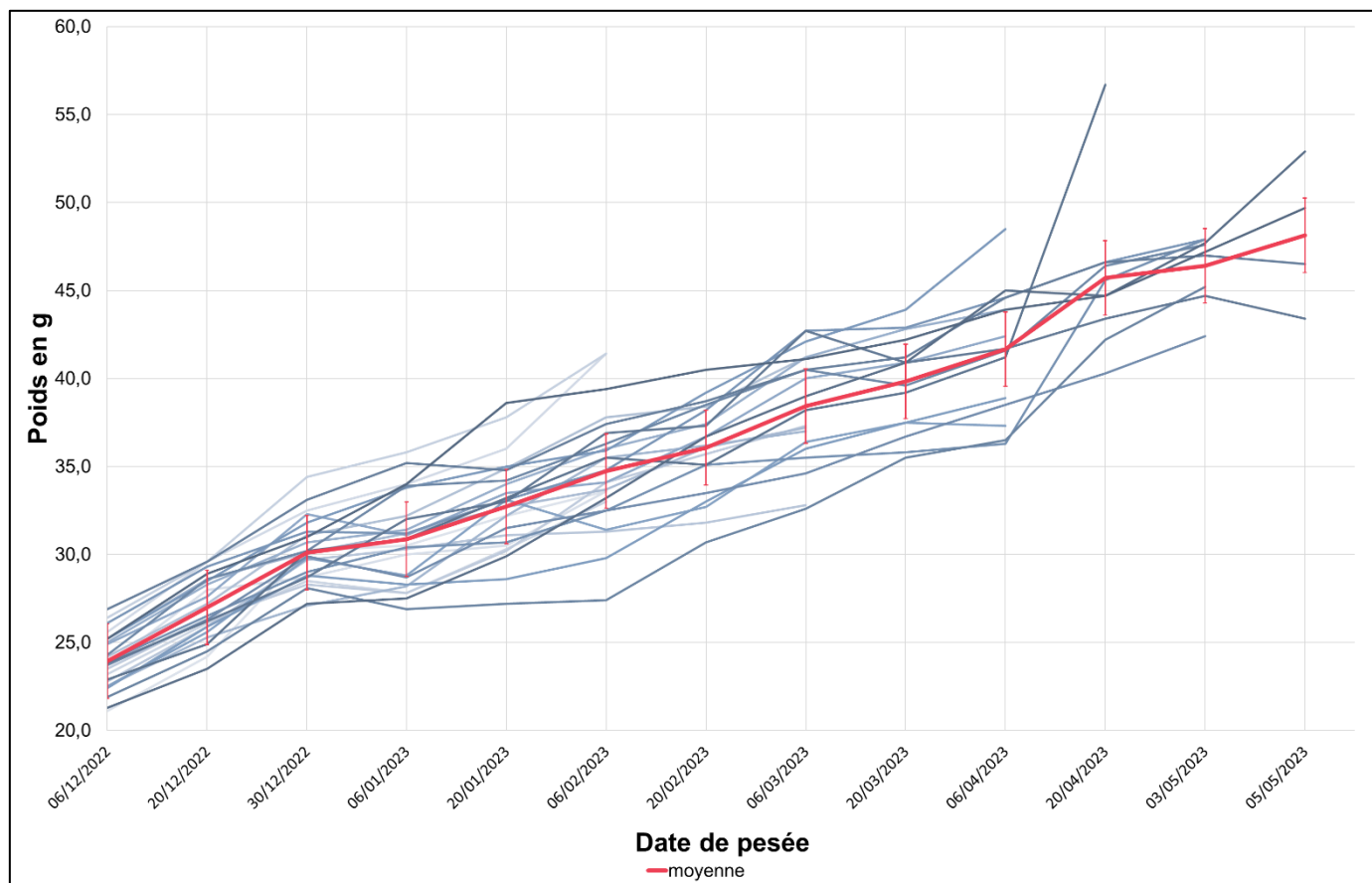
/ : échantillon négatif

B. Infestation par voie orale (2022-2023)

a. Evolution du poids vif des souris au cours du temps

Les souris sont pesées plusieurs fois par mois à l'aide d'une balance afin de pouvoir monitorer l'évolution de leur poids au cours du temps (figure 18).

Figure 18 : Evolution du poids des souris au cours du temps



Les interruptions des courbes correspondent aux dates des euthanasies des différents lots. On remarque une augmentation générale assez homogène du poids des souris en fonction du temps, la courbe moyenne présentant une augmentation linéaire.

Il est possible de se demander quels sont les facteurs intervenants dans cette prise de poids : croissance, augmentation de la masse grasseuse de l'animal en lien avec son alimentation, augmentation de la taille du foie (hépatomégalie) en lien avec la masse parasitaire ?

On remarque une différence morphologique au niveau du profil abdominal des rongeurs entre le jour de l'infestation et les mois qui suivent (figure 19).

Figure 19 : Exemple de différence de profil abdominal entre J0 et le 4^{ème} mois
(source personnelle)



b. Evolution de l'aspect macroscopique des foies au cours du temps

Aucune lésion macroscopique n'a été retrouvée ailleurs que sur les foies des souris au cours de cette expérience. L'évolution de l'aspect macroscopique des foies est présentée dans le tableau 7.

Pour rappel, le foie sain d'une souris présente une surface lisse ainsi qu'une texture et une coloration homogène (Figure 20)

Figure 20 : Aspect sain d'un foie de souris (Bastard, 2009)

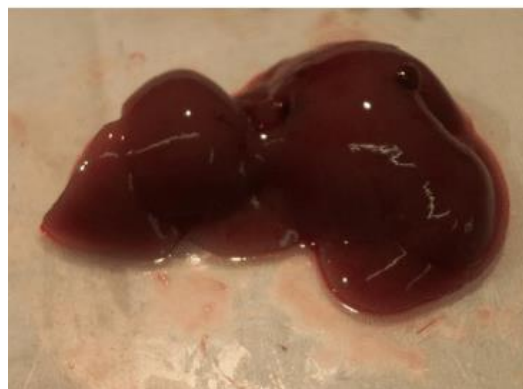





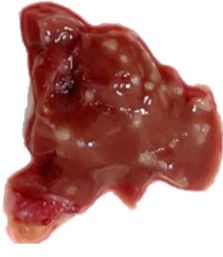


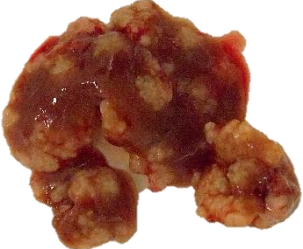












Tableau 7 : Evolution macroscopique des foies des souris au cours du temps
(source personnelle)

	2 mois	3 mois	4 mois	5 mois
Souris rouge		Échantillon non photographié		
Souris jaune				
Souris verte				
Souris bleue				
Souris noire				

Les images sont présentées avec une harmonisation d'échelle de façon à ne comparer que visuellement et simplement les foies lésionnels entre eux ; certains foies présentant en réalité un volume plus important que les autres. Des modifications de luminosité ont été apportées afin de mieux apprécier les images. Ces choix seront discutés par la suite.

