



**HAL**  
open science

# Étude à différentes fenêtres de perception, des facteurs impliqués dans la transmission d'*Echinococcus multilocularis*, parasite responsable d'une maladie émergente : l'échinococcose alvéolaire

Marie-Hélène Guislain

► **To cite this version:**

Marie-Hélène Guislain. Étude à différentes fenêtres de perception, des facteurs impliqués dans la transmission d'*Echinococcus multilocularis*, parasite responsable d'une maladie émergente : l'échinococcose alvéolaire. *Ecologie, Environnement*. Université de Franche-Comté, 2006. Français. NNT: . tel-00340022

**HAL Id: tel-00340022**

**<https://theses.hal.science/tel-00340022>**

Submitted on 19 Nov 2008

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

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

## THÈSE

Présentée à

L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ  
UFR SCIENCES ET TECHNIQUES

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

Spécialité: Sciences de la Vie et de la Santé

École doctorale « Homme Environnement Santé »

Par

Mlle Marie-Hélène GUISLAIN

Née le 24/12/1980 à Roubaix (Nord)



**ÉTUDE À DIFFÉRENTES FENÊTRES DE PERCEPTION,  
DES FACTEURS IMPLIQUÉS DANS LA TRANSMISSION  
D'*ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS*,  
PARASITE RESPONSABLE D'UNE MALADIE ÉMERGENTE :  
L'ÉCHINOCOCCOSE ALVÉOLAIRE**



LABORATOIRE DE BIOLOGIE ENVIRONNEMENTALE (EA 3184-USC INRA)  
2C2A – CENTRE DE RECHERCHE ET DE FORMATION EN ÉCO-ÉTHOLOGIE

Soutenue le 14 Décembre 2006 à Besançon devant la commission d'examen:

Franck BOUE (Ingénieur de Recherche, AFSSA Nancy)  
Jacques CABARET (Directeur de Recherche, INRA Tours)  
Patrick GIRAUDOUX (Professeur, Université de Franche-Comté)  
Renaud PIARROUX (Professeur, Université de Franche-Comté)  
Marie-Lazarine POULLE (Chargée de mission 2C2A-CERFE)  
Francis RAOUL (Maître de Conférences, Université de Franche-Comté)

Rapporteur  
Rapporteur  
Directeur de thèse  
Examineur  
Co-Directeur de thèse  
Co-Directeur de thèse



**THÈSE**

Présentée à

**L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ  
UFR SCIENCES ET TECHNIQUES**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ**

Spécialité: Sciences de la Vie et de la Santé

**École doctorale « Homme Environnement Santé »**

Par

**M<sup>lle</sup> Marie-Hélène GUISLAIN**

Née le 24/12/1980 à Roubaix (Nord)

**ÉTUDE À DIFFÉRENTES FENÊTRES DE PERCEPTION,  
DES FACTEURS IMPLIQUÉS DANS LA TRANSMISSION  
*D'ÉCHINOCOCCUS MULTILOCULARIS*,  
PARASITE RESPONSABLE D'UNE MALADIE ÉMERGENTE :  
L'ÉCHINOCOCCOSE ALVÉOLAIRE**

LABORATOIRE DE BIOLOGIE ENVIRONNEMENTALE (EA 3184-USC INRA)  
2C2A – CENTRE DE RECHERCHE ET DE FORMATION EN ÉCO-ÉTHOLOGIE

Soutenue le 14 Décembre 2006 à Besançon devant la commission d'examen:

Franck BOUE (Ingénieur de Recherche, AFSSA Nancy)  
Jacques CABARET (Directeur de Recherche, INRA Tours)  
Patrick GIRAUDOUX (Professeur, Université de Franche-Comté)  
Renaud PIARROUX (Professeur, Université de Franche-Comté)  
Marie-Lazarine POULLE (Chargée de mission 2C2A-CERFE)  
Francis RAOUL (Maître de Conférences, Université de Franche-Comté)

Rapporteur  
Rapporteur  
Directeur de thèse  
Examineur  
Co-Directeur de thèse  
Co-Directeur de thèse



## REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse, qui a été réalisé au sein du Laboratoire de Biologie Environnementale à Besançon, mais aussi au Centre de Recherche et de Formation en Eco-éthologie de la Communauté de Communes de l'Argonne Ardennaise (le 2C2A-CERFE), le 'QG' de terrain, n'aurait pas pu voir le jour sans la participation active de nombreuses personnes que je tiens ici à remercier.

Cette thèse a pu être menée à bien grâce au soutien financier du Conseil Régional de Champagne-Ardenne, de la Délégation Départementale à la Recherche et aux Technologies, de la Communauté de Communes de l'Argonne Ardennaise, et du Programme Pluri-Formation « Milieux naturels – Milieux anthropisés », que je tiens ici à remercier.

J'adresse toute ma reconnaissance et de chaleureux remerciements au Dr Franck BOUE et au Dr Jacques CABARET, qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi qu'au Pr Renaud PIARROUX, membre du jury. Merci à tous trois d'avoir bien voulu faire une lecture critique de ce travail et en proposer de très intéressantes améliorations.

Je tiens à remercier vivement le Pr Patrick GIRAUDOUX, qui a dirigé ce travail. Il a accepté de m'intégrer au sein du Laboratoire de Biologie Environnementale, malgré les nombreux défis à relever : éloignement géographique, intégration d'une étude « de terrain » dans le moule doctoral français (trois ans, c'est très court !). Je le remercie pour la patience dont il a su faire preuve pour m'accompagner dans mon apprentissage de l'utilisation des modèles statistiques, et pour ses avis et remarques toujours judicieux.

Je tiens également à remercier avec un grand plaisir mes deux co-encadrants, Francis RAOUL et Marie-Lazarine POULLE. Francis a été une épaupe sur qui compter tout au long de cette thèse, autant pour la réflexion scientifique, que pour l'énergie et la rapidité qu'il a investi dans la correction de mon travail, mais aussi pour tous les petits détails techniques qu'il a toujours gentiment pris en charge lorsque l'éloignement géographique m'empêchait d'être présente à Besançon. Marie-Lazarine a été la « confidente » de tous les jours, encadrant mon travail sur le terrain. C'est notamment grâce à de fréquentes discussions (la science avance jour après jour...), que nous avons pu construire et réaliser ce travail, qui je l'espère, a

été aussi enrichissant pour l'une que pour l'autre. Je tiens également à remercier ici plus une amie qu'une encadrante.

Je souhaite également faire part de mes remerciements:

- à Monsieur Daniel SERVAIS et à Madame Isabelle GUIOT, respectivement Président et Directrice de la Communauté de Communes de l'Argonne Ardennaise, ainsi qu'au personnel de cette structure pour leur accueil,

- à l'équipe de l'Agence Française pour la Sécurité Sanitaire des aliments (AFSSA-LERRPAS Nancy), et notamment à la directrice Florence CLIQUET, pour m'avoir accueilli dans ses locaux, au Dr Marie-Eve TERRIER, avec qui j'ai passé de très bons moments et appris énormément, à Denis AUGOT, qui m'a formé aux techniques de diagnostic, à Christophe CAILLOT, pour l'aide technique qu'il a pu m'apporter, et à Emmanuelle ROBARDET avec qui j'ai pu échangé de nombreuses idées,

- à Benoît COMBES et Déborah GOTTSTCHECK, de l'Entente pour la Rage et autres Zoonoses (ERZ, Malzéville), pour leurs avis et suggestions,

- aux différents acteurs locaux sans qui une partie du travail de terrain n'aurait pu être réalisée : notamment Patrick VANDERESSE, technicien de la Fédération Départementale des Chasseurs, les membres de l'association des piégeurs des Ardennes, les nombreux particuliers qui ont participé à la collecte de cadavres de renards ou ont accepté avec bonne humeur ma présence régulière sur leurs terrains lors des transects,

- au Dr Hubert FERTE, de l'université de Reims, pour sa connaissance si complète, étonnante et enthousiasmante du monde des parasites, ainsi qu'au Dr Guillaume FROMENT, avec qui il a réalisé les premières recherches d'*Echinococcus multilocularis* sur les renards collectés de 2000 à 2003.

Par ailleurs, je souhaite tout particulièrement remercier les collègues et amis que j'ai pu côtoyer au quotidien:

- les doctorants, chercheurs et techniciens du Laboratoire de Biologie Environnementale, qui m'ont toujours accueilli avec gentillesse et bonne humeur à chacun de mes passages à Besançon. Au cours de ces trois années de thèse, j'ai beaucoup apprécié l'ambiance qui règne au sein du laboratoire. Je souhaite remercier plus spécialement Olivier ADAM, Gaëlle

VINCENT, Amélie VANISCOTTE et Anne GINOUX, qui m'ont tour à tour rendu un grand service en m'hébergeant quelques semaines lors de mes séjours bisontins,

- l'équipe Santé et Environnement Rural de l'Université de Franche-Comté (SERF) à Besançon, qui m'a accueillie pendant un mois en juin 2005 et m'a fait découvrir le quotidien des équipes travaillant en biologie moléculaire,

- l'équipe du 2C2A-CERFE, et tout spécialement Rémi HELDER, directeur du centre. Merci, 'Rébi' pour ton enseignement du 'lever de coude' (si tu vois ce que je veux dire), mais aussi, plus sérieusement, pour toutes ces idées et cet enthousiasme que tu sais si bien insuffler à l'équipe, et pour avoir créé le 2C2A-CERFE, au sein duquel j'ai passé trois années inoubliables,

- les différents étudiant(e)s et ami(e)s du 2C2A-CERFE, avec qui j'ai non seulement partagé les difficultés de la thèse, les petits bonheurs du travail sur le terrain (merci Caco pour les nuits passées à courir derrière les blaireaux, merci Estelle pour m'avoir fait profiter des hurlements stridants des marcassins), mais aussi la vie en communauté. Je souhaite remercier Caroline HENRY, qui a été ma responsable de stage à une époque plus lointaine, et à qui j'ai succédé dans l'étude des renards, ainsi que Thomas QUINTAINE, qui a accepté de reprendre le flambeau. Merci aux copines de bureau et de soirée (les pires): Diane, Carole, Marina, (et les moins pires, quoi que...): Eve, Caroline, Rachel, Estelle, Pauline. Je n'oublie pas non plus les gars: Nico, Brick, Vince, Thomas 'Renard' et Thomas 'Castor', Manu, Julian... (reste les deux chiens, Titou et Buzz, et le lapin !)

Merci aux stagiaires qui ont pu participé à cette étude, et surtout à Marie ROMEDENNE, qui à mon avis mérite le titre de stagiaire de l'année 2004, pour avoir ouvert des intestins, passé des heures sous la binoculaire, et cherché des dents de rongeurs dans des crottes pendant des jours et des jours !

*Enfin, je souhaite remercier mes parents qui m'ont toujours fait confiance et m'ont soutenu tout au long de mes études, et mon compagnon, Kevin, qui partage ma vie mais qui également a partagé ma thèse en comptant les renards, en grattant les intestins, en autopsiant des renards, en m'accompagnant à Besançon, et en supportant tous mes petits défauts : merci docteur Ninou.*



## PRINCIPALES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SUR LE SUJET

### Publications:

**Guislain, M.-H.**, Raoul, F., Giraudoux, P., Terrier, M.-E., Ferté, H. & Poulle, M.-L. Caractérisation du système de transmission d'*Echinococcus multilocularis* dans une région de récente endémie. *En préparation*.

Knapp, J., **Guislain, M.-H.**, Bart, J.-M., Raoul, F., Gottstein, B., Giraudoux, P., Piarroux, R. *Echinococcus multilocularis* in the region of the French Ardennes: investigation of the genetic polymorphism by microsatellite targets. *En préparation*.

**Guislain, M.-H.**, Knapp, J., Poulle, M.-L., Raoul, F., Giraudoux, P. Factors influencing the spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* infection of red fox on a 1 km<sup>2</sup> resolution. *En préparation*.

**Guislain, M.-H.**; Raoul, F., Poulle, M.-L., Knapp, J., Giraudoux, P. Fox faeces and vole distribution: a local range approach to *Echinococcus multilocularis* transmission. *En préparation*.

### Communications lors de colloques:

**Guislain, M.-H.**, Raoul, F., Poulle, M.-L., Giraudoux, P. 2005. Local scale distribution of faeces of an *E. multilocularis* definitive host (the red fox, *Vulpes vulpes*): influence of habitat and small mammal relative density. XXVIIth Congress of the International Union of Game Biologists (IUGB), Hannovre, Allemagne.

**Guislain, M.-H.**, Raoul, F., Terrier, M.-E., Poulle, M.-L., Froment, G., Ferté, H., Giraudoux, P. 2005. Distribution et variations spatio-temporelles des prévalences d'*Echinococcus multilocularis* chez des populations de renards roux (*Vulpes vulpes*) de l'Argonne française : premiers résultats. Congrès annuel de la Société Française de Parasitologie, Besançon, France.

Boucher, J.M., **Guislain, M.H.**, Penalba, C., Froment, G., Fauchart, J.P., Depaquit, J., Poulle, M.L., Ferté, H., Augot, D. (2005) L'échinococcose alvéolaire dans les Ardennes. Congrès annuel de la Société Française de Parasitologie, Besançon, France.

### Communications présentées au Forum Jeunes Chercheurs:

**Guislain, M.-H.**, Raoul, F., Poulle, M.-L., Terrier, M.-E., Froment, G., Ferté, H., Giraudoux, P. 2005. Premières analyses spatiales de la distribution d'*Echinococcus multilocularis* dans l'Argonne ardennaise. XI<sup>ème</sup> Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon.

**Guislain, M.-H.**, Raoul, F., Poulle, M.-L., Giraudoux, P. 2006. Distribution des fèces de renard roux (*Vulpes vulpes*): une approche à échelle locale de la transmission d'*Echinococcus multilocularis*. XII<sup>ème</sup> Forum des Jeunes Chercheurs, Besançon.