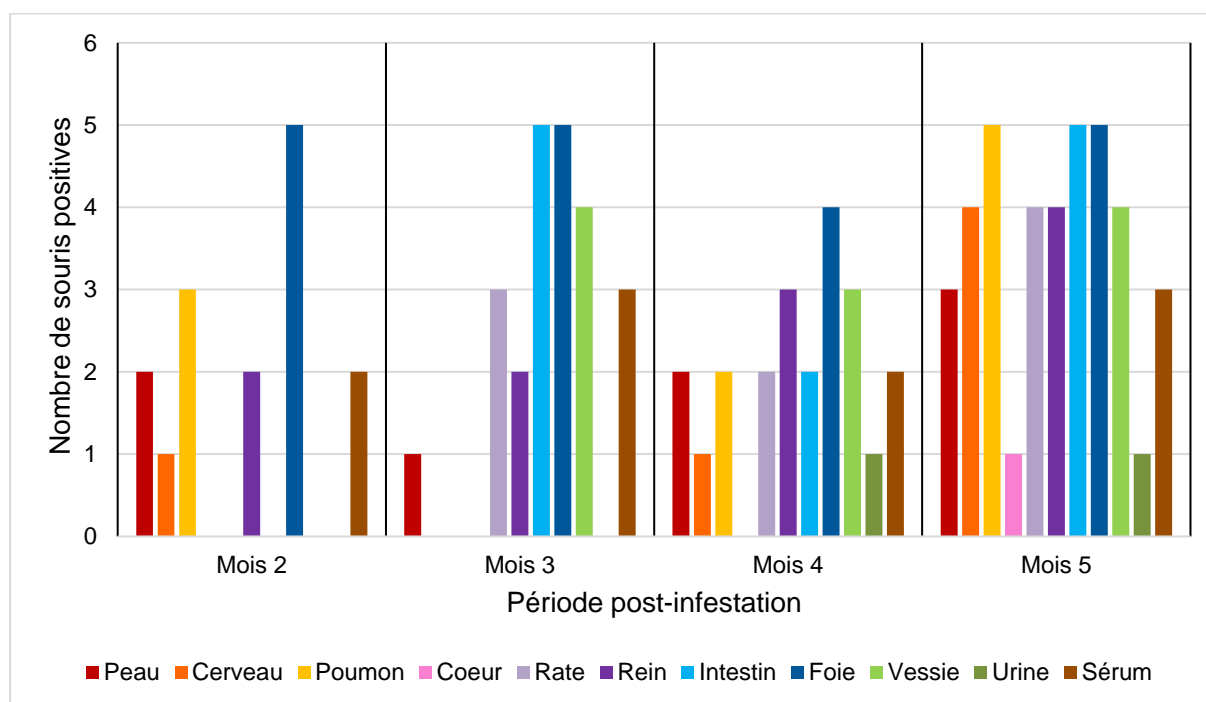
On remarque au cours de cette étude que des lésions d'aspect alvéolaire sont présentes dès le 2^{ème} mois. D'un point de vue purement descriptif, ces lésions semblent être de plus en plus nombreuses et volumineuses au fil des mois. Cependant, on observe une hétérogénéité de colonisation des foies par les lésions. Par exemple, le foie de la souris verte du 3^{ème} mois semble visuellement plus atteint que le foie de la souris verte du 4^{ème} mois. Il existe une hétérogénéité des lésions et donc de l'atteinte parasitaire des foies au cours du temps mais aussi au sein d'un même groupe. Néanmoins, on peut noter que 100 % des souris de l'étude ont présenté des lésions macroscopiques au niveau du foie.

c. Résultats de la détection de l'ADN d'*E. multilocularis* par qPCR à partir des différents organes

Les résultats bruts des qPCR sont présentés dans un tableau fourni en annexe (annexe 2).

La figure ci-dessous (figure 21) présente l'intégralité des résultats d'identification et de suivi de la présence d'ADN d'*E. multilocularis* au cours du temps.

Figure 21 : Proportion des organes contaminés au cours du temps



Cinq souris ont été euthanasiées respectivement au bout de 2, 3, 4 et 5 mois. Une souris du dernier lot (destiné au 6^{ème} mois) est décédée au bout de 5 mois, et les autres présentaient toutes un poids trop élevé ou des symptômes trop importants de parasitisme ; elles ont donc finalement été euthanasiées au bout de 5 mois.

Concernant l'allure générale d'apparition de résultats positifs, on remarque au cours du temps une augmentation du nombre d'organes positifs : 6 organes au bout de 2 mois, 7 au bout de

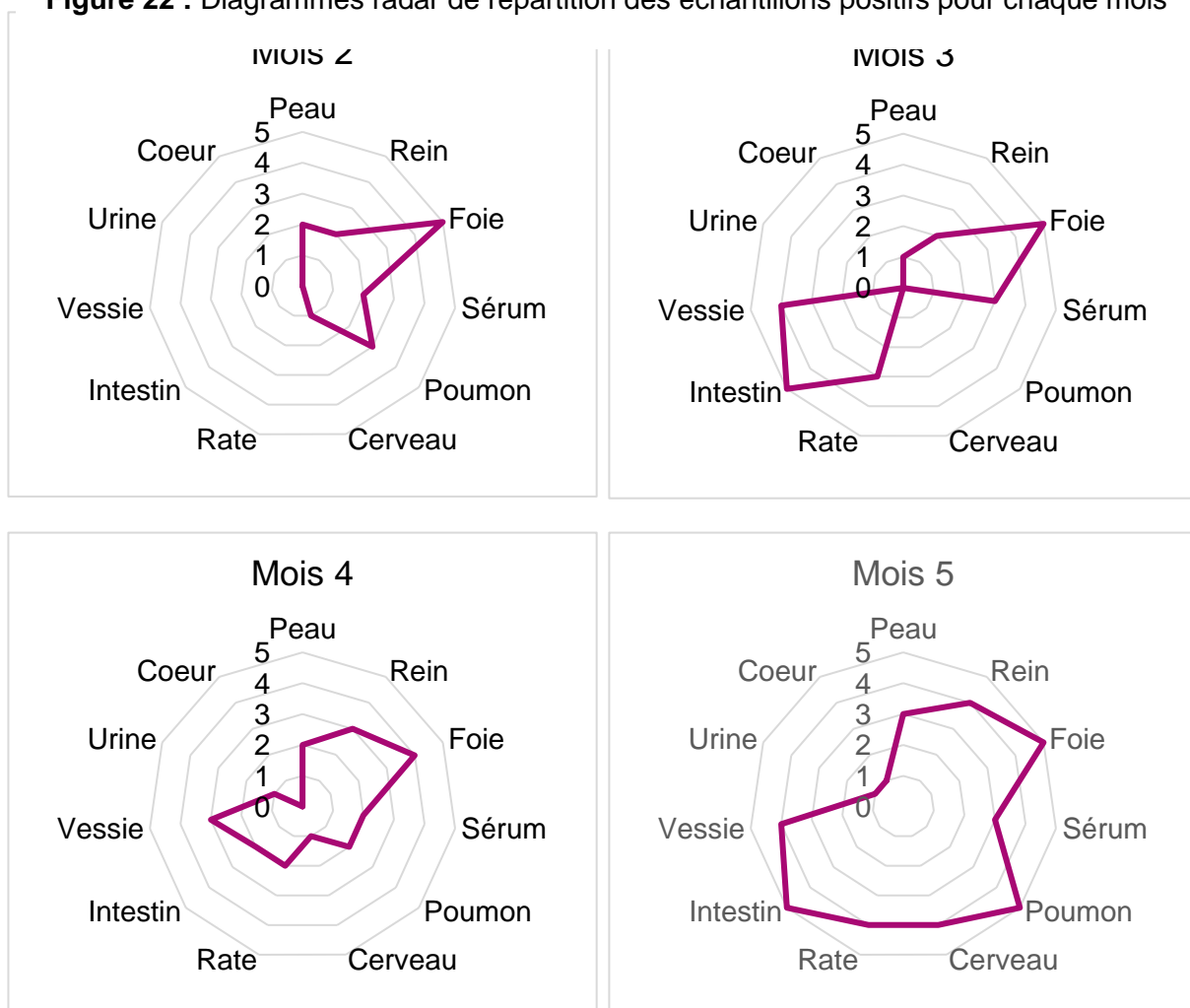
3 mois, 10 au bout de 4 mois, et 11 au bout de 5 mois soit la totalité des organes testés avec le sérum. Cependant, certains organes apparaissent positifs puis négatifs le mois d'après sans pouvoir y déterminer une expansion logique.

Concernant le foie, on remarque que 19 souris sur les 20 présentent un résultat positif, dont les souris du lot du 2^{ème} mois. Seule une souris du 4^e mois (la verte) présente un résultat négatif en duplicat.

Il est intéressant de noter que des sérums positifs en qPCR apparaissent dès le 2^{ème} mois mais que le cœur n'apparaît positif que pour une souris du dernier mois.

Il semble exister une hétérogénéité dans la positivité des résultats au sein des groupes mais aussi en fonction des mois, hétérogénéité déjà observée sur les lésions macroscopiques présentes au niveau hépatique. Afin d'illustrer plus visuellement cette hétérogénéité, des diagrammes radars sont présentés afin de mieux comparer les périodes entre elles (figure 22).

Figure 22 : Diagrammes radar de répartition des échantillons positifs pour chaque mois



L'hétérogénéité de la positivité des différents organes s'observe bien sur ces graphiques même si l'on observe un élargissement de la surface positive (surface violette) entre le début et la fin de l'étude. Le foie, les intestins, la vessie et les reins se démarquent tout de même comme les organes souvent positifs chez les souris avec respectivement 19/20 foies, 12/20 intestins, 11/20 vessies et 11/20 reins.

Lors des manipulations en qPCR, certains échantillons présentaient des résultats avec des valeurs de Ct hautes (>37) et parfois positives seulement en simplicité. Tous ces échantillons ont été repassés une seconde fois en qPCR de façon à donner un résultat final positif (au moins 2 positifs sur 4) ou négatif (1 seul positif sur 4).

5. Discussion

A. Infestation intra-péritonéale (2017)

D'après les résultats obtenus pour la présence d'*E. multilocularis* chez les souris infestées par voie IP, il est possible de supposer qu'au bout d'une semaine, le parasite n'a pas encore eu le temps d'atteindre les tissus et d'infester les organes (seule une souris présente une trace du parasite au niveau des reins avec une valeur de Ct élevée donc une faible quantité d'ADN). Au bout de 2 semaines, 3 des 4 souris étaient contaminées et parfois cela concernait même des organes éloignés de la zone d'injection (cœur, cerveau). Il est donc possible de se demander quel est le mode de cette dissémination du parasite aux différents organes. Les résultats obtenus pour les culots sanguins et les sérums ne permettent pas de dire que le parasite est disséminé par la circulation sanguine à ce stade. Il est possible de se demander si la présence d'*E. multilocularis* sera démontrée pour les semaines et mois suivants, lorsque l'infestation sera plus importante.

La troisième semaine ne révèle pas une infestation plus importante : le parasite n'était présent que dans un seul organe d'une souris. Au bout de 4 semaines, l'ADN du parasite n'est retrouvé dans aucun des organes. Cependant on observe une évolution dans la période d'infestation : cette fois le parasite était visible à l'autopsie et retrouvé sous forme de lésions accrochées au foie et au niveau de la zone d'injection.

Il est possible de se demander pourquoi le foie de cette souris (4.4) ne présente pas d'ADN du parasite puisque la lésion est située sur cet organe. En effet, notre étude expérimentale a consisté à infester des souris par infection intrapéritonéale ce qui n'est pas le mode d'infestation naturelle. Les rongeurs se contaminent normalement en ingérant des œufs d'*E. multilocularis* et les larves se développent au niveau du foie. Ici, il semble que la lésion qui s'est formée résulte d'un matériel infestant qui, libre dans la cavité abdominale, a pu s'accrocher au foie pour s'y développer.

Cette étude, réalisée en 2017, était le point de départ expérimental de la détection de l'ADN du parasite dans les différents organes de l'hôte intermédiaire. Elle présentait certes des limites, dont la principale étant que le mode d'infestation était loin de mimer une infestation naturelle. Il était donc important de pouvoir renouveler ces travaux dans des conditions plus proches de la réalité, ce qui a été possible dans le cadre de l'exercice de cette thèse.

B. Infestation par voie orale (2022-2023)

Dans un premier temps, et ce d'après les résultats obtenus, la manipulation expérimentale semble avoir correctement fonctionné. En effet, l'infestation par voie orale avec des œufs d'*E. multilocularis* est rarement effectuée (Federer *et al.*, 2015) et c'est une première au LNR. Cette manipulation nécessite de disposer d'œufs d'*E. multilocularis* infectieux, d'une animalerie de niveau P3 et d'une autorisation d'un comité d'éthique.

Des lésions hépatiques macroscopiques ont été observées chez 100 % des souris de l'étude. Pour ce qui est de la présence de matériel génétique, seule une souris euthanasiée lors du mois 4 présentait un résultat négatif pour l'intégralité de ses organes, alors même que des lésions macroscopiques hépatiques étaient présentes. Les autres souris, et cela, peu importe le mois, présentaient au moins un organe positif en PCR. Cette expérience a donc permis de confirmer pour la première fois qu'il était possible de retrouver de l'ADN d'*E. multilocularis* dans les organes de l'hôte intermédiaire après une infestation par voie orale.

Concernant l'apparition de lésions macroscopiques, celle-ci étaient déjà présentes au bout de 2 mois lors de la première série d'euthanasies. Il aurait été intéressant d'observer l'apparition des lésions avant ces 2 mois, mais cela aurait nécessité un nombre plus important d'individus et de manipulations. Également, de façon à comparer avec plus d'exactitude les foies entre eux, il aurait été pertinent de créer une échelle des lésions allant d'un foie sain au foie dépourvu de zone saine. Ce développement de lésions hépatiques soulève également la question de la quantité d'œufs ingérés à J0 ; la quantité de 500 œufs n'est-elle pas trop importante ? Un rongeur sauvage ingère-t-il réellement autant d'œufs en conditions réelles ? Une étude de comparaison de l'apparition de lésions macroscopiques en fonction de la quantité d'œufs ingérés pourrait être envisagée.

D'autre part, concernant les résultats en biologie moléculaire, plusieurs points surprenants ont été observés. En effet, il existe une variabilité de l'infestation des différents organes au cours du temps (cas du poumon ou de l'intestin par exemple). Certes, le suivi de la présence d'ADN au cours du temps ne s'est pas fait sur le même individu mais on aurait pu s'attendre à ce qu'un organe positif dès le 2^{ème} mois le soit également au 3^{ème} mois puis au 4^{ème}, ce qui n'a

pas été le cas. Cette variabilité observée suggère-t-elle que la présence de l'ADN d'*E. multilocularis* est transitoire dans les organes ? A-t-on une libération d'ADN à un moment-donné de la journée en particulier ou lors d'un éventuel stress ?