## Sommaire

|   |    |
|---|----|
| <b>I. INTRODUCTION</b> .....  | 11 |
| I.1. Impact des maladies infectieuses et facteurs favorisant leur émergence .....   | 11 |
| I.2. L'approche intégrée à plusieurs fenêtres de perception .....   | 13 |
| I.3. Les zoonoses, principales maladies émergentes .....  | 15 |
| I.4. Filtre de compatibilité et filtre de rencontre .....   | 17 |
| I.5. Nécessité d'une approche pluridisciplinaire pour l'étude de la transmission<br>parasitaire .....   | 19 |
| I.6. Un exemple de zoonose parasitaire émergente: l'échinococcose alvéolaire .....  | 21 |
| I.7. Approche intégrée de l'étude de la transmission d' <i>Echinococcus multilocularis</i> .....  | 25 |
| I.8. Objectifs de l'étude .....   | 28 |
| <br>  |    |
| <b>II. PREMIÈRE PARTIE : Fonctionnement du cycle d'<i>Echinococcus multilocularis</i> dans une région de récente endémie</b> .....  | 31 |
| II.1. Objectifs de la première partie .....   | 33 |
| II.2. Article 1 .....   | 35 |
| <b>Guislain, M.-H., Raoul, F., Giraudoux, P., Terrier, M.-E., Ferté, H. &amp; Poulle, M.-L.</b><br><b>Caractérisation du système de transmission d'<i>Echinococcus multilocularis</i> dans une<br/>        région de récente endémie</b>  |    |
| II.3. Article 2 .....   | 61 |
| <b>Knapp, J., Guislain, M.-H., Bart, J.-M., Raoul, F., Gottstein, B., Giraudoux, P. &amp; Piarroux, R.</b><br><b><i>Echinococcus multilocularis</i> in the region of the French Ardennes: investigation of the<br/>        genetic polymorphism by EmsB microsatellite target</b> |    |
| II.4. Conclusion de la première partie .....  | 76 |

**III. DEUXIEME PARTIE : Hétérogénéité spatiale d'*Echinococcus multilocularis* chez les renards, à une étendue régionale (900 km<sup>2</sup>) et un grain local (1 km<sup>2</sup>) ..... 77**

III.1. Objectifs de la deuxième partie ..... 79

III.2. Article 3..... 81

**Guislain, M.-H., Knapp, J., Poulle, M.-L., Raoul, F. & Giraudoux, P.**

**Factors influencing the spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* infection of red fox on a 1 km<sup>2</sup> resolution**

III.3. Conclusion de la deuxième partie ..... 99

**IV. TROISIEME PARTIE : Approche à une étendue locale (90 km<sup>2</sup>) de la transmission d'*Echinococcus multilocularis*: étude des distribution des fèces de renards et des rongeurs hôtes intermédiaires, à un grain micro-local (1000 m<sup>2</sup>) ..... 101**

IV.1. Objectifs de la troisième partie ..... 103

IV.2. Article 4..... 105

**Guislain, M.-H., Raoul, F., Poulle, M.-L., Knapp, J. & Giraudoux, P.**

**Fox faeces and vole distribution: a local range approach to *Echinococcus multilocularis* transmission**

IV.3. Conclusion de la troisième partie ..... 125

**V. DISCUSSION..... 127**

V.1. Synthèse de la contribution de cette étude à la connaissance du cycle d'*E. multilocularis* ..... 127

|  |     |
|--|-----|
| V.2. Importance de l'étude des zoonoses parasitaires.....  | 130 |
| V.3. Comment anticiper et prévenir l'émergence de zoonoses ? .....   | 131 |
| V.4. Limites de la modélisation et types de données nécessaires .....  | 132 |
| V.5. Apport des données de terrain à la compréhension du cycle parasitaire.....  | 133 |
| V.6. Comparaison du fonctionnement du cycle d' <i>E. multilocularis</i> dans les Ardennes<br>à d'autres situations ..... | 134 |
| V.7. Extrapolation possible des résultats à l'ensemble du département .....  | 136 |
| V.8. Hétérogénéité spatiale du portage parasitaire à une étendue régionale et un grain<br>local .....                    | 138 |
| V.9. Identification des milieux à risques à une étendue locale et un grain micro-local.....                              | 139 |
| <b>VI. CONCLUSION / PERSPECTIVES</b> .....   | 143 |
| <b>VII. BIBLIOGRAPHIE</b> .....  | 149 |
| <b>Liste des figures</b> .....   | 159 |
| <b>Liste des tableaux</b> .....  | 160 |



## I. INTRODUCTION

Cette étude a porté sur le fonctionnement du cycle d'*Echinococcus multilocularis*, parasite responsable d'une maladie infectieuse: l'échinococcose alvéolaire. Il s'agit d'une zoonose identifiée comme étant actuellement émergente. La présente étude a été conduite dans le département des Ardennes, zone de récente endémie connue d'*E. multilocularis*. Nous avons suivie une approche intégrée, à plusieurs fenêtres d'observation, pour l'étude de certains facteurs clés du cycle sylvatique du parasite : fréquence et intensité du portage parasitaire par l'hôte définitif, relation entre cet hôte et les hôtes intermédiaires, distribution spatiale et typage génétique du parasite, ainsi qu'identification des milieux propices à la transmission. Par son apport de données originales, cette étude espère contribuer à améliorer notre compréhension du lien entre les caractéristiques de l'environnement et l'intensité de la transmission parasitaire, pour pouvoir anticiper et prévenir les conséquences des changements environnementaux sur le risque de transmission à l'Homme de maladies infectieuses, notamment des zoonoses.

### **I.1. Impact des maladies infectieuses et facteurs favorisant leur émergence**

Les maladies infectieuses sont responsables d'un quart de la mortalité humaine au niveau mondial (WHO, 2000). Celles qui affectent la faune sauvage ont, de plus, des impacts importants dans le domaine de l'élevage, de la chasse ou de la conservation des espèces sauvages et des écosystèmes (Daszak et al., 2000; Dobson et Foufopoulos, 2001; Cleaveland et al., 2002).

Les maladies infectieuses qui affectent les animaux de rente occasionnent, en effet, des pertes de rendements, des abattages préventifs ainsi que des interdictions de commercialisation et de transport responsables de préjudices financiers importants aux filières économiques concernées (Gunn et al., 2005; Budke, 2006). Celles qui se répandent dans les populations gibiers lors d'épidémies (cf. notamment, la myxomatose chez le lapin, kérato-conjonctivite infectieuse chez les chamois) entraînent, elles, une diminution et une raréfaction des populations disponibles pour la chasse.

Les épidémies de maladies infectieuses peuvent également compromettre la conservation d'espèces menacées (Funk et al. 2001), comme c'est le cas, entre autres, pour l'épidémie de gale chez le renard arctique *Alopex lagopus* (Golstman et al., 1996), celles de rage et autres infections canines chez le loup d'Abyssinie *Canis simensis* (Laurenson et al., 1998), celle du virus West Nile chez le tétras *Centrocercus urophasianus* aux Etats-Unis (Naugle et al., 2004). De plus, les maladies infectieuses peuvent destabiliser une communauté animale dès lors qu'elles affectent une espèce clé de cette communauté (Barbault, 2000; Funk et al., 2001). Ainsi, aux Etats-Unis, la réduction drastique des populations de rapaces dans le Mid-West suite à l'arrivée du virus West Nile est l'un des facteurs expliquant une prolifération de rongeurs dans cette région (Baudet et Sidibé, 2003; Patz et al., 2004).

Dans ce contexte, la prévention des maladies infectieuses est actuellement une des préoccupations majeures de nos sociétés, d'autant plus que les importants changements environnementaux induits par la modification des activités humaines de ces dernières décennies semblent actuellement favoriser l'émergence de certaines d'entre elles (Patz et al., 2000). Certaines maladies infectieuses sont ainsi considérées comme « émergentes » car « leur incidence réelle augmente de manière significative dans une population donnée, d'une région donnée et durant une période donnée, par rapport à la situation épidémiologique habituelle de cette maladie » (Thoma et Thiry, 2003). Parmi les agents pathogènes connus, 12% sont considérés comme étant à l'origine de maladies infectieuses émergentes (Taylor et al., 2001).

Les principaux facteurs d'origine anthropique identifiés par Patz et al. (op. cit.) comme favorisant l'émergence des maladies infectieuses sont, entre autres, la déforestation, la fragmentation de l'habitat, l'extraction industrielle de minerai, la construction de routes, l'urbanisation, l'extension des terres agricoles, l'intensification de l'irrigation, la dégradation des côtes, l'accroissement des échanges commerciaux et les mouvements de populations. Patz et al. (op. cité) identifient ainsi trente-quatre maladies infectieuses pour l'Homme particulièrement sensibles aux modifications du paysage, parmi lesquelles le paludisme, l'anthrax, les bilharzioses, ou encore la tuberculose ou les fièvres hémorragiques. De même, parmi les maladies infectieuses affectant la faune sauvage, 55 % sont émergentes suite aux dégradations environnementales provoquées par l'Homme (fragmentation de l'habitat, pollution, eutrophisation des eaux) et/ou aux transports d'animaux, qu'ils soient sauvages ou domestiques (Dobson et Foufopoulos, 2001).

L'émergence d'une maladie infectieuse peut être consécutive à l'extension d'un pathogène depuis son aire de distribution originelle vers de nouvelles zones géographiques suite à l'intervention de nouveaux facteurs extérieurs, comme ce fut le cas, par exemple, pour la maladie de Lyme en Amérique du Nord (Dobson et Foufopoulos, 2001; Taylor et al., 2001; Rachowicz et al., 2005). Elle peut également être due à l'invasion de pathogènes dans de nouvelles populations d'hôtes, comme illustré par la propagation de la peste bovine dans la faune sauvage africaine dans les années 1980 (Dobson et Foufopoulos, 2001; Artois et al., 2003; Taylor et al., 2001). Enfin, comme c'est le cas pour le Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH) et le parvovirus canin, l'émergence d'une maladie infectieuse peut être due à l'installation d'un pathogène dans un nouvel hôte et son évolution vers une nouvelle forme capable de se répliquer et de contaminer en masse ce nouvel hôte (Artois et al., 2003; Dobson et Foufopoulos, 2001).

### **I.2. L'approche intégrée à plusieurs fenêtres de perception**

La mise en place de mesures de prévention des maladies infectieuses et de leur émergence nécessite d'acquérir une bonne connaissance de la nature, des causes et du fonctionnement des cycles épidémiologiques des agents pathogènes impliqués. C'est l'objectif des études épidémiologiques. Elles procèdent au recueil et à la description précise des données (nombre de malades, zone infectée, durée de la contagion), puis à leur analyse afin de prévoir l'évolution des maladies (population à risque, zones géographiques concernées...) et de prendre les mesures adaptées. Il s'avère de plus en plus que l'analyse spatiale des données issues de différentes échelles est déterminante en épidémiologie, pour rendre compte du fonctionnement des systèmes biologiques et pouvoir ainsi, sur la base de cette connaissance, élaborer des mesures de prévention des maladies infectieuses (Cortinas et al., 2002; Giraudoux et al., 2003; Artois et al., 2003). L'échelle à laquelle est conduite une analyse spatiale nécessite cependant d'être bien définie et spécifiée.

Hobbs (2003) définit une échelle comme étant une façon de décrire dans le temps ou l'espace, les dimensions physiques d'objets d'intérêt. Selon lui, l'échelle définit la « taille » des mesures et comprend deux aspects: d'une part, l'étalement maximum de ce qui est mesuré, c'est-à-dire son étendue et, d'autre part, la plus petite différence qui peut être définie à l'intérieur de cette mesure, c'est-à-dire le grain ou la résolution. Par exemple, une règle



graduée a une étendue de 30 cm et un grain de 1 mm, tandis qu'un calendrier a une étendue d'un an et un grain d'un jour (Figure 1).

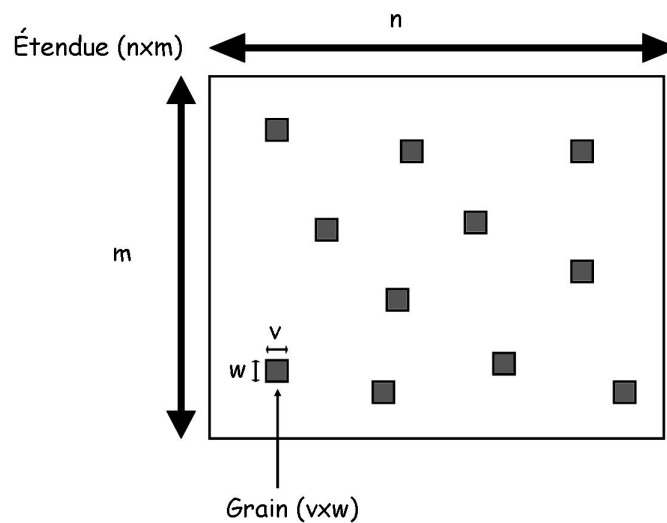


Figure 1. Représentation schématique de l'étendue et du grain

Lorsque l'on s'intéresse au fonctionnement d'un système biologique, l'étendue de l'échelle correspond à une « fenêtre de perception » et du choix de cette fenêtre dépendent notre analyse du système et notre perception de son hétérogénéité. Hobbs (op. cité) donne ainsi l'exemple de l'analyse d'un système proie-prédateur constitué d'une population de rennes *Rangifer tarandus* et d'une population de loups *Canis lupus*: à un niveau de perception géographique large (une région), les deux populations sont sympatriques; cependant si l'on diminue le niveau de perception et que l'on observe leurs distributions plus finement, les populations de proies et de prédateurs sont localisées dans des zones distinctes, les proies évitant les secteurs fréquentés par les prédateurs.

Le choix de l'échelle et/ou de la fenêtre de perception est particulièrement important en écologie et en épidémiologie du paysage. En effet, comme l'écologie du paysage a pour objectif d'étudier les arrangements spatiaux des écosystèmes et des éléments paysagers et les processus à plusieurs échelles qui les unissent, le choix de la fenêtre de perception s'avère déterminant. Il en va de même en épidémiologie du paysage (Pavlosky, 1966 dans Hess et al., 2002), basée sur le principe de cartographier la distribution spatiale des conditions favorables à une infection, d'après les paramètres biotiques (populations d'hôtes, composition du paysage...) et abiotiques (climat, géologie...) pertinents vis-à-vis de la présence et de l'abondance d'un pathogène (Hess et al., 2002). Le paysage peut, ainsi, être cartographié en

termes d'incidence de la maladie et de facteurs de risques d'infection, ce qui permet de prévoir le risque de survenue de la maladie et de prévenir celle-ci.

Un des exemples historiques les plus fameux de cartographie du patron spatial d'apparition d'une maladie est dû à John Snow qui, en mettant en relation l'apparition des cas de choléra dans la ville de Londres en 1854 et la distribution des points d'eau potable, a montré que la transmission du choléra était liée à l'eau (Colwell, 1996). Actuellement, l'épidémiologie du paysage dispose d'un outil performant: les systèmes d'information géographique (SIG). Ils permettent le recoupement cartographique de différents types de données épidémiologiques (distribution des hôtes, prévalences humaines, pluviométrie, végétation, types de sol, présence d'eau..) afin d'établir quels sont les facteurs principaux responsables des prévalences humaines pour certaines maladies infectieuses. Il a ainsi été possible de déterminer, par exemple, que les prévalences élevées de *Schistosoma mansoni* chez l'homme dans l'état de Bahia au Brésil sont essentiellement liées à des zones où la densité des populations humaines est élevée, où la durée de la saison sèche est courte et le sol principalement latifère (Bavia et al., 1999).

Cette possibilité de recoupement de données spatialisées s'avère particulièrement précieuse pour l'étude des zoonoses, définies comme étant « les maladies, infections, ou infestations provoquées par des agents transmissibles (bactéries, virus, parasites, ou prions) se développant au moins chez deux espèces de vertébrés dont l'Homme » (Savey et Dufour, 2004). En effet, dans le cas des zoonoses, la distribution spatiale de la maladie infectieuse est généralement très hétérogène, car elle dépend aussi bien de la distribution des organismes hôtes que de celle des parasites (Combes, 2001).