On observe également une grande variabilité lésionnelle ou moléculaire au sein d'un même groupe, ce qui est surprenant. Les souris utilisées pour cette étude sont identiques d'un point de vue génétique et immunitaire. Cette variabilité est-elle dû aux œufs directement ? On aurait pu penser qu'avec une telle quantité d'œufs, les résultats observés seraient assez semblables, ce qui n'est pas le cas. Pour plus de précision, un suivi moléculaire de la présence d'ADN d'*E. multilocularis* pourrait être envisagé sur un même individu au cours du temps avec la réalisation de prélèvements biopsiques au niveau des organes. Compte tenu de la taille et de la fragilité du modèle qu'est la souris, ce suivi ne semble pas réalisable à l'échelle des organes. Cependant, un suivi sanguin, urinaire ou fécal est possible.

Enfin, cette étude a montré la présence d'ADN d'*E. multilocularis* dans les différents organes de la souris au cours du temps, sans présence de lésion macroscopique associée (sauf pour le foie). Il est possible de se demander quelle est la nature de cet ADN et quel est son rôle ? Des lésions macroscopiques avaient été retrouvées en 2017 dans d'autres organes que le foie mais il s'agissait très probablement de lésions dû à l'infestation intra-péritonéale. Il semble donc que cet ADN circulant (probablement sous la forme de cellules ou de fragments cellulaires) n'aurait pas conduit à l'apparition de lésions dans notre étude. Néanmoins, la présence de matériel génétique dans des organes tels que le cerveau (passage de la barrière hémato-encéphalique) montre bien qu'il existe une diffusion très probablement sanguine au niveau de l'organisme de l'hôte intermédiaire.

Cette étude est novatrice dans le domaine. En effet, il n'existe à l'heure actuelle dans la littérature aucune étude de ce type permettant de comparer les résultats obtenus.

Conclusion

L'échinococcose alvéolaire est une zoonose grave, potentiellement mortelle pour laquelle le diagnostic en médecine humaine est aujourd'hui tardif. Une longue période asymptomatique est observée et représente un frein à une prise en charge rapide des patients. Fort heureusement, des examens d'imagerie permettent dans de nombreux cas des découvertes fortuites de lésions bien qu'il n'existe pas à l'heure actuelle un traitement efficace dans 100 % des cas. Cette zoonose représente donc un intérêt certain tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire, a fortiori quand on prend la mesure de la place centrale du vétérinaire dans le concept One Health.

Les travaux expérimentaux réalisées au LRFSN en 2017 et en 2022-2023 ont été regroupés dans une seule et même étude dans le cadre de cette thèse.

Cette étude, avec sa version initiale de 2017 et sa version plus élaborée du protocole en 2022-2023, a permis de montrer que la présence d'ADN parasitaire peut être détectée dans différents organes lors d'une contamination par *E. multilocularis*. Il semble qu'il y ait des périodes plus propices au développement des lésions mais l'ADN peut être retrouvé en biologie moléculaire sans qu'aucune lésion ne soit visible à l'échelle macroscopique. De plus, il existe une grande variabilité de l'expression de cet ADN pour un même lot ou encore en fonction du temps.

Bien que le développement de lésions sur d'autres organes que le foie soit moins fréquent pour les cas humains d'échinococcose alvéolaire, il est intéressant de comprendre comment le parasite peut se disséminer au sein de l'organisme. Cette étude était donc une première étape dans le suivi de la présence du parasite aux niveaux des organes de l'hôte intermédiaire et servira de point de départ à d'autres études aux protocoles ambitieux par la suite.

Les travaux réalisés par le LNR *Echinococcus* spp. du LRFSN ont pour but de faire progresser la recherche sur l'échinococcose alvéolaire de manière à mieux comprendre cette maladie et de répondre aux difficultés de sa prise en charge en termes de diagnostic mais aussi en termes de traitements.

Liste des références bibliographiques

ANSES, Laboratoire de la rage et de la faune sauvage de Nancy (2014) Echinote, Bulletin d'information du laboratoire national de référence *Echinococcus spp.* N°4. [<https://www.anses.fr/en/system/files/Echinote4.pdf>] (consulté le 10/01/2024).

ANSES, Laboratoire de la rage et de la faune sauvage de Nancy (2023) *In Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.* [<https://www.anses.fr/fr/content/laboratoire-de-la-rage-et-de-la-faune-sauvage-de-nancy>] (consulté le 21/11/2023).

AUTIER, B. (2022) Physiopathologie de l'échinococcose alvéolaire : IL-33 et pistes thérapeutiques. These de doctorat. Rennes 1.

BASTARD, C. (2009) Quantitative transient elastography for the evaluation of the viscoelastic properties of biological tissues.

BOUÉ, F., COMBES, B., GIRAUDOUX, P., *et al.* (2010) *Echinococcus multilocularis* chez le renard et les carnivores domestiques : vers une nouvelle donne épidémiologique? *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* p. 24-26.

BRESSON-HADNI, S., ANGÈLE VUITTON, D. (2016) Echinococcose alvéolaire : actualités 2016. *Hegel* vol. 4, n° 4, p. 338-349. [<https://doi.org/10.4267/2042/61671>]

BRESSON-HADNI, S., DELABROUSSE, E., GRENOUILLET, F., *et al.* (2008) Echinococcose alvéolaire: comment affirme-t-on le diagnostic? *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* vol. 192, n° 6, p. 1141-1150. [[https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)32713-X](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)32713-X)]

BRESSON-HADNI, S., GRENOUILLET, F., CHAUCHET, A., *et al.* (2014) Diagnostic de l'échinococcose alvéolaire. *Revue Francophone des Laboratoires* vol. 2014, n° 464, p. 77-87. [[https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(14\)72578-X](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(14)72578-X)]

CHERMETTE, R., BUSSIÉRAS, R. (1993) Abrégé de parasitologie vétérinaire. Maisons Alfort, France, Service de parasitologie, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.

CNR Echinococcoses (s. d.). [<https://cnr-echinococcoses-ccoms.univ-fcomte.fr/>] (consulté le 04/12/2023).

COMBES, B., COMTE, S., RATON, V., *et al.* (2013) Expansion géographique du parasite *Echinococcus multilocularis* chez le renard en France. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* n° 57.

DEPLAZES, P., ECKERT, J. (2001) Veterinary aspects of alveolar echinococcosis — a zoonosis of public health significance. *Veterinary Parasitology* vol. 98, n° 1-3, p. 65-87. [[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00424-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00424-1)]

e-l-i-z.com (s. d.). [<http://www.e-l-i-z.com/>]

FEDERER, K., ARMUA-FERNANDEZ, M.T., HOBY, S., *et al.* (2015) In vivo viability of *Echinococcus multilocularis* eggs in a rodent model after different thermo-treatments. *Experimental Parasitology* vol. 154, p. 14-19. [<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.03.016>]

JACOBS, D.E., FOX, M., GIBBONS, L.M., *et al.* (2016) Principles of veterinary parasitology. Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ, John Wiley & Sons, Ltd.

- KNAPP, J., MILLON, L., MOUZON, L., *et al.* (2014) Real time PCR to detect the environmental faecal contamination by *Echinococcus multilocularis* from red fox stools. *Veterinary Parasitology* vol. 201, n° 1-2, p. 40-47. [<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.12.023>]
- KNAPP, J., UMHANG, G., POULLE, M.-L., *et al.* (2016) Development of a Real-Time PCR for a Sensitive One-Step Coprodiagnosis Allowing both the Identification of Carnivore Feces and the Detection of *Toxocara* spp. and *Echinococcus multilocularis*. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 82, n° 10, p. 2950-2958. [<https://doi.org/10.1128/AEM.03467-15>]
- Laboratoire de la rage et de la faune sauvage de Nancy (2023) . In *Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail*. [<https://www.anses.fr/fr/content/laboratoire-de-la-rage-et-de-la-faune-sauvage-de-nancy>] (consulté le 21/11/2023).
- LOSSON, B., HANOSSET, R. (2004) Épidémiologie de l'échinococcose multiloculaire en Europe. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* vol. 157, n° 4, p. 25-28. [<https://doi.org/10.4267/2042/47734>]
- MANTION, G., BRESSON-HADNI, S., VUITTON, D.-A., *et al.* (2008) Le traitement de l'échinococcose alvéolaire humaine: une approche multidisciplinaire. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* vol. 192, n° 6, p. 1151-1158. [[https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)32714-1](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)32714-1)]
- OKSANEN, A., SILES-LUCAS, M., KARAMON, J., *et al.* (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* vol. 9, n° 1, p. 519. [<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1746-4>]
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ, OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES (Éd.) (2001) WHO-OIE manual on echinococcosis in human and animals: a public health problem of global concern. Paris, OIE.
- PIARROUX, M., PIARROUX, R., GIORGI, R., *et al.* (2011) Clinical features and evolution of alveolar echinococcosis in France from 1982 to 2007: Results of a survey in 387 patients. *Journal of Hepatology* vol. 55, n° 5, p. 1025-1033. [<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.02.018>]
- ROMIG, T., DEPLAZES, P., JENKINS, D., *et al.* (2017) Ecology and Life Cycle Patterns of *Echinococcus* Species. *Advances in Parasitology* vol. 95, p. 213-314. [<https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.11.002>]
- THOMPSON, R.C.A. (2017) Biology and Systematics of *Echinococcus*. *Advances in Parasitology* vol. 95, p. 65-109. [<https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.07.001>]
- THOMPSON, R.C.A., LYMBERY, A.J., CONSTANTINE, C.C. (1995) Variation in *Echinococcus*: Towards a Taxonomic Revision of the Genus. In *Advances in Parasitology*. Elsevier, p. 145-175. [[https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60071-8](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60071-8)]
- TRACHSEL, D., DEPLAZES, P., MATHIS, A. (2007) Identification of taeniid eggs in the faeces from carnivores based on multiplex PCR using targets in mitochondrial DNA. *Parasitology* vol. 134, n° 6, p. 911-920. [<https://doi.org/10.1017/S0031182007002235>]
- UMHANG, G., BOUE, F. (2014) *Echinote* n° 4, p. 4.
- UMHANG, G., LAHOREAU, J., HORMAZ, V., *et al.* (2016) Surveillance and management of *Echinococcus multilocularis* in a wildlife park. *Parasitology International* vol. 65, n° 3, p. 245-250. [<https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.01.008>]
- UMHANG, G., WORONOFF-RHEN, N., COMBES, B., *et al.* (2011) Segmental Sedimentation and Counting Technique (SSCT): An adaptable method for qualitative diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in fox intestines. *Experimental Parasitology* vol. 128, n° 1, p. 57-60. [<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.01.004>]

VEIT, P., BILGER, B., SCHAD, V., *et al.* (1995) Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasitology* vol. 110, n° 1, p. 79-86. [<https://doi.org/10.1017/S0031182000081075>]

VUITTON, D.A., WANG, Q., ZHOU, H.-X., *et al.* (2011) A historical view of alveolar echinococcosis, 160 years after the discovery of the first case in humans: part 1. What have we learnt on the distribution of the disease and on its parasitic agent? *Chinese Medical Journal* vol. 124, n° 18, p. 2943-2953.

Annexes

Annexe 1 : organisation des locaux de biologie moléculaire

Les locaux sont structurés en plusieurs pièces regroupées en 3 grandes zones :

- Zone Propre : préparation du mix PCR
- Zone Pré-PCR : extraction et addition d'acides nucléiques au mix Réactionnel + PCR Temps Réel, synthèse d'ADN complémentaire
- Zone Post-PCR : amplification PCR en point final avec analyse des produits PCR.

	SALLE	N°	UTILISATION	EPI
ZONE PROPRE	MIX	231-232	Préparation des mélanges réactionnels d'amplification (Mix PCR)	Blouse dédiée, gants, manchettes si besoin
	Extraction	204	Extraction d'ADN et d'ARN (et dosage des acides nucléiques non amplifiés)	Blouse dédiée et gants
	Stock Froid	214	Stockage (ADN, ARN ...)	Blouse de circulation et gants
ZONE PRE-PCR	Chargement ADN/ARN	212-213	Ajout des acides nucléiques cibles dans les mélanges réactionnels	Blouse de circulation, gants, manchettes si besoin
	Sas	210	Sas - Zone de décontamination	Blouse de circulation et gants
	RT et PCR Temps Réel	211	RT et PCR en temps réel	Blouse de circulation et gants
	PCR et Séquençage	309	Amplification par PCR en point final, PCR nichée, analyse de fragments, pyroséquençage et séquençage	Blouse dédiée et gants
ZONE POST-PCR	Salle d'Analyse	308	Electrophorèse sur gel, photographie sur table UV et analyse du gel d'agarose	Blouse dédiée et gants
	Clonage	306-307	Clonage moléculaire, extraction de plasmide, transcription, dosage d'acides nucléiques amplifiés...	Blouse dédiée et gants

Le détail du port des EPI est décrit ci-après.