### **I.3 . Les zoonoses, principales maladies émergentes**

Sur 1415 espèces d'organismes infectieux connus, 61% sont à l'origine de zoonoses, et ces dernières représentent 75 % des maladies infectieuses émergentes (Taylor et al., 2001). L'étude des zoonoses occupe donc une part importante des travaux conduits en épidémiologie. Les zoonoses peuvent se diviser en trois grandes catégories : zoonoses bactériennes (ex: maladie de Lyme), zoonoses virales (ex : virus West Nile, Fièvre Hémorragique à Syndrome Rénal FSHR), et zoonoses parasitaires (ex: toxoplasmose, malaria, bilharziozes). Cette dernière catégorie comprend des zoonoses dues à des protozoaires (ex:

*Toxoplasma gondii*) et d'autres dues à des helminthes (eucestodes, ex: *Tenia solium*; trématodes, ex: *Schistosoma spp.*; nématodes, ex: *Trichinella spp.*).

Presque toutes les zoonoses (97%) ont pour réservoir principal les populations animales (Taylor et al., 2001). Dans certains cas, le réservoir d'agents pathogènes reste incertain mais semble néanmoins impliquer des animaux, comme c'est le cas pour le Syndrome Respiratoire Aigu Sévère, SRAS (Vijayanand et al., 2004). De plus, certaines maladies infectieuses, telles que le VIH ou la grippe aviaire, qui ne sont pas considérées comme des zoonoses, ont évolué à partir de pathogènes provenant d'animaux (Taylor et al., 2001 ; Capua et Alexander, 2002). Or, actuellement, comme le souligne Vallat (2004), « (...) les innombrables facteurs qui définissent les rapports étroits d'interdépendance entre les hommes et les animaux ont fini par converger et créer un environnement propice à l'émergence d'agents pathogènes zoonotiques ».

Dans ce contexte, il apparaît primordial d'étudier l'effet des modifications du paysage sur le risque de transmission des zoonoses et, à plus court terme, d'identifier les secteurs dans lesquels le risque de transmission à l'homme est élevé, afin de mettre en place des mesures de prévention. Dans le cas des zoonoses parasitaires, l'hétérogénéité de la distribution des parasites se traduit par des variations temporelles et spatiales de la proportion de la population d'hôtes porteuse du parasite (prévalence) et du nombre de parasites porté par chaque individu infesté (intensité de l'infection) (Wilson et al., 2002).

L'utilisation de l'analyse spatiale de la répartition des cas humains est aléatoire car elle est cryptique : il est difficile d'obtenir une bonne précision sur la localisation du contact infectant chez l'homme, car il dépend du souvenir du patient et de l'association qu'il peut avoir faite ou pas du contact avec un lieu précis ; de plus, il est très rare d'obtenir la localisation exacte du lieu de résidence d'un patient, celui-ci étant protégé par l'anonymat (Artois et al., 2003). Il est donc judicieux de prévenir le risque humain par une approche intégrée, axée sur l'acquisition de connaissances sur le parasite via les hôtes animaux, pour déterminer les facteurs de risque à des fenêtres de perception adaptées aux comportements humains.

#### **I.4. Filtre de compatibilité et filtre de rencontre**

Quelle que soit la fenêtre de perception considérée, les mécanismes qui conduisent à une interaction durable entre un parasite et son hôte dépendent de plusieurs étapes, représentées successivement par le « filtre de rencontre », qui conditionne la possibilité de contact entre le parasite et l'hôte potentiel, et le « filtre de compatibilité », qui conditionne la possibilité que le parasite et l'hôte potentiel vivent durablement en commun (Euzet et Combes, 1980; Combes, 2001; Figure 2)

Le franchissement du filtre de rencontre peut être décomposé en deux processus, le premier étant la cohabitation de l'hôte potentiel et du parasite dans un même écosystème (Combes, 2001). A une échelle de perception très vaste, cette cohabitation dépend, d'une part, des facteurs abiotiques de l'environnement (température et pluviométrie moyenne, amplitude des écarts thermiques, durée des périodes sèches, présence de courants marins, etc) qui limitent l'aire de répartition possible du parasite en conditionnant sa survie dans le milieu extérieur (Bush et al., 2001). Elle dépend, d'autre part, de la présence des différentes espèces d'hôtes, l'aire de distribution possible du parasite devant se superposer à celle de ses hôtes (Combes, 2001). A une échelle de perception plus restreinte, les variables qui affectent les distributions des hôtes et des parasites deviennent plus spécifiques (Bush et al., 2001). Ainsi, les stades libres des parasites (œufs des helminthes, miracidium et cercaires des digènes...) sont directement affectés par des facteurs abiotiques locaux (température et humidité du substrat, photopériode, courants, etc...). A cela s'ajoute la nécessité d'une superposition spatiale, à une échelle de perception locale, entre le parasite et les hôtes et entre les différents types d'hôtes. Cette superposition spatiale doit être particulièrement précise si les contacts parasite-hôte ou hôte-hôte sont nécessaires, comme c'est le cas lors du passage d'œufs immobiles vers l'hôte, ou lors du transfert d'un hôte à l'autre par prédation (ce qui est le cas de la majorité des cestodes, Bush et al., 2001).

Le second processus impliqué dans le franchissement du filtre de rencontre est la rencontre proprement dite, qui implique que les comportements de l'hôte potentiel permettent le contact avec les stades infestant du parasite (Combes, 2001). La localisation de ces derniers dépend généralement du comportement des hôtes ou des vecteurs du parasite et, notamment, de leur capacité de déplacement. Les filaires sont ainsi transportées par les moustiques qui leurs servent de vecteurs (Bush et al., 2001) et, dans le cas des parasites helminthes dont les

déplacements sont généralement très limités dans l'espace, la dissémination des larves ou des œufs dans l'environnement dépend de l'amplitude des déplacements des hôtes intermédiaires et définitifs (Combes, 2001). Certains parasites sont présents dans le milieu extérieur sous la forme d'un stade libre (propagules ou larves) ayant la capacité de se déplacer activement dans l'environnement extérieur, mais cette capacité est liée aux propriétés de l'habitat dans lequel ils ont été déposés (Bush et al., 2001).

Ainsi, si la larve du nématode *Elaphostrongylus rangiferi* peut se déplacer vers son hôte intermédiaire (un escargot), une certaine température est nécessaire pour que la larve soit active, et il faut un minimum d'humidité dans le sol pour qu'elle puisse se déplacer (Skorping, 1982). Certains milieux réunissent mieux que d'autres les conditions favorables à cette transmission parasitaire. Ainsi, ce sont sur les berges des étangs que les escargots aquatiques viennent se nourrir de végétaux et ce sont également sur ces berges que les grenouilles passent une grande partie de leur temps à chasser et, donc, que leurs fèces sont préférentiellement déposées. Les berges des étangs constituent ainsi un milieu très favorable à la transmission du trématode *Halipegus occidualis* entre son hôte définitif, la grenouille, et son hôte intermédiaire, l'escargot aquatique qui ingère les œufs répandus dans l'environnement par les fèces de grenouilles (Williams et Esch, 1991). Dans cet exemple, le filtre de rencontre entre les hôtes parasites peut être considéré comme ouvert car il y a superposition spatiale entre les différents acteurs du cycle (hôte définitif, stade libre du parasite, hôte intermédiaire) du fait des comportements respectifs des hôtes. Le comportement des hôtes est également un facteur clé dans la relation prédateur-proie entre hôtes successifs. Dans le cas de la toxoplasmose, le cadre de vie des chats domestiques (hôtes définitifs) influence leurs comportements: la part variable du régime alimentaire issue de la prédation de rongeurs (hôtes intermédiaires) semble influencer la transmission de *Toxoplasma gondii* (Tenter et al., 2000; Afonso et al., 2006).

Le franchissement du filtre de rencontre ne signifie pas que le parasite va pouvoir s'installer dans l'hôte et se reproduire. En effet, intervient le deuxième filtre, dit « de compatibilité » (Combes, 2001). Un hôte, pour pouvoir héberger une espèce de parasite donnée, doit pouvoir répondre aux exigences d'espace et de ressources métaboliques du parasite. De plus, pour s'installer durablement dans un hôte, le parasite doit parvenir à contourner le système immunitaire de l'hôte dans lequel il s'est installé (Combes, 2001). Ainsi, il apparaît qu'un parasite ne pourra pas survivre dans n'importe quel hôte.

### I.5. Nécessité d'une approche pluridisciplinaire pour l'étude de la transmission parasitaire

La compréhension des mécanismes impliqués dans la transmission parasitaire nécessite de s'intéresser aux facteurs qui permettent aux espèces concernées de cohabiter, de se rencontrer, d'accepter l'autre et/ou de se faire accepter de lui, soit autant de facteurs étudiés dans le cadre de disciplines diversifiées (Figure 2). Les études en parasitologie concernent généralement le filtre de compatibilité (étude du métabolisme, de l'immunologie, du développement) mais peu s'intéressent au filtre de rencontre, qui conditionne pourtant l'arrivée du parasite dans l'hôte (Giraudoux et al., 2002; Combes, 2001). L'écologie des communautés, la dynamique des populations, l'éthologie et l'écophysiologie apparaissent notamment comme quelques outils indispensables pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le filtre de rencontre (Giraudoux et al., 2003). Plusieurs auteurs soulignent, de plus, le besoin d'élargir les sources de connaissance actuelles en faisant appel à d'autres disciplines que celles classiquement impliquées lors des études parasitaires (Giraudoux et al., 2003; Combes, 2001). De même, Grenfell et al. (2002) prônent la nécessité que les épidémiologistes collaborent avec des spécialistes d'autres champs disciplinaires, tels que les mathématiques (modélisations) ou la génétique.

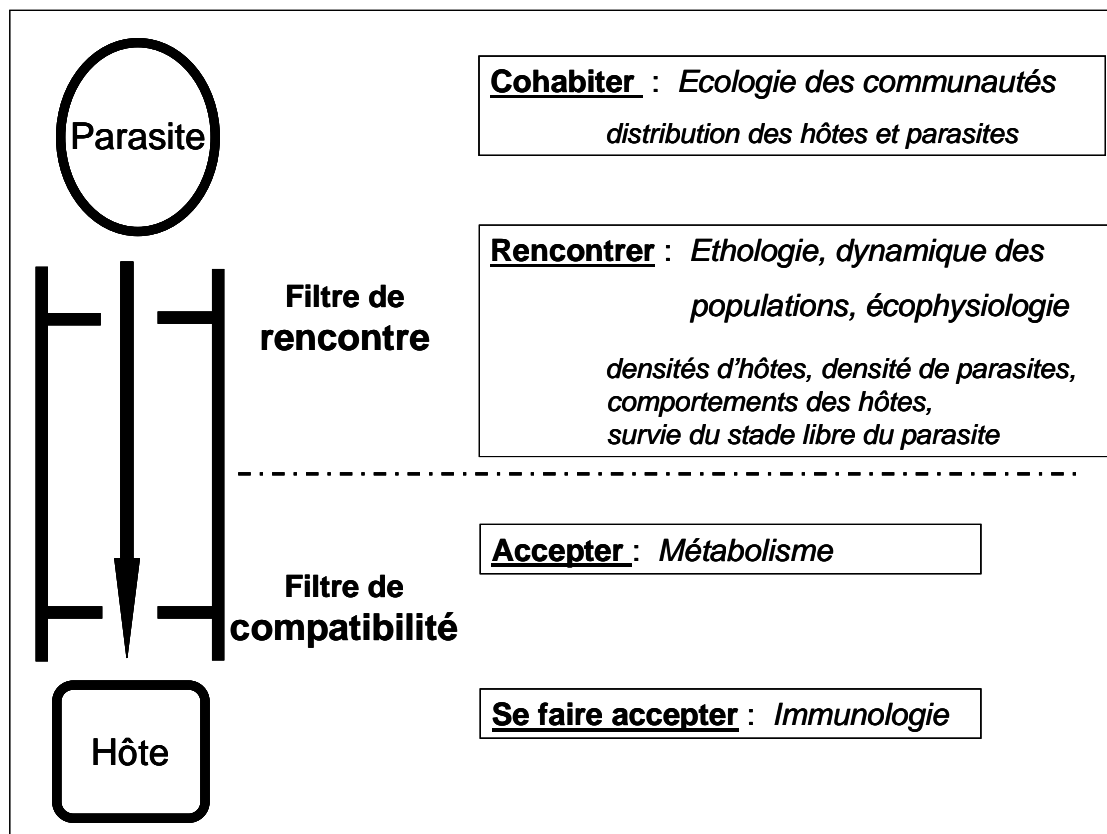


Figure 2 : Le concept de filtres (d'après Combes, 2001 et Raoul, 2001)

Grâce au récent développement des techniques de biologie moléculaire, la génétique est actuellement un domaine en pleine expansion, y compris en ce qui concerne l'étude des parasites. Les avancées technologiques des vingt dernières années permettent à présent d'explorer des pistes jusqu'alors inaccessibles. L'étude des microsatellites, grâce à leur fort pouvoir discriminant dû à leur haut niveau de polymorphisme (Hardy et al., 2003) et en association avec les méthodes PCR (Polymerase Chain Reaction), a notamment permis d'améliorer les connaissances sur la variabilité génétique au sein des populations de pathogènes, tels que *Leishmania*, *Candida*, *Schistosoma* (Bart et al., 2003), élargissant ainsi les possibilités d'études, même pour les parasites à faible polymorphisme apparent.

L'étude génétique des parasites s'avère être un outil majeur pour la compréhension de la transmission et la prévention des zoonoses. Cependant, alors qu'une littérature importante décrit le rôle de l'hétérogénéité génétique des hôtes dans la survenue d'infections liées à des helminthes, en revanche peu de travaux ont porté sur le rôle de la diversité génétique des vers dans l'immunité et la transmission parasitaire (Wilson et al., 2002). Pourtant, les travaux conduits sur le choléra ou la malaria ont montré que, chez les virus, des déterminants génétiques sont responsables des différences de virulence entre variants (Rivera et al, 2001; Craig et Scherf, 2001). De même, chez le protozoaire *Toxoplasma gondii*, différentes études ont montré l'existence de trois lignées clonales différentes au sein de cette espèce, chacune ayant ses propres caractéristiques d'infectivité et de virulence (Su et al., 2003).

Il s'avère donc intéressant d'étudier la variabilité génétique des populations de parasites – y a-t-il plusieurs souches pour une même espèce, ou plusieurs espèces proches pour un genre de parasites? - sachant que des paramètres tels que le système reproductif, l'infectivité, le spectre d'hôtes, les réponses immunitaires des hôtes, la localisation du parasite au sein de l'hôte, sa survie dans le milieu extérieur, peuvent, ou pourraient, différer d'une souche à l'autre ou d'une espèce à l'autre (Criscione et al., 2005; Thompson, 1995; Wilson et al., 2002; Wang et al., 2006a). Ces paramètres pourraient s'avérer cruciaux dans la compréhension des cycles parasitaires et des hétérogénéités constatées, ainsi que dans la prévention et le traitement de la maladie auprès des populations humaines, par des mesures comme le dépistage par sérologie, l'utilisation de vaccins ou de la chimiothérapie (Thompson, 1995).