Annexe 2 : résultats bruts de l'étude

Date de l'autopsie	M	Couleur de la souris	Organe	Résultat final	Date d'extractio	Date qPCR EmMG	Résultats qPCR EmMG	CT qPCR EmMG	Passage 2 en qPCR emMGB	Résultats	CT
06/02/2023	M2	Vert	Peau	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Cerveau	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Poumon	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Coeur	-	27/06/2023	27/06/2023	+/-	37,98 et -	28/06/2023	-	
06/02/2023	M2		Rate	-	16/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Rein	-	16/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Intestin	-	16/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Vessie	-	16/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Foie	+	16/06/2023	27/06/2023	+	31,92 et 33,05			
06/02/2023	M2		Urine	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2	Bleu	Peau	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Cerveau	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Poumon	-	27/06/2023	27/06/2023	+/-	37,38 et -	28/06/2023	-	
06/02/2023	M2		Coeur	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Rate	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Rein	-	27/06/2023	27/06/2023	+/-	36,44 et -	28/06/2023	-	
06/02/2023	M2		Intestin	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Vessie	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Foie	+	27/06/2023	27/06/2023	+	28,56 et 28,76			
06/02/2023	M2		Urine	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2	Rouge	Sérum	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Peau	+	16/06/2023	27/06/2023	+	28,5 et 28,77			
06/02/2023	M2		Cerveau	+	16/06/2023	27/06/2023	+	32,27 et 32,16			
06/02/2023	M2		Poumon	+	16/06/2023	27/06/2023	+	32,78 et 32,04			
06/02/2023	M2		Coeur	-	16/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Rate	-	16/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Rein	+	16/06/2023	27/06/2023	+/-	36,61 et -	28/06/2023	+	35,58 et 37,39
06/02/2023	M2		Intestin	-	16/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Vessie	-	16/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Foie	+	16/06/2023	27/06/2023	+	34,65 et 32,63			
06/02/2023	M2	Urine	NA	Tube non trouvé							
06/02/2023	M2	Noir	Sérum	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Peau	-	16/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Cerveau	-	16/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Poumon	+	16/06/2023	27/06/2023	+	35,88 et 37,32			
06/02/2023	M2		Coeur	-	16/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Rate	-	16/06/2023	27/06/2023	+/-	36,18 et -	28/06/2023	-	
06/02/2023	M2		Rein	-	16/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Intestin	-	16/06/2023	27/06/2023	+/-	41,65 et -	28/06/2023	-	
06/02/2023	M2		Vessie	-	16/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Foie	+	16/06/2023	27/06/2023	+	32,32 et 32,86			
06/02/2023	M2	Jaune	Urine	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Sérum	+	27/06/2023	27/06/2023	+	27,75 et 27,53			
06/02/2023	M2		Peau	+	16/06/2023	27/06/2023	+	32,28 et 31,77			
06/02/2023	M2		Cerveau	-	16/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Poumon	+	16/06/2023	27/06/2023	+	32,82 et 31,77			
06/02/2023	M2		Coeur	-	16/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Rate	-	16/06/2023	27/06/2023	+/-	36,5 et -	28/06/2023	-	
06/02/2023	M2		Rein	+	16/06/2023	27/06/2023	+/-	37,38 et -	28/06/2023	+/-	37,42 et -
06/02/2023	M2		Intestin	-	16/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2		Vessie	-	16/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/02/2023	M2	Foie	+	16/06/2023	27/06/2023	+	28,52 et 28,79				
06/02/2023	M2	Urine	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/				
06/02/2023	M2	Sérum	+	27/06/2023	27/06/2023	+	26,12 et 26,03				
08/03/2023	M3	Vert	Peau	-	15/06/2023	15/06/2023	-	/			
08/03/2023	M3		Cerveau	-	05/04/2023	05/04/2023	+/-	38,51 et -	28/06/2023	-	
08/03/2023	M3		Poumon	-	05/04/2023	05/04/2023	+/-	36,36 et -	28/06/2023	-	
08/03/2023	M3		Coeur	-	15/06/2023	15/06/2023	-	/			
08/03/2023	M3		Rate	+	05/04/2023	05/04/2023	+	33,9 et 33,19			
08/03/2023	M3		Rein	-	15/06/2023	15/06/2023	-	/			
08/03/2023	M3		Intestin	+	05/04/2023	05/04/2023	+/-	34,89 et -	28/06/2023	+	37,09 et 37,08
08/03/2023	M3		Vessie	+	05/04/2023	05/04/2023	+/-	35,13 et -	28/06/2023	+	38,8 et 36,24
08/03/2023	M3		Foie	+	05/04/2023	05/04/2023	+	28,31 et 27,69			
08/03/2023	M3		Urine	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/			
08/03/2023	M3	Bleu	Sérum	+	27/06/2023	27/06/2023	+	29,62 et 29,72			
08/03/2023	M3		Peau	+	15/06/2023	15/06/2023	+	39,44 et 38,23			
08/03/2023	M3		Cerveau	-	05/04/2023	05/04/2023	-	/			
08/03/2023	M3		Poumon	-	05/04/2023	05/04/2023	-	/			
08/03/2023	M3		Coeur	-	15/06/2023	15/06/2023	-	/			
08/03/2023	M3		Rate	+	05/04/2023	05/04/2023	+	34,08 et 36,31			
08/03/2023	M3		Rein	+	15/06/2023	15/06/2023	+/-	38,34 et -	28/06/2023	+	35,98 et 35,67
08/03/2023	M3		Intestin	+	05/04/2023	05/04/2023	+	30,56 et 30,89			
08/03/2023	M3		Vessie	+	05/04/2023	05/04/2023	+	32,13 et 32,92			
08/03/2023	M3		Foie	+	05/04/2023	05/04/2023	+	20,82 et 20,58			
08/03/2023	M3	Urine	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/				
08/03/2023	M3	Rouge	Sérum	+	27/06/2023	27/06/2023	+	29,13 et 28,72			
08/03/2023	M3		Peau	-	15/06/2023	15/06/2023	+/-	38,59 et -	28/06/2023	-	
08/03/2023	M3		Cerveau	-	05/04/2023	05/04/2023	-	/			
08/03/2023	M3		Poumon	-	05/04/2023	05/04/2023	-	/			
08/03/2023	M3		Coeur	-	15/06/2023	15/06/2023	+/-	36,62 et -	28/06/2023	-	
08/03/2023	M3		Rate	-	05/04/2023	05/04/2023	-	/			
08/03/2023	M3		Rein	-	15/06/2023	15/06/2023	+/-	36,04 et -	28/06/2023	-	
08/03/2023	M3		Intestin	+	05/04/2023	05/04/2023	+	33,85 et 35,92			
08/03/2023	M3		Vessie	-	05/04/2023	05/04/2023	+/-	36,63 et -	28/06/2023	-	
08/03/2023	M3		Foie	+	05/04/2023	05/04/2023	+	24,45 et 24,29			
08/03/2023	M3	Urine	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/				
08/03/2023	M3	Noir	Sérum	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/			
08/03/2023	M3		Peau	-	15/06/2023	15/06/2023	+/-	36,76 et -	28/06/2023	-	
08/03/2023	M3		Cerveau	-	05/04/2023	05/04/2023	+/-	37,68 et -	28/06/2023	-	
08/03/2023	M3		Poumon	-	05/04/2023	05/04/2023	+/-	35,11 et -	28/06/2023	-	
08/03/2023	M3		Coeur	-	15/06/2023	15/06/2023	+/-	36,09 et -	28/06/2023	-	
08/03/2023	M3		Rate	-	05/04/2023	05/04/2023	+/-	36,39 et -	28/06/2023	-	
08/03/2023	M3		Rein	-	15/06/2023	15/06/2023	-	/			
08/03/2023	M3		Intestin	+	05/04/2023	05/04/2023	+	36,25 et 38,63			
08/03/2023	M3		Vessie	+	05/04/2023	05/04/2023	+/-	34,95 et -	28/06/2023	+	36,64 et 35,49
08/03/2023	M3		Foie	+	05/04/2023	05/04/2023	+	29,1 et 27,85			
08/03/2023	M3	Urine	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/				
08/03/2023	M3	Jaune	Sérum	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/			
08/03/2023	M3		Peau	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/			
08/03/2023	M3		Cerveau	-	05/04/2023	05/04/2023	+/-	37,26 et -	28/06/2023	-	
08/03/2023	M3		Poumon	-	05/04/2023	05/04/2023	-	/			
08/03/2023	M3		Coeur	-	27/06/2023	27/06/2023	+/-	36,36 et -			
08/03/2023	M3		Rate	+	05/04/2023	05/04/2023	+	33,4 et 33,8			
08/03/2023	M3		Rein	+	27/06/2023	27/06/2023	+	33,92 et 34,02			
08/03/2023	M3		Intestin	+	05/04/2023	05/04/2023	+	32,08 et 31,84			
08/03/2023	M3		Vessie	+	05/04/2023	05/04/2023	+/-	36,28 et -	28/06/2023	+	34,5 et 34,97
08/03/2023	M3		Foie	+	05/04/2023	05/04/2023	+	26,28 et 26,18			
08/03/2023	M3	Urine	-	27/06/2023	27/06/2023	+/-	36,07 et -	28/06/2023	-		
08/03/2023	M3	Sérum	+	27/06/2023	27/06/2023	+	28,93 et 29,02				