De plus en plus d'études génétiques sont conduites sur les microparasites pour déterminer dans quelle mesure des échanges ont lieu au sein de leurs populations naturelles (Bush et al., 2001). Il s'agit de déterminer si la structure des populations d'un parasite est clonale comme le propose la théorie de la clonalité, proposée par Tibayrenc et al. (1990), épidémique comme développé par Maynard Smith et al. (1993) qui montrent que certains génotypes sont plus efficaces car ils dominent et masquent les autres génotypes existants, ou encore panmictique, si les croisements sont aléatoires et respectent les lois de la génétique admises. Des travaux sont également conduits pour estimer l'évolution de différentes souches à partir d'une même espèce de parasite, ou celle d'espèces proches au sein d'une même famille, afin de retracer l'histoire d'un parasite et de connaître la date de son arrivée dans une région donnée (Grenfell et al., 2002). Ces travaux sont du domaine de la phylogéographie appliquée à l'étude des parasites qui est, pour l'instant, relativement peu pratiquée bien qu'essentielle lorsque l'on étudie l'émergence des maladies (Criscione et al., 2005).

#### **I.6. Un exemple de zoonose parasitaire émergente : l'échinococcose alvéolaire**

L'échinococcose alvéolaire est une zoonose provoquée par *Echinococcus multilocularis*, un petit ténia, classé parmi les helminthes. Ces derniers représentent respectivement 6 % des maladies infectieuses émergentes et 32 % des zoonoses (Taylor et al., 2001). Cette zoonose est relativement rare. Cependant, l'issue est souvent mortelle si le diagnostic est tardif, et le coût des traitements est élevé (coût de la chimiothérapie seule de 5 500 \$US à 17 800 \$US par an, le coût total pour soigner un patient peut s'élever à 300 000 \$US, Romig et al., 1999b).

L'échinococcose alvéolaire est considérée comme un problème de santé publique lorsque ses taux d'incidence (nombre de cas décelés dans la population par an) dépassent 0,1 pour 100 000 habitants (Craig, 2003). Dans certaines régions du monde, les prévalences sont beaucoup plus élevées: jusque 6 % dans certaines provinces chinoises, davantage encore dans certains villages (Vuitton et al., 2003). De ce fait, l'échinococcose alvéolaire est devenue une préoccupation majeure pour la communauté internationale. Plusieurs programmes de recherche impliquant des spécialistes internationaux sont consacrés à la compréhension du cycle de transmission du parasite: réseau européen de surveillance de l'échinococcose alvéolaire EurEchinoReg; fonds commun du National Institutes of Health - National Science Foundation (RFATW-00-002, appel d'offres « Ecology of Infectious Diseases »).



Pour réaliser son cycle de développement (Figure 3), *Echinococcus multilocularis* se reproduit dans les intestins d'un hôte définitif (un carnivore, généralement un canidé du genre *Vulpes*, mais aussi chiens et chats domestiques) et excrète ses œufs dans l'environnement en même temps que les fèces de l'hôte. Les œufs doivent survivre dans l'environnement jusqu'à leur ingestion par un hôte intermédiaire (un petit mammifère, principalement un rongeur de la sous-famille des *Arvicolinae* ou un lagomorphe du genre *Ochotona*). En Europe, le cycle de développement du parasite implique essentiellement des espèces sauvages (Rausch, 1995). Les oncosphères (premier stade larvaire) sont libérés dans le système digestif de l'hôte intermédiaire et migrent vers le foie, où ils se développent sous forme de structures alvéolaires caractéristiques dans lesquelles de nombreux protoscolex (deuxième stade larvaire) se développent par reproduction asexuée. Le cycle s'achève lorsque l'hôte intermédiaire infecté est consommé par un hôte définitif, permettant ainsi la libération des protoscolex dans le système digestif du renard. L'assemblage d'hôtes définitifs et intermédiaires est très variable selon les régions (Vuitton et al., 2003), et souvent encore inconnu, notamment dans des pays comme la Chine (Giraudoux et al., 2006). De même, les informations sur les prévalences des hôtes (carnivores sauvages et domestiques, petits mammifères, homme) sont parcellaires et les données disponibles de qualité très variable selon les régions (Jenkins et al., 2005).

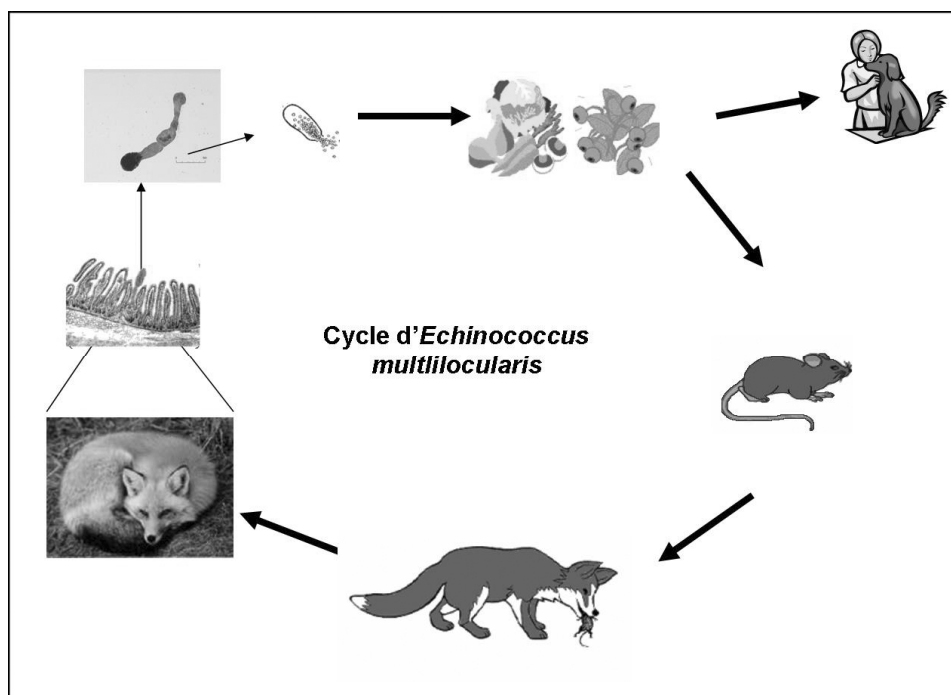


Figure 3. Cycle d'*Echinococcus multilocularis*

Les prévalences chez l'Homme sont difficiles à décrire du point de vue temporel car, comme l'échinococcose alvéolaire est très souvent asymptotique et son évolution très lente, le diagnostic a souvent lieu entre cinq et quinze ans après la contamination (Pawlowski et al., 2001). Cette caractéristique complique singulièrement la détermination des facteurs de risques de contamination humaine, d'autant plus que les sources exactes de contamination restent imprécises et cryptiques: ingestion d'œufs par manipulation de supports contaminés (terre, carnivore infesté sauvage ou domestique), par consommation de nourriture ou d'eau contaminées par des œufs d'échinocoque, par inhalation de poussière de terre porteuse d'œufs (Kern et al., 2004).

Les prévalences humaines sont très hétérogènes spatialement. L'aire de distribution du parasite, déterminée à partir de celles des hôtes contaminés (animaux et homme), s'étend dans l'hémisphère Nord, dans les régions Néarctique et Paléarctique (Giraudoux et al., 2006) (Figure 4). Les taux d'incidence chez l'Homme en Europe varient entre 0,02 et 1,4 pour 100 000 habitants mais, en Chine et sur l'île de Saint-Laurent, elles sont beaucoup plus importantes localement (respectivement jusque 200 pour 100 000 et 98 pour 100 000), alors que, paradoxalement, au sud du Canada et au nord des Etats-Unis, les cas humains sont quasi inexistantes (2 cas, en 1937 et 1977) (Eckert et al., 2001b). Les contaminations humaines sont à relier en partie avec les comportements humains eux-mêmes dépendant des différences de cultures (Vuitton et al., 2003, Giraudoux et al., 2006). Dans les régions du globe où les prévalences sont les plus élevées, les chiens semblent jouer un rôle dans la contamination humaine et les mauvaises conditions d'hygiène favorisent le contact entre le parasite et l'homme (Giraudoux et al., 2006).



Figure 4. Distribution mondiale d'*Echinococcus multilocularis* en 1999 (Eckert et al., 2001)

### **I.7. Approche intégrée de l'étude de la transmission d'*Echinococcus multilocularis***

Quelque soit le système parasite-hôtes impliqué, la perpétuation et l'intensité du cycle d'*Echinococcus multilocularis* dépendent des facteurs climatiques, des dynamiques de populations des espèces hôtes définitifs et hôtes intermédiaires en relation avec le paysage et des relations de prédation entre ces deux types d'hôtes (Giraudoux et al., 2002, 2003). Le mécanisme d'action de ces facteurs sur le filtre de rencontre a été synthétisé pour l'Europe de l'Ouest par Giraudoux et al. (2003) sous la forme d'un schéma (Figure 5) dont les différents points peuvent être commentés de la façon suivante:

- [1] La composition du paysage à un niveau de perception régional influence la dynamique des populations d'espèces hôtes intermédiaires et la structure des communautés de prédateurs. Un paysage riche en prairie, habitat propice aux campagnols prairiaux, favorise l'ouverture du filtre de rencontre.
- [2] Les saisons influencent la transmission, via la survie des œufs du parasite et la structure d'âge des populations d'hôtes (nombre de proies disponibles, charges parasitaires chez les hôtes définitifs). L'hiver semble plus propice que l'été à la rencontre entre les hôtes et les stades infestants du parasite.
- [3] La densité de population des hôtes intermédiaires varie à la fois saisonnièrement et annuellement (reproduction, périodes de pullulations). Lorsqu'elle est élevée, l'ouverture du filtre est importante.
- [4] Les populations d'hôtes intermédiaires sont plus ou moins protégées par les caractéristiques du milieu et par leur comportement. Leur plus ou moins grande accessibilité aux prédateurs conditionne l'ouverture du filtre.
- [5] Les densités de populations des hôtes définitifs varient dans le temps et l'espace. A priori, le filtre de rencontre devrait être plus ouvert lorsque leur densité est élevée que lorsqu'elle est faible.
- [6] La spécialisation du régime alimentaire des renards sur une espèce d'hôte intermédiaire en particulier entraîne une transmission plus intense et donc une ouverture du filtre plus grande.
- [7] À un niveau de perception local, la survie des œufs est meilleure dans les milieux humides que dans les milieux desséchants où le filtre de rencontre est plutôt fermé.

- [8] Les prévalences d'*Echinococcus multilocularis* augmentent dans les zones où les densités de fèces des hôtes définitifs (et donc la densité d'œufs d'*Echinococcus multilocularis*) sont plus importantes.

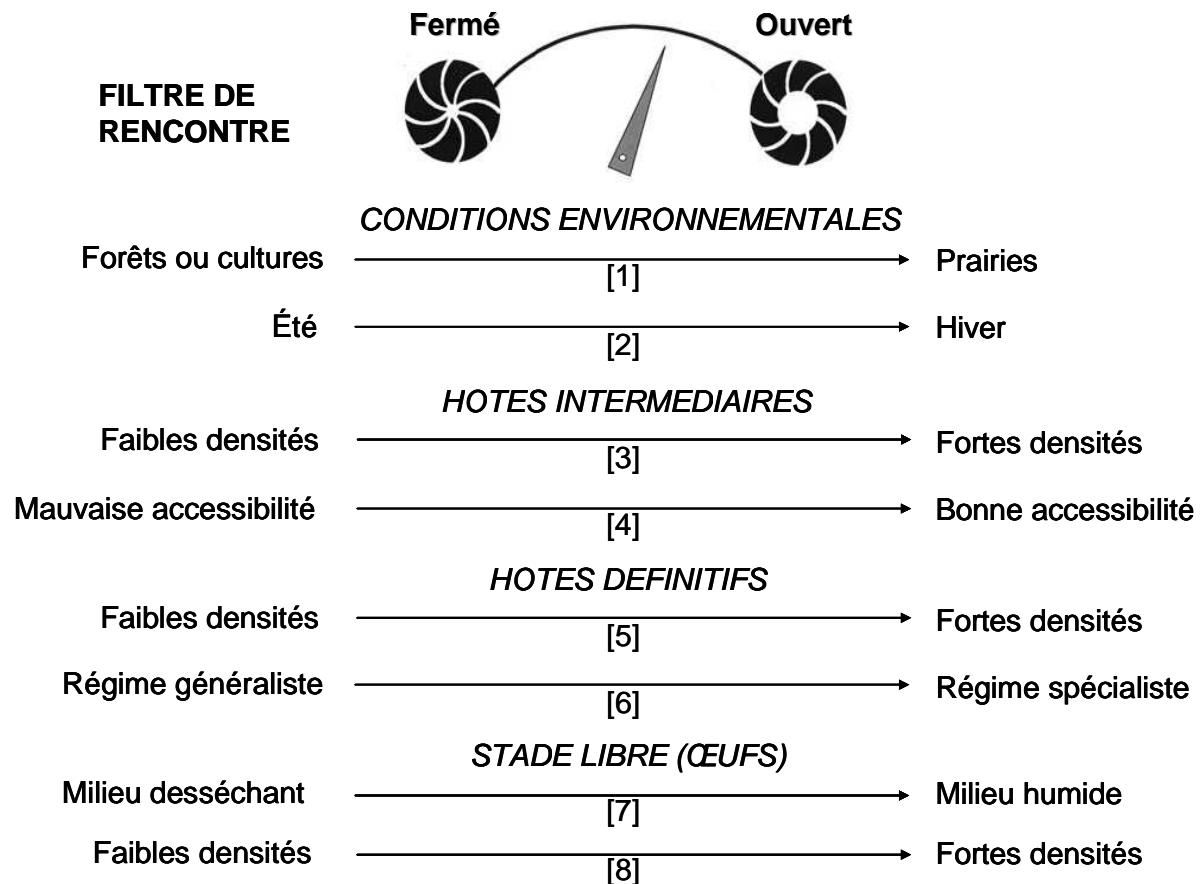


Figure 5. Facteurs influençant la transmission d'*Echinococcus multilocularis* en Europe de l'Ouest (d'après Giraudoux et al., 2003)

C'est grâce à ce type de schéma qu'il est notamment possible de comprendre comment une modification du paysage peut entraîner un accroissement du risque de transmission d'*E. multilocularis*. Des études récentes conduites à une fenêtre de perception régionale ont, en effet, montré que la transmission du parasite et le nombre de cas humains étaient influencés par des modifications de l'utilisation des terres : lorsque la proportion d'habitats optimaux pour une espèce de petit mammifères hôte intermédiaire augmente dans le paysage, des pullulations se produisent, et favorisent la transmission parasitaire (Giraudoux et al., 2003; Viel et al., 1999; Wang et al., 2006b). En Franche-Comté, les habitats optimaux de *Microtus arvalis* et *Arvicola terrestris*, principales espèces hôtes intermédiaires du parasite en

Europe (Rausch, 1995), sont constitués des prairies permanentes, dont la proportion a fortement augmenté entre les années 60 et les années 80, suite à une réorientation des pratiques agricoles en faveur de l'élevage laitier (Giraudoux et al., 1997). Sur les contreforts du plateau tibétain en Chine, les habitats optimaux de *Microtus limnophilus* et *Cricetulus longicaudatus*, principaux hôtes intermédiaires dans cette région, correspondent aux espaces parsemés de buissons qui apparaissent à la suite de la déforestation. Sur le plateau tibétain, les prairies encloses riches en végétation et les zones mises à nu par le surpâturage suite à la réforme du pastoralisme sont les habitats optimaux de *M. limnophilus* et d'*Ochotona curzoniae* et *O. cansus*, trois espèces impliquées dans le cycle d'*E. multilocularis* (Giraudoux et al. 2003, 2006; Raoul et al., 2006).

Les pullulations de rongeurs hôtes intermédiaires amèneraient à une spécialisation du régime alimentaire des renards envers cette nourriture abondante. Ainsi, en Franche-Comté, la consommation d'*A. terrestris* par les renards est corrélée à la biomasse disponible sur le terrain : plus *A. terrestris* est abondant, plus il est consommé, (Raoul, 2001). La probabilité de contamination d'un renard augmenterait avec le nombre de rongeurs hôtes intermédiaires ingérés, expliquant les fortes prévalences observées chez les renards.

Pour que le cycle du parasite fonctionne, il est nécessaire que se superposent spatialement et temporellement des hôtes intermédiaires avérés, des hôtes définitifs avérés, des œufs infestants. Cette superposition spatiale et temporelle est influencée par des facteurs qui varient selon la fenêtre de perception choisie (Giraudoux et al. 2003). La plupart des études sur l'échinococcose alvéolaire sont menées à une étendue continentale ou régionale. Plusieurs sont conduites en zone d'endémie nouvelle pour mettre en évidence la présence du parasite et évaluer la prévalence (Van der Giessen et al., 1999, 2004; Henttonen et al., 2001; Losson et al., 1997, 2003; Vervaeke et al., 2003; Sreter et al., 2003, 2004; Casulli et al., 2005; Reiterová et al., 2006), mais peu quantifient les charges parasitaires portées (Miterpaková et al., 2003; Sréter et al., 2004) ou appréhendent le fonctionnement du cycle (Mártinek et al., 2001; Miterpaková et al., 2003). De même, à l'exception des études en Franche-Comté sur la distribution en fonction, des milieux des fèces de renards et des *M. arvalis* infestés par *E. multilocularis* (Delattre et al., 1988; Giraudoux et al., 2002), peu ou pas d'études détaillent les mécanismes impliqués dans la transmission locale du parasite. Les données à cette fenêtre de perception sont cependant nécessaires à la compréhension du cycle. Une approche intégrée peut permettre de combiner l'apport des données indispensables sur les processus locaux

permettant la réalisation du cycle avec celui des données épidémiologiques régionales de prévalence chez les hôtes naturels et l'homme.

### I.8. Objectifs de l'étude

Dans ce contexte, l'objectif de la présente étude est d'étudier les facteurs qui permettent la réalisation du cycle d'*E. multilocularis* dans les Ardennes françaises. Nous avons choisi de mener notre étude dans cette région car, si dans les années 1990 elle était encore située en limite nord-ouest de ce qui était considéré comme la zone de distribution européenne du parasite (Eckert et al., 2001b, figure 6a), elle est désormais considérée comme une zone d'endémie nouvellement connue (figure 6b).

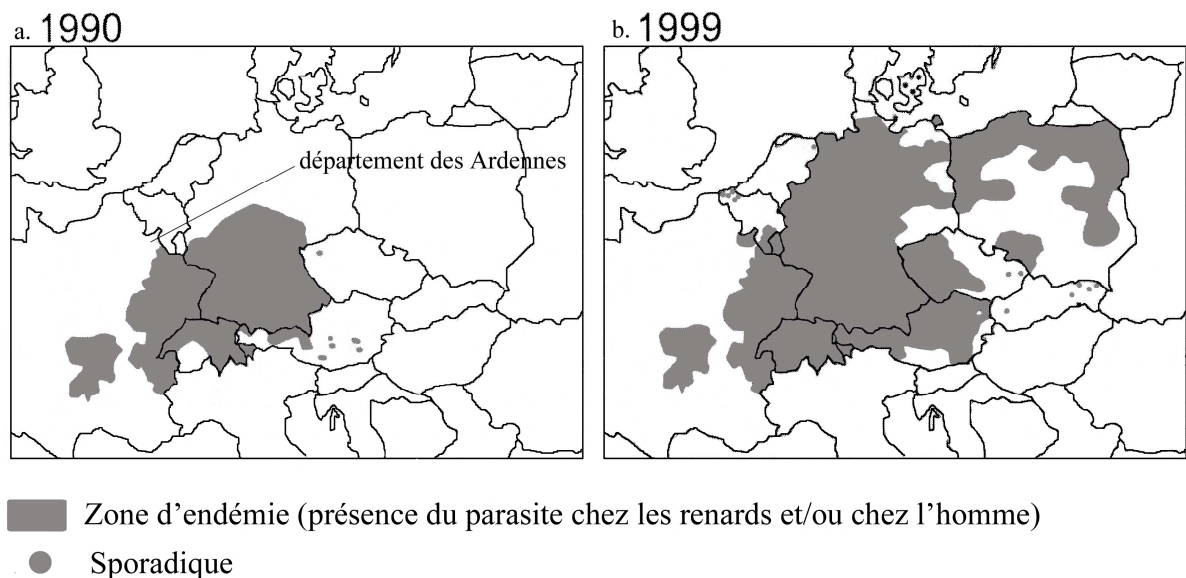


Figure 6. Distribution géographique approximative d'*E. multilocularis* en Europe centrale en 1990 et 1999 (d'après Eckert et al., 2000)

Le premier cas humain d'échinococcose alvéolaire a été détecté dans le département des Ardennes en 1984 (Depaquit et al., 1998) et onze nouveaux cas ont été recensés depuis (source Réseau FrancEchino, 2005, comm. pers.). Sept fèces de renards positives ont été détectées dans le nord et l'ouest du département dans le cadre de la cartographie d'*E. multilocularis* en France menée par l'Entente Rage et Zoonoses, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des aliments et l'Université de Franche-Comté ([www.ententeragezoonoses.com](http://www.ententeragezoonoses.com)). De plus, des renards positifs ont été détectés sur l'ensemble du département entre 1999 et 2003, pour une prévalence globale de 37% (Boucher et al.,

2005). Ce sont les seules données sur les prévalences d'*E. multilocularis* chez le renard pour cette zone de nouvelle endémie, de même les données sur le fonctionnement du cycle dans cette région étaient, au démarrage de cette étude, quasi inexistantes. Cette étude qui vise à combler ces lacunes, a été conduite dans le cadre d'une approche intégrée, en considérant plusieurs étendues et grains (Figure 7):

- La première partie de l'étude est axée sur la description du fonctionnement du cycle d'*E. multilocularis* dans une zone de récente endémie connue. Elle fait l'objet de deux publications en cours de soumission:

**Guislain, M.-H.**, Raoul, F., Giraudoux, P., Terrier, M.E., Ferté, H. & Poulle, M.-L. Caractéristiques du système de transmission d'*Echinococcus multilocularis* dans une région de récente endémie.

Knapp, J., **Guislain, M.-H.**, Bart, J.-M., Raoul, F., Gottstein, B., Giraudoux, P., Piarroux, R. *Echinococcus multilocularis* in the region of the French Ardennes: investigation of the genetic polymorphism by microsatellite targets.

La suite de l'étude (deuxième et troisième partie) est axée sur les aspects spatiaux de la transmission:

- La deuxième partie de l'étude est une caractérisation des conditions environnementales associées à la distribution spatiale des renards infectés. L'étendue est régionale (900 km<sup>2</sup>), elle correspond au terrain d'étude caractérisé en première partie ; le grain est local (1 km<sup>2</sup>), il correspond au biotope dans lequel vit le renard. Cette partie fait l'objet d'une publication en cours de soumission:

**Guislain, M.-H.**, Knapp, J., Poulle, M.-L., Raoul, F., Giraudoux, P. Factors influencing the spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* infection of red fox on a 1 km<sup>2</sup> resolution.



- La troisième partie de l'étude porte sur les facteurs locaux permettant la juxtaposition et la rencontre entre les œufs et les hôtes intermédiaires. L'étendue est locale (90 km<sup>2</sup>), elle correspond au biotope dans lequel le renard se déplace; le grain est micro-local (1000 m<sup>2</sup>), il correspond aux différents milieux rencontrés par les renards et les rongeurs. Cette partie fait l'objet d'une publication en cours de soumission:

**Guislain, M.-H.;** Raoul, F., Poulle, M.-L., Knapp, J., Giraudoux, P. Fox faeces and vole distribution: a local range approach to *Echinococcus multilocularis* transmission.

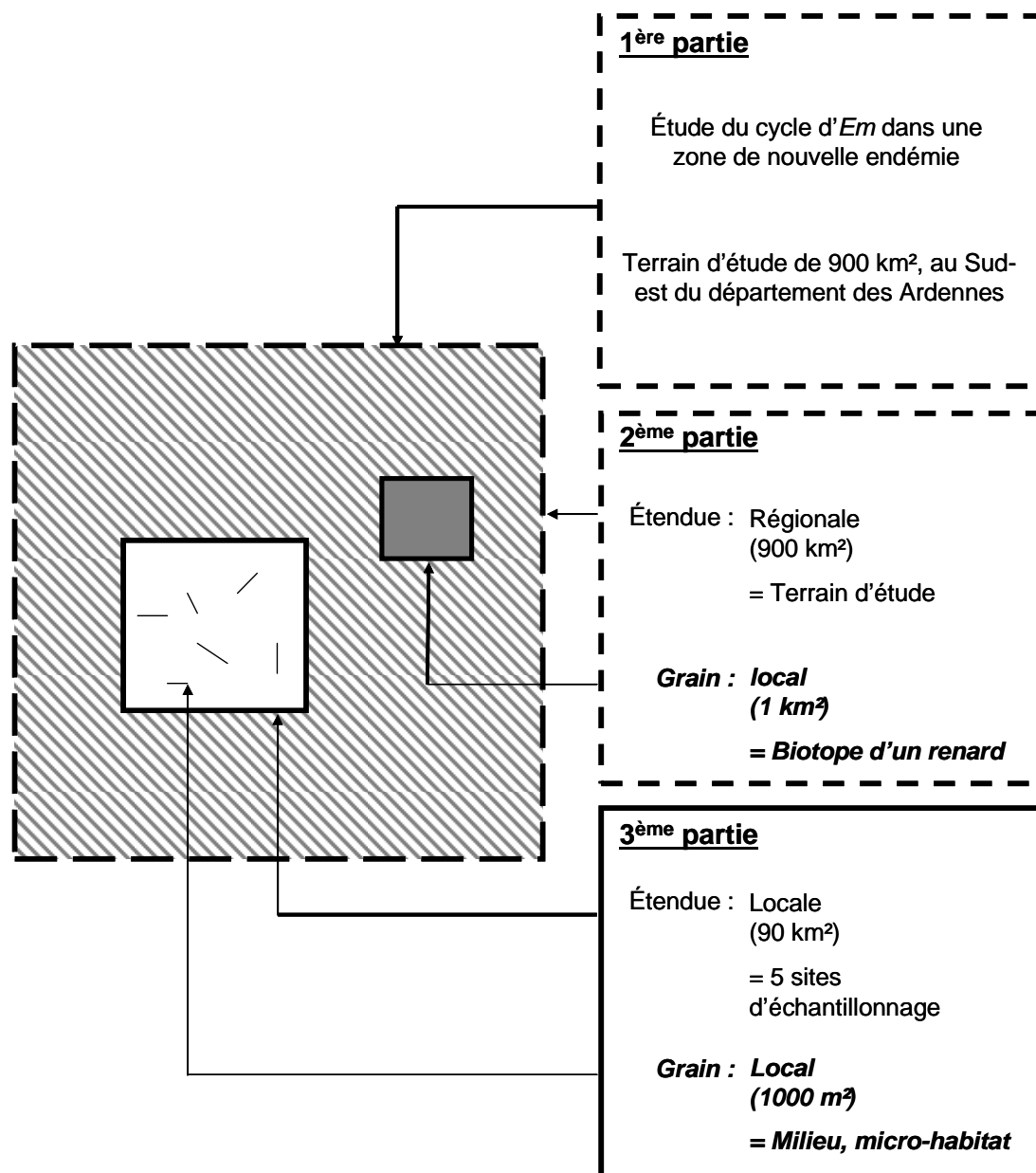


Figure 7. Schématisation des différents niveaux de perception abordés au cours de la thèse

## **II. PREMIERE PARTIE**

**Fonctionnement du cycle  
d'*Echinococcus multilocularis*  
dans une région de récente endémie**



## **II.1. Objectifs de la première partie**

Ces dernières années, l'échinococcose alvéolaire est apparue comme une maladie émergente dans de nombreuses régions de l'hémisphère Nord (Romig et al., 2006 ; Ito et al., 2003). De plus, dans les zones d'endémie de l'Europe de l'Ouest, les prévalences d'*Echinococcus multilocularis* dans les populations de renards et de rat musqué (cette dernière espèce étant considérée comme indicatrice de la contamination environnementale) indiquent que la biomasse parasitaire est apparemment plus élevée qu'auparavant (Romig et al., 1999a). Enfin, le parasite est maintenant détecté chez les renards, mais aussi chez l'homme, dans des zones où il semblait jusqu'à présent absent (Eckert et Deplazes, 2004). Le risque de transmission du parasite à l'homme semble donc en accroissement et, pour le réduire, il importe désormais d'identifier les facteurs responsables des prévalences élevées chez le renard, notamment en zone de nouvelle endémie.

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude est de préciser le fonctionnement du cycle d'*Echinococcus multilocularis* dans une région dite 'de nouvelle endémie' pour identifier les hôtes impliqués, estimer l'intensité de la transmission et définir les conditions environnementales propices à cette transmission. Le site d'étude choisi est le sud du département français des Ardennes, situé dans le nord-est de la France. L'intérêt du site est double : il est situé en limite de la zone connue de répartition du parasite en Europe de l'Ouest (Vuitton et al., 2003; Romig et al., 2006), et des cas humains autochtones y sont détectés depuis les années 80 (Piarroux et al., 2006). De plus, les descriptions des prévalences dans la faune sauvage et du cycle parasitaire y sont quasi inexistantes.