06/04/2023	M4	Vert	Peau	-	15/06/2023	16/16/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Cerveau	-	15/06/2023	16/16/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Poumon	-	15/06/2023	16/16/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Coeur	-	15/06/2023	16/16/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Rate	-	15/06/2023	16/16/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Rein	-	15/06/2023	16/16/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Intestin	-	15/06/2023	16/16/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Vessie	-	15/06/2023	16/16/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Urine	-	15/06/2023	16/16/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Sérum	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/04/2023	M4	Bleu	Peau	-	15/06/2023	16/16/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Cerveau	-	15/06/2023	16/16/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Poumon	-	15/06/2023	16/16/2023	+/-	38,13 et -			
06/04/2023	M4		Coeur	-	15/06/2023	16/16/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Rate	-	15/06/2023	16/16/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Rein	-	15/06/2023	16/16/2023	+/-	35,62 et -	28/06/2023	-	
06/04/2023	M4		Intestin	-	15/06/2023	16/16/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Vessie	-	15/06/2023	15/06/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Foie	+	15/06/2023	15/06/2023	+/-	38,34 et -	28/06/2023	+/-	37,25 et -
06/04/2023	M4		Urine	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/04/2023	M4	Sérum	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/				
06/04/2023	M4	Rouge	Peau	-	15/06/2023	15/06/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Cerveau	-	15/06/2023	15/06/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Poumon	+	15/06/2023	15/06/2023	+	33,34 et 33,65			
06/04/2023	M4		Coeur	-	15/06/2023	15/06/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Rate	+	15/06/2023	15/06/2023	+	25,84 et 25,84			
06/04/2023	M4		Rein	+	15/06/2023	15/06/2023	+	32,07 et 32,95			
06/04/2023	M4		Intestin	+	15/06/2023	15/06/2023	+	26,07 et 25,99			
06/04/2023	M4		Vessie	+	16/06/2023	16/06/2023	+	28,84 et 29,35			
06/04/2023	M4		Foie	+	15/06/2023	15/06/2023	+	26,6 et 26,5			
06/04/2023	M4		Urine	+	27/06/2023	27/06/2023	+	31,11 et 31,53			
06/04/2023	M4	Sérum	+	27/06/2023	27/06/2023	+	34,27 et 35,97				
06/04/2023	M4	Noir	Peau	+	15/06/2023	15/06/2023	+	27,01 et 27,06			
06/04/2023	M4		Cerveau	-	15/06/2023	15/06/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Poumon	+	15/06/2023	15/06/2023	+	34,54 et 34,06			
06/04/2023	M4		Coeur	+	15/06/2023	15/06/2023	+/-	40,89 et -	28/06/2023	-	
06/04/2023	M4		Rate	+	15/06/2023	15/06/2023	+	33,37 et 33,67			
06/04/2023	M4		Rein	+	15/06/2023	15/06/2023	+	36,73 et 40,16			
06/04/2023	M4		Intestin	+	15/06/2023	15/06/2023	+	31,98 et 32,4			
06/04/2023	M4		Vessie	+	16/06/2023	16/06/2023	+	30,61 et 30,5			
06/04/2023	M4		Foie	+	15/06/2023	15/06/2023	+	31,8 et 32,16			
06/04/2023	M4		Urine	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/04/2023	M4	Sérum	+	27/06/2023	27/06/2023	+	30,09 et 30,08				
06/04/2023	M4	Jaune	Peau	+	16/06/2023	16/06/2023	+/-	36,46 et -	28/06/2023	+/-	37,32 et -
06/04/2023	M4		Cerveau	+	16/06/2023	16/06/2023	+/-	39,08 et -	28/06/2023	+/-	37,91 et -
06/04/2023	M4		Poumon	-	16/06/2023	16/06/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Coeur	-	16/06/2023	16/06/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Rate	-	16/06/2023	16/06/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Rein	+	16/06/2023	16/06/2023	+/-	36,95 et -	28/06/2023	+/-	38,15 et -
06/04/2023	M4		Intestin	-	16/06/2023	16/06/2023	-	/			
06/04/2023	M4		Vessie	+	16/06/2023	16/06/2023	+	29,41 et 30,06			
06/04/2023	M4		Foie	+	16/06/2023	16/06/2023	+	33,81 et -	28/06/2023	+	33,4 et 33,2
06/04/2023	M4		Urine	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/			
06/04/2023	M4	Sérum	-	27/06/2023	27/06/2023	-	/				
03/05/2023	M5	Vert	Peau	-	16/06/2023	16/06/2023	-	/			
03/05/2023	M5		Cerveau	+	16/06/2023	16/06/2023	+	35,7 et 36,66			
03/05/2023	M5		Poumon	+	16/06/2023	16/06/2023	+/-	37,82 et -	28/06/2023	+/-	38,73 et -
03/05/2023	M5		Coeur	-	16/06/2023	16/06/2023	-	/			
03/05/2023	M5		Rate	+	16/06/2023	16/06/2023	+	34,2 et 33,6			
03/05/2023	M5		Rein	+	16/06/2023	16/06/2023	+	32,89 et 33,91			
03/05/2023	M5		Intestin	+	16/06/2023	16/06/2023	+	25,94 et 25,78			
03/05/2023	M5		Vessie	+	16/06/2023	16/06/2023	+	25,36 et 25,52			
03/05/2023	M5		Foie	+	16/06/2023	16/06/2023	+	23,43 et 23,38			
03/05/2023	M5		Urine	-	27/06/2023	28/06/2023	+/-	37,14 et -			
03/05/2023	M5	Sérum	-	27/06/2023	28/06/2023	+/-	34,1 et -				
03/05/2023	M5	Bleu	Peau	+	16/06/2023	16/06/2023	+	30,39 et 30,6			
03/05/2023	M5		Cerveau	+	16/06/2023	16/06/2023	+	35,71 et -	28/06/2023	+/-	37,02 et -
03/05/2023	M5		Poumon	+	16/06/2023	16/06/2023	+	31,76 et 32,81			
03/05/2023	M5		Coeur	-	16/06/2023	16/06/2023	+/-	36,22 et -	27/06/2023	-	
03/05/2023	M5		Rate	+	16/06/2023	16/06/2023	+	36,28 et 37,96			
03/05/2023	M5		Rein	-	16/06/2023	16/06/2023	-	/			
03/05/2023	M5		Intestin	+	16/06/2023	16/06/2023	+/-	39,32 et -	27/06/2023	+	24,9 et 23,57
03/05/2023	M5		Vessie	-	16/06/2023	16/06/2023	-	/			
03/05/2023	M5		Foie	+	16/06/2023	16/06/2023	+/-	37,88 et -	27/06/2023	+	27,26 et 27,2
03/05/2023	M5		Urine	+	27/06/2023	28/06/2023	+	34,78 et 33,86			
03/05/2023	M5	Sérum	+	27/06/2023	28/06/2023	+	35,76 et 36,24				
03/05/2023	M5	Rouge	Peau	-	16/06/2023	16/06/2023	-	/			
03/05/2023	M5		Cerveau	-	16/06/2023	16/06/2023	+/-	36,62 et -	27/06/2023	-	
03/05/2023	M5		Poumon	+	16/06/2023	16/06/2023	+/-	34,56 et -	27/06/2023	+	40,34 et 39,56
03/05/2023	M5		Coeur	-	16/06/2023	16/06/2023	-	/			
03/05/2023	M5		Rate	-	16/06/2023	16/06/2023	+	27,53 et 27,54			
03/05/2023	M5		Rein	+	16/06/2023	16/06/2023	+	30,77 et 30,54			
03/05/2023	M5		Intestin	+	16/06/2023	16/06/2023	+	22,53 et 22,37			
03/05/2023	M5		Vessie	+	16/06/2023	16/06/2023	+	26,16 et 26,29			
03/05/2023	M5		Foie	+	16/06/2023	27/06/2023	+	27,38 et 27,6			
03/05/2023	M5		Urine	-	27/06/2023	28/06/2023	-	/			
03/05/2023	M5	Sérum	+	27/06/2023	28/06/2023	+	31,57 et 31,88				
03/05/2023	M5	Noir	Peau	+	16/06/2023	27/06/2023	+	36,21 et 37,7			
03/05/2023	M5		Cerveau	+	16/06/2023	27/06/2023	+/-	38,42 et -	28/06/2023	+	35,69 et 35,29
03/05/2023	M5		Poumon	+	16/06/2023	27/06/2023	+	38,57 et 38,4			
03/05/2023	M5		Coeur	+	16/06/2023	27/06/2023	+/-	37,02 et -	28/06/2023	+	35,62 et 39,02
03/05/2023	M5		Rate	+	16/06/2023	27/06/2023	+	34,2 et 32,9			
03/05/2023	M5		Rein	+	16/06/2023	27/06/2023	+	34,55 et 33,75			
03/05/2023	M5		Intestin	+	16/06/2023	27/06/2023	+	29,11 et 29,18			
03/05/2023	M5		Vessie	+	16/06/2023	27/06/2023	+	27,2 et 26,91			
03/05/2023	M5		Foie	+	16/06/2023	27/06/2023	+	26,35 et 26,6			
03/05/2023	M5		Urine	-	27/06/2023	28/06/2023	+/-	35,17 et -			
03/05/2023	M5	Sérum	+	27/06/2023	28/06/2023	+	31,94 et 32,23				
03/05/2023	M5	Jaune	Peau	+	16/06/2023	16/06/2023	+	27,14 et 27,21			
03/05/2023	M5		Cerveau	+	16/06/2023	16/06/2023	+/-	38,13 et -	28/06/2023	+	39,92 et 40,42
03/05/2023	M5		Poumon	+	16/06/2023	16/06/2023	+	25,58 et 25,41			
03/05/2023	M5		Coeur	-	16/06/2023	16/06/2023	-	/			
03/05/2023	M5		Rate	-	16/06/2023	16/06/2023	-	/			
03/05/2023	M5		Rein	+	16/06/2023	16/06/2023	+	22,49 et 22,37			
03/05/2023	M5		Intestin	+	16/06/2023	16/06/2023	+	27,93 et 27,8			
03/05/2023	M5		Vessie	+	16/06/2023	16/06/2023	+	28,43 et 28,46			
03/05/2023	M5		Foie	+	16/06/2023	16/06/2023	+	29,56 et 29,87			
03/05/2023	M5		Urine	-	27/06/2023	28/06/2023	-	/			
03/05/2023	M5	Sérum	-	27/06/2023	28/06/2023	-	/				