Par des comptages aux phares de renards, par la collecte et l'autopsie de cadavres de renards, et par l'estimation du régime alimentaire des renards et de l'abondance des rongeurs, nous chercherons à répondre aux questions suivantes:

- Quelle est la situation de la zone d'étude, en terme de prévalence et de distribution des charges parasitaires chez le renard, par rapport aux autres zones d'émergence et aux zones d'endémie anciennes d'Europe de l'Ouest?
- Quels sont les hôtes intermédiaires potentiellement impliqués dans la transmission chez le renard?

Ces aspects sont traités dans l'article suivant (**article 1**) intitulé:

**Guislain, M.-H.**, Raoul, F., Giraudoux, P., Terrier, M.E., Ferté, H. & Poulle, M.-L. Caractérisation du système de transmission d'*Echinococcus multilocularis* dans une région de récente endémie.

De plus, par une étude conduite en biologie moléculaire, nous nous sommes intéressés aux questions suivantes:

- La diversité génétique des parasites rencontrés chez le renard dans le Sud des Ardennes permet-elle de distinguer plusieurs génotypes?
- Dans cette région, le niveau de contamination des renards diffère-t-il selon le génotype parasitaire?

Ces aspects sont traités dans l'**article 2** intitulé:

Knapp, J., **Guislain, M.-H.**, Bart, J.-M., Raoul, F., Gottstein, B., Giraudoux, P., Piarroux, R. *Echinococcus multilocularis* in the region of the French Ardennes: investigation of the genetic polymorphism by microsatellite targets.

## II. 2. Article 1

### CARACTÉRISATION DU SYSTÈME DE TRANSMISSION D'*Echinococcus multilocularis* DANS UNE RÉGION DE RÉCENTE ENDÉMIE

Guislain Marie-Hélène <sup>1,2</sup>, Raoul Francis <sup>1</sup>, Giraudoux Patrick <sup>1</sup>, Terrier Marie-Eve <sup>3</sup>, Ferté Hubert <sup>4,5</sup> & Poulle Marie-Lazarine <sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>) Laboratoire de Biologie Environnementale, usc INRA-EA 3184, Université de Franche-Comté, 1 place Leclerc, 25030 Besançon, France

<sup>2</sup>) 2C2A-CERFE, rue de la Héronnière, 08240 Boulton-aux-Bois, France

<sup>3</sup>) AFSSA-LERPAS, Technopôle Agricole et Vétérinaire, B.P. 40 009, 54220 Malzeville, France

<sup>4</sup>) Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, EA 3800, UFR de Médecine, IFR 53, 51 rue Cognac-Jay, 51095 Reims Cedex, France

<sup>5</sup>) EA 3800, UFR de Pharmacie, 51 rue Cognac-Jay, 51095 Reims Cedex, France

#### Résumé

Une extension de l'aire de répartition connue d'*Echinococcus multilocularis*, cestode responsable de l'échinococcose alvéolaire, a été mise en évidence ces dernières années dans de nombreuses régions européennes, dont les Ardennes françaises, où a été conduite la présente étude de 2001 à 2005. La prévalence du parasite chez le Renard roux, *Vulpes vulpes*, hôte définitif du parasite, a été estimée à partir d'autopsies de cadavres collectés auprès des piégeurs et sur le bord de la route. Elle atteint 53% (IC 95% : 45-61%). Les charges parasitaires sont très variables d'un renard à l'autre (de 2 à 73380 vers) : 8% des renards portent 72% de la charge parasitaire. Le régime alimentaire des renards a été estimé par l'analyse des restes non consommés contenus dans 144 fèces et 98 estomacs. L'abondance relative de *Microtus arvalis* et *Arvicola terrestris*, hôtes intermédiaires du parasite, a été estimée par des transects de recherche d'indices, tandis que celle des rongeurs forestiers l'a été par des sessions de captures. *Microtus sp.* est le rongeur prairial le plus abondant sur le terrain d'étude. De plus, il est présent dans un tiers des estomacs et fèces analysés et représente plus des deux tiers des rongeurs consommés. Sa consommation est corrélée à son abondance relative sur le terrain ( $rs=0.9$ ,  $p=0.019$ ). En revanche, *A. terrestris* est très peu

présent et très peu consommé. Les rongeurs forestiers sont peu consommés, quelle que soit leur abondance relative. Cette étude confirme, dans une région qui ne semble pas soumise à des pullulations de rongeurs prairiaux, l'importance de l'intensité de la consommation des hôtes intermédiaires par l'hôte définitif dans la transmission du parasite.

**Mots-clés :** *Echinococcus multilocularis*, *Vulpes vulpes*, *Microtus sp.*, régime alimentaire, endémie, transmission parasitaire

## Introduction

*Echinococcus multilocularis* est un parasite dixène, responsable de l'échinococcose alvéolaire, une zoonose rare mais mortelle lorsqu'elle est diagnostiquée tardivement. L'hôte intermédiaire de ce parasite est un herbivore qui se contamine en ingérant des œufs présents dans l'environnement. Le parasite se développe de façon asexuée dans le foie de l'hôte intermédiaire et produit de nombreux protoscolex. L'hôte définitif est un carnivore, qui se contamine par consommation d'hôtes intermédiaires, et dans l'organisme duquel se produit la maturation des protoscolex en vers et la production d'œufs. L'hôte définitif rejette les œufs d'*E. multilocularis* dans l'environnement extérieur par l'intermédiaire de ses fèces. En Europe, le cycle de développement d'*E. multilocularis* implique principalement le renard roux (*Vulpes vulpes*) et les campagnols prairiaux : *Microtus arvalis* et *Arvicola terrestris* (Rausch, 1995).

La distribution historique connue de ce parasite est décrite comme restreinte à la toundra en Alaska et au Canada, et à l'est de la France (notamment la Franche-Comté), le sud de l'Allemagne et une partie de la Suisse et de l'Autriche pour l'Europe (Romig et al., 1999a). Dans les années 60, une extension probable de cette zone d'endémie historique a été soupçonnée vers le nord des Etats-Unis, et une extension similaire vers l'Europe de l'Est a été supposée dans les années 80 (Eckert et Deplazes, 2004; Romig et al., 1999a). Cependant, jusqu'aux années 90, la distribution géographique d'*E. multilocularis* en Europe était délimitée principalement à partir de celle des cas humains d'échinococcose alvéolaire. Depuis, la recherche du parasite chez le renard entreprise par plusieurs équipes européennes, a conduit à l'identification de nouvelles zones d'endémie au Danemark, Pays-Bas, Belgique, Hongrie, Pologne, Républiques Tchèque et Slovaque, Lituanie et Nord de l'Italie, dans les zones adjacentes aux foyers d'endémie initialement identifiés (Romig et al., 2006). De plus, le pourcentage de renards infectés semble actuellement en augmentation dans les zones

d'endémie, ce qui pourrait être dû à une augmentation des densités de renards (Romig et al., 1999a; Raoul et al., 2003; König et al., 2005; Duscher et al., 2006). En France, même si des données fiables manquent pour une grande partie du pays (Romig et al., 2006), l'aire de distribution connue du parasite semble également en expansion ([www.ententeragezoonoses.org](http://www.ententeragezoonoses.org)). Face à ce constat, un des enjeux actuels est d'identifier les caractéristiques écologiques et les composantes du cycle de développement du parasite associées aux fortes prévalences vulpines, pour espérer être en mesure de prévenir les risques de transmission à l'Homme.

Plusieurs travaux conduits en Europe mettent en évidence un lien entre les prévalences vulpines et la composition du paysage (Pesson et Carbiener, 1989; Staubach et al., 2001; Raoul et al., 2001b). Les fortes prévalences relevées sur les plateaux Jurassiens (Est de la France, 600-900m d'altitude) apparaissent associées à une proportion élevée de prairies permanentes dans le paysage (Raoul et al., 2001a), qui favorise l'émergence régulière de périodes de pullulations des rongeurs prairiaux (Delattre et al., 1992; Giraudoux et al., 1997; Fichet-Calvet et al., 2000). Au cours de ces pullulations, le renard pratique une prédation spécialisée sur ces rongeurs hôtes intermédiaires (Weber et Aubry, 1993; Giraudoux et al., 2002). Ainsi, le comportement de prédation du renard et les densités d'hôtes intermédiaires apparaissent comme des facteurs clés dans la transmission du cycle sylvatique d'*E. multilocularis* (Giraudoux et al., 2002).

L'objectif de la présente étude est de caractériser le portage (en terme de prévalence et charge parasitaire) d'*E. multilocularis* par les renards et les facteurs clés du fonctionnement du cycle parasitaire dans une région de récente endémie connue : le département des Ardennes. Ce département, situé en limite nord-ouest de ce qui était considéré dans les années 90 comme la zone de distribution européenne du parasite (Eckert et al., 2001b), est identifié comme une zone d'endémie nouvellement connue (Vuitton et al., 2003; Romig et al., 2006) depuis le diagnostic, en 1984, du premier cas humain d'échinococcose alvéolaire (Depaquit et al., 1998). Depuis, onze nouveaux cas ont été recensés (source Réseau FrancEchino, 2005, comm. pers.). Au cours de la présente étude, la prévalence du parasite chez le renard roux a été mise en relation avec la densité de renards, avec celle des campagnols prairiaux et avec l'importance de la consommation de ces campagnols par le renard.



## Matériel et Méthodes

### *Terrain d'étude*

Le terrain d'étude s'étend sur 900 km<sup>2</sup> dans le sud-est du département des Ardennes et sur trois communes du département de la Meuse (Figure 1). Il est situé dans la région agricole de l'Argonne, soumise à un climat semi continental caractérisé par des hivers longs et une forte amplitude thermique diurne en été. Les moyennes enregistrées par Météo France sur l'ensemble du département et sur l'année, sont de 64 jours de gel, 39 jours pour lesquels la température est supérieure à 25 C et 60 mm de précipitations par mois. Le relief est vallonné et l'altitude moyenne est de 250 m (de 100 à 350 m d'altitude). En Argonne ardennaise, la Surface Agricole Utile (SAU) représente 60% du total des terres, le reste étant recouvert majoritairement par la forêt, qui représente 35% du total des terres (données 2003 DDAF 08). La Surface Agricole Utile est constituée à 53% de prairies, soit 31,6% du total des terres, et à 46% de terres cultivées, soit 27,8% du total des terres (données 2003 DDAF 08). C'est une région rurale et faiblement peuplée (environ 10 habitants au km<sup>2</sup>). La population est répartie en petits villages isolés.

### *Détermination du taux de contamination des renards*

De janvier 2001 à août 2005, 149 cadavres de renards ont été collectés auprès de piégeurs ou ramassés en bord de route. La période de collecte a été divisée en quatre saisons: hiver (janvier à mars), printemps (avril à juin), été (juillet à septembre) et automne (octobre à décembre). Comme le nombre de cadavres collectés a été relativement faible les trois premières années (7 en 2001, 25 en 2002 et 18 en 2003) les données de ces trois années ont été regroupées. Tous les cadavres ont été stockés à -20°C en attendant la réalisation des autopsies, qui a eu lieu trois à quatre fois par an. Chaque individu autopsié a été sexé et son appartenance à la classe d'âge « juvénile » (< 1an) ou « adulte » (> 1an) a été estimée en fonction du degré de fermeture du canal pulpaire d'une canine inférieure (Goddard et Reynolds, 1993). Les estomacs et les intestins ont été prélevés, puis décontaminés pendant une semaine à -80°C (Eckert et al. 2001a).

La recherche d'*E. multilocularis* dans les intestins a été effectuée en suivant la « Sedimentation and Counting Technique » (SCT), considérée comme étant la technique de référence (Eckert, 2003), et en suivant les recommandations de Raoul et al. (2001a). Les intestins ont été incisés longitudinalement et débarrassés des éventuels macro-restes, avant d'être nettoyés dans de l'eau distillée. La muqueuse intestinale a été grattée délicatement entre deux doigts afin de récupérer, dans l'eau distillée, les parasites présents au niveau des

villosités. Le culot, constitué de l'eau distillée provenant du lavage des intestins, a été examiné sous une loupe binoculaire (x 60) par petites fractions, diluées si nécessaires pour obtenir une lisibilité suffisante. Les parasites ont été identifiés sur la base de critères morphologiques. Lorsque le culot examiné semblait contenir moins de cent vers, le nombre total de vers a été comptabilisé sur son intégralité. En revanche, lorsqu'il contenait a priori plus de cent vers, la comptabilisation précise du nombre de vers a été réalisée sur 20% de son volume préalablement homogénéisé. La charge parasitaire totale de l'individu autopsié a ensuite été déduite en multipliant le nombre de vers trouvés par cinq. Un renard était déterminé comme étant négatif lorsque tout le culot était entièrement lu et qu'aucun parasite n'était retrouvé.

#### *Estimation de la densité de renards*

La densité de renards a été estimée par comptages aux phares, en appliquant la méthode du « Distance Sampling » par « Line Transects » selon les recommandations de Ruelle et al. (2003a). Cette méthode permet, via l'estimation de la largeur échantillonnée, d'obtenir des estimations de densités (nombre moyen de renards par km<sup>2</sup>), et non pas un indice relatif de l'abondance comme c'est le cas avec les Indices Kilométriques d'Abondance. Les comptages ont été réalisés de 2002 à 2006 en hiver, durant les mois de janvier et février, c'est-à-dire après la période de dispersion des jeunes renards et avant la période de mise-bas, lorsque la population de renards adultes est la plus stable. Dix parcours ont été réalisés chaque hiver. Chaque parcours de comptage était composé de dix tronçons d'un kilomètre, répartis de façon systématique le long de chemins ou routes, sur un secteur de 100 km<sup>2</sup> au nord de la zone d'étude (Figure 1). Les comptages ont eu lieu entre 21 h et 1 h, à partir d'un véhicule roulant à faible allure (10 à 20 km/h), en éclairant simultanément les deux côtés de la route à l'aide de projecteurs tenus à la main. La distance perpendiculaire entre la route et le renard détecté (à sa position initiale) était relevée à l'aide d'un télémètre à visée laser (Leica).

Le principe de la méthode de Distance Sampling repose en effet sur le postulat que la probabilité de voir un animal décroît lorsque la distance entre l'animal et l'observateur augmente. A partir de l'histogramme des distances d'observations est opérée une sélection de modèles pour identifier la fonction de détection  $g(x)$  la mieux adaptée aux données. La densité est ensuite estimée à l'aide du logiciel DISTANCE 4.2 (Laake et al., 1993), selon l'équation

développée par Buckland et al. (1993):  $\hat{D} = \frac{n}{2 \cdot L \cdot ESW}$  (Buckland et al., 1993) pour

laquelle  $n$  est le nombre d'observations,  $L$  la longueur totale de transects parcourue,  $n / L$  est

appelé « taux de rencontre » et ESW est la largeur effective prospectée calculée à partir de la fonction de probabilité de densité à la distance 0. Les bornes de l'intervalle de confiance à 95 % sont déduites du coefficient de variation et calculées par le logiciel selon la formule :  $CV(D)^2 = CV(n/L)^2 + CV(P_a)^2$ , où  $P_a$  est la probabilité de détecter un animal sur la surface totale du transect.

#### *Estimation des densités d'hôtes intermédiaires*

L'abondance de rongeurs en milieu forestier a été estimée par piégeage en ligne selon la méthode développée par Spitz et al. (1974). Les pièges utilisés sont de type INRA, déposés en lignes de 100 m, contenant chacune 34 pièges, à raison d'un piège tous les trois mètres, relevés durant trois jours consécutifs. Entre octobre 2000 et octobre 2005, des sessions de piégeages ont été réalisés au printemps (mars) et en automne (octobre), dans un secteur de 600 ha situé au nord-est du terrain d'étude (Figure 1). Onze à quatorze lignes de pièges ont été posées par session et réparties dans six milieux, considérés comme représentatifs des principaux types de couverture forestière (tableau Ia). Les rongeurs capturés ont été autopsiés afin de rechercher la présence éventuelle de larves enkystées d'*E. multilocularis* sur leur foie.

L'abondance de rongeurs prairiaux a été estimée par la méthode indiciaire (Delattre et al., 1999; Quéré et al., 2000) qui est basée sur la reconnaissance d'indices présents en surface et qui est calibrée par des densités estimées à partir de piégeage (Hansson, 1979; Fichet-Calvet et al., 1999). Pour le campagnol terrestre, *A. terrestris*, les indices de surface considérés sont les tumuli de terre ayant une forme et une répartition spatiale caractéristiques de l'espèce (Giraudoux et al., 1995). Pour le campagnol des champs, *M. arvalis*, il s'agit de coulées apparentes dans la végétation, associées à des entrées de galeries, avec présence de végétation récemment consommée et/ou présence de fèces (Quéré et al., 2000). Les indices de présence sont relevés en parcourant à pied des transects divisés en intervalles contigus de 10 m de long et 4 m de large. La présence/absence d'indice de présence est notée pour chaque intervalle. La densité relative est exprimée en pourcentage d'intervalles positifs. Les transects ont été effectués aux mois de mars et octobre, en 2004 et 2005, ainsi qu'en décembre 2004 (tableau I b), à des périodes durant lesquelles la végétation au sol est relativement courte et les indices de présence bien visibles. De plus, les débuts de printemps (mars) et d'automne (octobre), correspondent généralement, respectivement, au minima et maxima de densités de rongeurs. Les transects ont été effectués sur cinq sites (figure 1) et dans huit milieux (tableau I b): layon forestier, lisières (quatre types : lisière à végétation rase, lisière à végétation moyenne, haie,

talus) et parcelles (trois types : culture, prairie pâturée, prairie fauchée), à raison d'1 km de transects par milieu et par site. Comme les indices de présence de *Microtus arvalis* peuvent être confondus avec ceux de *Microtus agrestis*, également présents sur la zone d'étude, nous avons considéré que les indices relevés correspondaient au genre *Microtus* sans distinction spécifique.

#### *Régime alimentaire du renard roux*

Le régime alimentaire du renard a été estimé, d'une part, à partir de l'identification des restes non digérés trouvés dans les estomacs de renards prélevés sur les cadavres collectés et, d'autre part, à partir des fèces de renards collectées au cours des transects. L'analyse des fèces a permis de relier le régime alimentaire à la disponibilité des proies, puisque les fèces ont été collectées lors des relevés des indices d'abondance des rongeurs prairiaux. Ces relevés ont lieu, de plus, à proximité du site d'estimation des densités de rongeurs forestiers (Figure 1). L'importance d'un éventuel biais dans l'estimation du régime alimentaire a été estimée en comparant les résultats issus des fèces à ceux provenant de l'analyse des estomacs.

Les estomacs et fèces ont été décontaminés à -80°C puis décongelés et nettoyés à l'eau au-dessus d'un tamis à maille de 500 µ. Les fractions macroscopiques ont été récupérées et examinées. L'identification spécifique des restes de mammifères a été effectuée par examen des dents pour les rongeurs lorsque cela était possible (Erome et Aulagnier, 1982), et/ou par examen des poils (Debrot et al., 1982). Les fréquences d'apparition des rongeurs prairiaux (*Microtus sp.*, *A. terrestris*), des rongeurs forestiers (*Apodemus sp.*, *Clethrionomys glareolus*), des mammifères autres que rongeurs, des oiseaux, des invertébrés et des fruits ont été déterminées relativement au nombre de fèces ou estomacs examinés (pourcentage de fèces ou d'estomacs contenant l'item considéré). Notre choix a porté sur la méthode des fréquences d'apparition (plutôt que le poids des restes ou le calcul de la biomasse) car c'est la méthode la mieux adaptée (simplicité, rapidité, comparaison facile avec d'autres études) lorsque l'on veut déterminer uniquement la composition et les proportions relatives des proies consommées (Corbett, 1989; Ciucci et al., 1996).

#### *Analyses statistiques*

La comparaison des densités de renard entre années a été effectuée selon la procédure suivie par Ruelle et al. (2003a) qui consiste à comparer les fonctions de détection de chaque année à une fonction de détection commune construite en sommant les données de toutes les années, à sélectionner le modèle ayant la plus faible valeur du Critère d'Information d'Akaike (AIC) et

à comparer les estimations de densités entre années avec le test généralisé de  $\chi^2$  décrit par Sauer et Williams (1989). L'analyse est réalisée à l'aide du logiciel Excel.

L'analyse par régression logistique a été utilisée pour tester l'effet des variables « années », « saisons », « classe d'âge » et « sexe » sur le portage parasitaire (présence ou absence du parasite chez un renard). Plusieurs modèles sont construits, en incorporant successivement les variables sexe (on suppose que le sexe n'a pas d'effet sur le portage ou la charge), année, saison et âge. Les modèles sont comparés entre eux selon la méthode proposée par Burnham et al. (2002) et présentés selon Anderson et al. (2001). La même méthodologie est appliquée pour l'étude de la charge parasitaire (nombre de vers porté par un renard), en utilisant cette fois des modèles binomiaux négatifs, qui permettent de tenir compte de l'agrégation parasitaire (Hudson et al., 2002). Ces analyses ont été réalisées avec le logiciel R 2.2.1 (R Development Core Team, 2005) et le package *pgirmess* 1.2.5.

Les fréquences d'apparition de chaque catégorie alimentaire dans les fèces et les estomacs ont été comparées à l'aide de tests  $\chi^2$  de Pearson. Les fréquences d'apparition de chaque espèce de rongeurs dans les fèces et les estomacs ont été comparées à l'aide de tests  $\chi^2$  exacts (logiciel StatXact). La relation entre les densités relatives de *Microtus sp.* et *A. terrestris* et leurs fréquences relatives d'apparition dans les fèces collectées sur les transects d'estimation de densités de rongeurs prairiaux a été testée par un test de rangs de Spearman (Siegel & Castellan, 1988).

## Résultats

### *Densités de renards*

La densité de renards n'a pas varié de façon significative de 2002 à 2006 ( $\chi^2 = 5,36$ , ddl = 4,  $p = 0,25$ ), passant d'un peu moins de 3 renards / km<sup>2</sup> à un peu moins de 4 renards / km<sup>2</sup>, avec des coefficients de variation des densités allant de 0,16 à 0,23 (tableau II).

### *Portage et charges d'Echinococcus multilocularis chez les renards*

Sur les 149 renards examinés, 79 étaient porteurs du parasite, soit une prévalence de 53 % (Intervalle de confiance : 95 % : 45,4 – 60,6 %). La prévalence a varié de 46 % (33,7 – 58,8 %) à 61,11% (46,2 – 74,5 %) selon le sexe, la classe d'âge, l'année et la saison considérée (tableau III). Le modèle final retenu ne prend cependant en compte aucune de ces variables (tableau IV a). Le fait qu'un renard soit infecté ou non ne dépendait donc ni du sexe, ni de la classe d'âge de l'individu, ni de l'année, ni de la saison à laquelle son cadavre a été collecté.

Les charges parasitaires relevées ont varié de 2 à 73 380 vers, pour une biomasse parasitaire totale de 270 270 vers. Ces charges parasitaires étaient distribuées de façon hétérogène, puisque 7,6 % des renards autopsiés portaient 71,7% de la biomasse parasitaire (Tableau V). Le modèle final retenu pour expliquer la charge parasitaire n'a cependant pris en compte ni le sexe, ni la classe d'âge, ni l'année, ni la saison (tableau IV b). Ainsi, ces variables n'expliquaient pas non plus les charges parasitaires rencontrées chez les renards étudiés.

#### *Régime alimentaire du renard et relation avec les densités de rongeurs*

Un total de 145 estomacs a pu être récupéré à partir des cadavres de renards, dont 47 qui ne contenaient aucun reste alimentaire nutritif. L'analyse a donc porté sur 98 estomacs et 144 fèces. Le nombre d'estomacs analysés par année de collecte était de 26 pour la période 2001-2003, de 49 pour 2004 et de 23 pour 2005, tandis que le nombre de fèces analysées par mois de collecte était de 60 pour mars 2004, de 29 pour octobre 2004, de 24 pour décembre 2004, de 22 pour mars 2005 et de 9 pour octobre 2005.

Les fréquences d'apparition ont différencié significativement entre les estomacs et les fèces pour les catégories suivantes: mammifères autres que rongeurs ( $\chi^2 = 48,740$ ,  $p < 0,001$ ), oiseaux ( $\chi^2 = 17,030$ ,  $p < 0,001$ ) et fruits ( $\chi^2 = 14,100$ ,  $p < 0,001$ , tableau VI). En revanche, les fréquences d'apparition n'ont pas différencié entre estomacs et fèces pour les invertébrés ( $\chi^2 = 3,021$ ,  $p = 0,082$ ) et les rongeurs ( $\chi^2 = 0,135$ ,  $p = 0,713$ ).

Les rongeurs représentent la catégorie alimentaire prédominante, puisqu'ils apparaissent dans 51 % des estomacs et 49 % des fèces analysées. Les fréquences d'apparition des différentes espèces de rongeurs ne diffèrent pas entre estomacs et fèces (*Microtus sp.*:  $\chi^2 = 0,028$ ,  $p = 0,866$ ; *A. terrestris*:  $\chi^2 = 2,561$ ,  $p = 0,126$ ; *Apodemus sp.*:  $\chi^2 = 0,642$ ,  $p = 0,441$ ; *C. glareolus*:  $\chi^2 = 0,824$ ,  $p = 0,479$ ; tableau VI).

Les petits campagnols prairiaux du genre *Microtus* ont été les plus consommés : ils sont présents dans 34 % des estomacs et 33 % des fèces analysées et représentent, respectivement, 66% et 73 % des restes de rongeurs trouvés dans les estomacs et dans les fèces. Leur densité relative, estimée au cours des transects (de 3 855 à 3 963 intervalles parcourus par session), a varié de 3,31 individus/100 intervalles en mars 2004 à 10,66 individus/100 intervalles en octobre 2005. Elle est significativement corrélée à la fréquence d'apparition de ces campagnols dans les fèces analysées ( $r_s = 0,9$ ;  $n = 5$ ;  $p = 0,019$ , figure 2).

Des restes d'*A. terrestris* n'ont été trouvés que dans 7 % des estomacs et seulement 3 % des fèces analysés. La densité relative de ce rongeur a peu varié de mars 2004 à mars 2005 (de 0,18 à 1,36 individus/100 intervalles) mais a semblé plus élevée en octobre 2005: 2,61

individus/100 intervalles. Elle n'est pas corrélée aux fréquences d'apparition de cette espèce dans le régime alimentaire ( $r_s = -0,1$ ;  $n = 5$ ;  $p = 0,435$ ; figure 2), ni à l'évolution de la densité de *Microtus sp.* au cours de notre étude ( $r_s = 0,1$ ;  $n = 5$ ;  $p = 0,436$ ).

Au total, 490 rongeurs ont été capturés en milieu forestier : 262 *Apodemus sp.*, 154 *C. glareolus*, 54 *M. agrestis*, 7 *Micromys minutus*, 1 *A. terrestris* (juvénile) et 5 individus indéterminés (échappés). Le nombre d'*Apodemus sp.* capturés a varié de 1,3 à 9 individus pour 100 nuits-pièges d'octobre 2000 à mars 2005, tandis que le nombre de *C. glareolus* capturés a varié de 0,6 à 4,8 individus pour 100 nuits-pièges d'octobre 2000 à mars 2005 (figure 3). Cependant, ces deux espèces de rongeurs forestiers ont été peu consommées par les renards puisqu'ils n'apparaissent, respectivement, que dans 8 et 2 % des estomacs analysés et 6 et 4 % des fèces analysées. Sur 222 rongeurs capturés en forêt et dont le foie a été examiné, aucun n'a été retrouvé porteur d'*Echinococcus multilocularis*.

## Discussion

La présente étude a été conduite dans un secteur considéré comme étant de récente endémie car les premiers cas humains autochtones diagnostiqués d'échinococcose alvéolaire datent des années 80 (Depaquit et al., 1998). La prévalence vulpine estimée y est cependant très élevée, puisque plus d'un renard sur deux est infecté. Elle est équivalente à celles enregistrées dans des zones d'endémie historique (Raoul et al., 2001a; Hofer et al., 2000; Romig et al., 1999b; Duscher et al., 2006). Aussi, la question se pose de savoir si *E. multilocularis* était présent depuis longtemps mais non détecté, ou s'il est arrivé tardivement dans la zone concernée, suite à un processus de colonisation similaire à celui actuellement en cours dans plusieurs régions d'Europe (Ito et al., 2003). Il est à noter que, dès la fin des années 60, Coudert et al. (1970) ont trouvé un renard infecté sur les onze individus examinés provenant du département voisin de la Meuse, et que cet individu se trouvait à une quinzaine de kilomètres du secteur dans lequel a été conduite la présente étude. L'hypothèse d'une présence relativement ancienne, mais non détectée, du parasite ne peut donc pas être exclue, surtout si les niveaux de prévalence étaient très faibles (peu d'animaux contaminés, faible nombre de cas humains) et en tenant compte du fait que les techniques employées jusqu'aux années 90 ne permettaient généralement pas la détection des cas humains (Romig et al., 1999a). Cependant, il est également vraisemblable qu'*E. multilocularis* ait progressivement colonisé les Ardennes françaises à partir des années 70, en provenance des régions endémiques limitrophes: la Lorraine (Aubert et al., 1986; Bonnin et al., 1986) et les Ardennes belges (Brochier et al., 1992; Losson et al., 1997; Losson et al., 2003).