POUVOIR PATHOGÈNE D'*ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS* DANS SON HÔTE INTERMÉDIAIRE : ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE PARASITAIRE DANS UN MODÈLE EXPÉRIMENTAL CHEZ LA SOURIS

AUTEUR : Maryam MIJEM

RÉSUMÉ :

Echinococcus multilocularis est un parasite de la famille des *Taenidae* responsable d'une zoonose potentiellement très grave : l'échinococcose alvéolaire. Ce parasite est inoffensif pour l'hôte définitif (canidés) qui porte le stade adulte c'est-à-dire les vers dans son intestin. L'hôte définitif qui est souvent le renard contamine l'environnement avec ses déjections contenant les œufs infestants du parasite. Les rongeurs, qui sont les principaux hôtes intermédiaires, et l'Homme, qui est un hôte accidentel, se contaminent par ingestion des œufs présents dans l'environnement. La présente étude a permis de suivre la présence d'*Echinococcus multilocularis* chez des souris infestées expérimentalement par injection intrapéritonéale de matériel larvaire (2017) ou par infestation par voie orale (2023). En 2017, l'ADN du parasite a été retrouvé de manière épisodique avec une forte présence au bout de 2 semaines et les premières lésions visibles macroscopiquement sont apparues au bout de 4 semaines d'infestation. Cette étude a été un premier pas dans le suivi de la dissémination du parasite dans l'organisme des souris et de nouvelles éventualités, notamment avec une méthode d'infestation naturelle, ont pu être envisagées. En 2023, une infestation plus naturelle avec la voie orale a été réalisée et l'ADN du parasite a été retrouvé dans de nombreux organes bien que les lésions macroscopiques se soient limitées au niveau du foie. Cette étude soulève de nombreuses questions mais apporte également un certain nombre de réponse pour constituer le point de départ d'autres études expérimentales autour de la dissémination de ce parasite. Ce travail de thèse se situe au carrefour de la recherche, de l'expérimentation animale et plus largement de la santé publique.

MOTS CLÉS :

ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS, ECHINOCOCCOSE ALVÉOLAIRE, BIOLOGIE MOLÉCULAIRE, SUIVI D'INFESTATION, ÉTUDE EXPÉRIMENTALE, TRANSMISSION DES MALADIES

JURY :

Présidente : Pr Julie Rivière

Directrice de thèse : Dr Veronica Risco-Castillo

Examineur : Dr Pascal Arné

Invités : Franck Boué, Gérald Umhang

PATHOGEN CHARGE OF *ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS* IN ITS INTERMEDIATE HOST: STUDY OF PARASITIC KINETICS IN AN EXPERIMENTAL MODEL IN MOUSE

AUTHOR: Maryam MIJEM

SUMMARY:

Echinococcus multilocularis is a parasite of the Taeniidae family responsible for a potentially very serious zoonosis: alveolar echinococcosis. This parasite is harmless to the definitive host (canids) which carries the adult stage, i.e. the tapeworms in its intestine. The definitive host, which is often the fox, contaminates the environment with its droppings containing the parasite's infesting eggs. Rodents, which are the main intermediate hosts, and humans, who are accidental hosts, become contaminated by ingestion of eggs present in the environment. The present study made it possible to follow the presence of *Echinococcus multilocularis* in mice experimentally infested by intraperitoneal injection of larval material (2017) or by oral infestation (2023). In 2017, the DNA of the parasite was found episodically with a strong presence after 2 weeks and the first macroscopically visible lesions appeared after 4 weeks of infestation. This study was a first step in following the dissemination of the parasite in the organism of mice and new possibilities, in particular with a natural infestation method, could be considered. In 2023, a more natural infestation route (e.g. oral infestation) was carried out and the DNA of the parasite was found in many organs although the macroscopic lesions were limited to the liver. This study raises many questions but also provides a certain number of answers to constitute the starting point for other experimental studies around the dissemination of this parasite. This thesis work is at the crossroads of research, animal experimentation and, more broadly, public health.

KEYWORDS:

ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS, ALVEOLAR ECHINOCOCCOSIS, MOLECULAR BIOLOGY, INFESTATION FOLLOW-UP, EXPERIMENTAL STUDY, DISEASES TRANSMISSION

JURY:

Chairperson: Pr Julie Rivière
Thesis Director: Dr Veronica Risco-Castillo
Reviewer: Dr Pascal Arné
Guests: Franck Boué, Gérald Umhang