Le récent accroissement des densités de renards constaté dans l'ouest de l'Europe (Chautan et al., 2000), et notamment en France entre 1990 et 2000 (Ruetter et al., 2003b), pourrait avoir facilité la détection du parasite, s'il a été accompagné d'une augmentation des prévalences vulpines, comme cela a été le cas en Allemagne, dans le Baden-Württemberg et en Bavière (Romig et al., 1999a; König et al., 2005). En effet, lorsque la densité de renards est élevée, le nombre absolu d'individus contaminés est important, ce qui peut entraîner une élévation du niveau de contamination environnementale, avec un nombre accru d'œufs présents dans l'environnement (Romig et al., 1999a; Duscher et al., 2006). La densité de renard estimée dans les Ardennes (de 3 à 4 renards/km<sup>2</sup>) est élevée si on la compare à celles relevées dans plusieurs régions de France entre 1998 et 2000, qui variaient de 0,4 à 3,5 renards/km<sup>2</sup> (Ruetter et al., 2003a). Cependant, comme ni cette densité, ni la prévalence vulpine n'ont varié significativement pendant la période d'étude, un suivi à plus long terme serait nécessaire pour mettre en évidence un éventuel lien entre elles ou pour, au contraire montrer que l'augmentation des populations de renards n'est pas nécessairement accompagnée d'une augmentation des prévalences, comme cela a été mis en évidence dans le nord-ouest de l'Allemagne (Tackmann et al., 1998).

La forte hétérogénéité du portage des charges parasitaires relevée dans les Ardennes est conforme à celle décrite ailleurs, que ce soit dans les zones d'endémie historique (Hofer et al., 2000; Raoul et al., 2001a; Yiman et al., 2002) ou dans les zones d'endémie nouvellement connues (Miterpaková et al., 2003; Sréter et al., 2004). Les charges parasitaires dans les zones de nouvelle endémie sont très variables, avec un maximum de 5 000 à 40 000 vers par renard (Sréter et al., 2004; Martinek et al., 2001; Miterpaková et al., 2003). La biomasse parasitaire détectée dans les Ardennes est comparable à celle trouvée en Suisse, zone d'endémie historique (Hofer et al., 2000).

Par ailleurs, le sexe, la classe d'âge, l'année et la saison ne sont pas apparus comme des variables explicatives de l'infection des renards par *E. multilocularis*, ni de leurs charges parasitaires. L'absence d'effet du sexe de l'individu sur son portage parasitaire confirme les résultats de Kritsky and Leiby (1978), Yiman et al. (2002), Losson et al. (2003) et Fischer et al. (2005). De même, le fait qu'aucune différence de prévalence entre juvéniles (< 1 an) et adultes n'ait pu être mise en évidence conforte les résultats de Kritsky and Leiby (1978), Hofer et al. (2000), Yiman et al. (2002) et Fischer et al. (2005), mais il est contraire à ceux de Tackmann et al. (1998) et Losson et al. (2003). Tackmann et al. (1998) supposent l'acquisition par les renards d'une immunité envers le parasite avec l'âge et les ingestions successives de rongeurs contaminés. Si leur hypothèse est confirmée, il faudrait



systématiquement distinguer les renards de moins de six mois des autres, car ces très jeunes renards consomment proportionnellement moins de rongeurs que les autres (Witt, 1976 in Tackmann et al., 1998) et seraient donc moins immunisés. Les résultats de Morishima et al. (1999), qui indiquent que la prévalence est plus élevée chez les individus de moins de 4 mois que chez ceux âgés de plus d'un an, tendent à le confirmer. De plus, dans les Ardennes, le portage d'*E. multilocularis* par les renards ne semble pas dépendre de la saison, ce qui va dans le sens des données collectées dans les Ardennes belges ou dans le canton de Genève en Suisse (Losson et al., 2003; Fischer et al., 2005). L'effet de la saison sur la prévalence (plus forte prévalence en hiver qu'en été) pourrait être caractéristique des régions où les différences climatiques saisonnières sont très marquées (climats continentaux) comme c'est le cas, en France, en Haute-Savoie (Contat, 1984) et dans le Doubs (Grisot, 1990), en Suisse, dans le canton de Zurich (Hofer et al., 2000) ou encore en République Slovaque (Miterpaková et al., 2003).

La prévalence vulpine peut être directement liée à la densité des hôtes intermédiaires (Saitoh et Takahashi, 1998). Au Japon, l'hôte intermédiaire principal est un campagnol forestier: *C. rufocanus* (Saitoh et Takahashi, 1998). Comme les zones boisées représentent une part importante du paysage dans les Ardennes, il s'avérerait important de s'intéresser aux espèces forestières dans cette région. Cependant, bien que les densités de rongeurs forestiers estimées durant la période d'étude correspondent aux moyennes relevées dans d'autres milieux forestiers (Spitz, 1977; Delatte et al., 1988; Butet et Leroux, 1994; Giraudoux et al., 1994; Butet et al., 2006), ces rongeurs semblent être peu consommés par les renards dans les Ardennes, même lorsque leur densité augmente, ce qui confirme les résultats de différents auteurs (Macdonald, 1977; Poulle, 1991; Ferrari and Weber, 1995). La probabilité d'ingestion par le renard d'un rongeur infecté appartenant à ces espèces est donc faible, d'autant que les prévalences relevées chez les rongeurs (quelque soit l'espèce) en Europe sont de l'ordre de <1 à 6% (Eckert et al., 2001b). Les espèces de rongeurs forestiers ne semblent donc pas jouer un rôle clé dans le cycle d'*E. multilocularis* dans les Ardennes, pas plus qu'*A. terrestris*, dont l'indice global d'abondance relevé (de 0.2 à 2.6% selon la saison) correspond à ceux enregistrés lors des périodes de faibles densités en Franche-Comté (Morilhat, 2005), et dont l'apparition dans le régime alimentaire du renard est faible.

En revanche, bien que l'indice global d'abondance de *Microtus sp.* que nous avons relevé (de 3.3% à 11.7% selon la saison) est largement inférieur aux valeurs relevées dans le Doubs en période de pullulation de ce rongeur (plus de 80%, Delattre et al., 1996, 1999; Quéré et al., 2000; Raoul et al., 2001a), *Microtus sp.* a été très consommé par le renard. De plus, sa

consommation est corrélée à son abondance, ce qui accroît la probabilité d'ingestion d'un individu infecté par un renard en période d'abondance. Alors qu'un lien entre la biomasse d'*A. terrestris* et sa consommation par les renards avait été mis en évidence en Franche-Comté dans le cadre d'une étude sur la transmission d'*E. multilocularis* (Raoul, 2001), c'est la première fois que la corrélation entre la présence des *Microtus* sur le terrain et leur fréquence d'apparition dans le régime alimentaire du renard est mise en évidence dans le cadre de ce type d'étude. Dans les Ardennes, le cycle parasitaire pourrait, comme en Franche-Comté, reposer sur un processus de densité-dépendance, à la différence près que l'espèce clé serait un *Microtus* et non *A. terrestris*. Il serait pertinent de tester cette hypothèse sur une plus longue période.

Les populations de campagnols des champs et terrestres évoluant de façon cyclique (Delattre et al., 1992, Giraudoux et al., 1997, Duhamel et al., 2000), il faudrait poursuivre nos estimations, réalisées sur une courte période (18 mois), pour voir si la densité de rongeurs n'atteint pas des niveaux plus élevées que celles enregistrées. Il est cependant peut probable qu'elles atteignent des niveaux de pullulation car, sur notre terrain d'étude, le rapport de la surface toujours en herbe sur la surface agricole utile est de 53 %, soit à la limite de la structure du paysage à partir de laquelle le risque de pullulation de *M. arvalis* est majeur, et dans une proportion associée à un très faible risque de pullulation d'*A. terrestris* (Giraudoux et al., 1997; Fichet-Calvet et al., 2000; Raoul et al., 2001b). Quoi qu'il en soit, la prévalence chez les renards est restée stable et élevée pendant plusieurs années, indiquant la possibilité d'une transmission intense du parasite, en dehors de périodes ou de lieux propices aux pullulations de rongeurs prairiaux.

En conclusion, l'originalité du cycle de transmission d'*E. multilocularis* dans le Sud des Ardennes réside dans le fait que les prévalences du parasite chez les renards peuvent atteindre, pendant quelques années, des niveaux comparables à ceux des régions de fortes endémies de l'est de la France, avec des charges parasitaires importantes, alors que les densités de rongeurs prairiaux varient sans atteindre des niveaux de pullulation. La relation complexe qui lie les densités de rongeurs, la consommation de ces rongeurs par les renards et la prévalence vulpine nécessite d'être étudiée à plus long terme en comparant des données provenant, d'une part de situations de faible et forte prévalence vulpine, d'autre part de zones d'endémie ancienne ou récente. De plus, pour préciser les facteurs environnementaux responsables du niveau élevé de prévalence vulpine enregistré dans les Ardennes, il convient désormais d'explorer, à une fenêtre d'observation plus locale la relation entre la distribution spatiale des renards infectés, le paysage environnant, les charges et les types parasitaires qui peuvent y

être associés. La distribution des hôtes intermédiaires et des fèces de renards dans les différents milieux, la prévalence d'*E. multilocularis* parmi les rongeurs prairiaux et le mode de fréquentation par plusieurs renards de domaines d'activité communs devraient également faire l'objet d'études conduites localement.

### Remerciements

Cette étude a bénéficié du soutien financier de la Région Champagne-Ardenne, de la Direction Régionale à la Recherche et à la Technologie et de la Communauté de Communes de l'Argonne Ardennaise. Nous remercions la Fédération Départementale des Chasseurs des Ardennes, l'Association des Piégeurs agréés des Ardennes et les chasseurs et piégeurs, les autres particuliers ainsi que les étudiants du 2C2A-CERFE qui ont participé à la collecte des cadavres de renards. Nous remercions également M. de Gevigney, directeur du Parc de Bel-Val qui nous a permis de réaliser les piégeages de rongeurs dans l'enceinte du parc.

### Références

- Anderson, D.R., Link, W.A., Johnson, D.H., Burnham, K.P. (2001) Suggestions for presenting the results of data analyses. *J. Wildl. Manage.*, 65, 373-378.
- Aubert, M., Jacquier, P., Artois, M., Barrat, M.J., Basile, A.M. (1986) Le portage animal d'*Echinococcus multilocularis* en Lorraine et ses conséquences sur la contamination humaine. (1). I. Approche biogéographique. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 4 (1), 59-64.
- Bonnin, J.L., Delattre, P., Artois, M., Pascal, M., Aubert, M.F.A., Petavy, A.F. (1986) Contribution à la connaissance des hôtes intermédiaires d'*Echinococcus multilocularis* dans le nord-est de la France. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 61 (2), 235-243.
- Brochier, B., Coppens, P., Losson, B., Aubert, M.F.A., Bauduin, B., Barrat, M.J., Costy, F. ; Pécharpré, D., Pouplard, L., Pastoret, P.P. (1992) Enquête sur l'infestation par *Echinococcus multilocularis* du renard roux (*Vulpes vulpes*) en province de Luxembourg (Belgique). *Ann. Méd. Vét.*, 136, 497-501.
- Buckland, S.T., Anderson, D.R., Burnham, K.P., Laake, J.L. (1993) *Distance sampling. Estimating Abundance of Biological Populations*. Chapman & Hall, London, UK.
- Burnham, K.P., Anderson, D.R. (2002) *Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach*. 2nd edition. Springer-Verlag, New-York, 496 pp.
- Butet, A., Leroux, A. (1994) Spatial and temporal density fluctuations in common vole populations in a marsh in western France. *Pol. ecol. Stud.*, 20, 137-146.
- Butet, A., Paillat, G., Delettre, Y. (2006) Factors driving small rodents assemblages from field

boundaries in agricultural landscapes of western France. *Landscape Ecol.*, 21, 449-461.

Chautan, M. (2000) Les comptages nocturnes pour le suivi des populations de mammifères sauvages: indices kilométriques ou échantillonnage des distances (Distance sampling)? *Arvicola*, 29-32.

Ciucci, P., Boitani, L., Pelliccioni, E.R., Rocco, M., Guy, I. (1996) A comparison of scat-analysis methods to assess the diet of the wolf *Canis lupus*. *Wildl. Biol.*, 2, 37-48.

Contat, F. (1984) Contribution à l'étude épidémiologique de l'échinococcose alvéolaire en Haute-Savoie. Etude histologique des lésions. Thèse de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon.

Corbett, L.K. (1989) Assessing the diet of dingoes from feces: a comparison of three methods. *J. Wildl. Manage.*, 53, 343-346.

Coudert, J., Euzeby, J., Garin, J.P. (1970) Fréquence de *E.multilocularis* chez le renard commun (*Vulpes vulpes*) dans le secteur Nord-Est de la France. *Lyon Médical*, 224, 293-298.

Debrot, S., Fivaz, G., Mermod, C., Weber, J.-M. (1982) *Atlas des poils de mammifères d'Europe*. Université de Neuchâtel, Neuchâtel, Suisse.

Delattre, P., Damange, J.M., Pascal, M., Halbert, M. (1988) Rôle de la prédation et influence de la structure du paysage agricole sur le développement des cycles d'abondance des populations d' *Arvicola terrestris scherman*. *Bull. OEPP*, 18, 415-422.

Delattre, P., Giraudoux, P., Baudry, J., Musard, P., Toussaint, M., Truchetet, D., Stahl, P., Poulle, M.L., Artois, M., Damange, J.P., Quéré, J.P. (1992) Land use patterns and types of common vole (*Microtus arvalis*) population kinetics. *Agric., Ecosyst. Environ.*, 39, 153-169.

Delattre, P., Giraudoux, P., Baudry, J., Quéré, J.P., Fichet, E. (1996) Effect of landscape structure on Common Vole (*Microtus arvalis*) distribution and abundance at several space scales. *Landscape Ecol.*, 11, 279-288.

Delattre, P., de Sousa, B., Fichet-Calvet, E., Quéré, J.P., Giraudoux, P. (1999) Vole outbreaks in a landscape context: evidence from a six year study of *Microtus arvalis*. *Landscape Ecol.*, 14, 401-412.

Depaquit, J., Gallego, A., Usseglio, F., Liance, M., Favriel, J.M. (1998) L'échinococcose alvéolaire dans le département français des Ardennes: cas isolés ou nouveau foyer? *Parasite*, 5, 285-287.

Duhamel, R., Quéré, J.P., Delattre, P., Giraudoux, P. (2000) Landscape effects on the population dynamics of the fossorial form of the water vole (*Arvicola terrestris scherman*). *Landscape Ecol.*, 15, 89-98.

Duscher, G., Pleydell, D., Prosl, H., Joachim, A. (2006) *Echinococcus multilocularis* in Austrian foxes from 1991 until 2004. *J. Vet. Med. B.*, 53, 138-144.

Eckert, J., Gottstein, B., H.E.A.T.H.D., Liu, F.J. (2001a) Prevention of echinococcosis in

humans and safety precautions. In: Eckert, J., Gemmell, M.A., Meslin, F.X., Pawloski, Z.S. (Eds.), *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A public health problem of global concern*. OIE/WHO, Paris, pp.238-247.

Eckert, J., Schantz, P.M., Gasser, R.B., Torgerson, P.R., Bessonov, A.S., Movsessian, S.O., Thakur, A., Grimm, F., Nikogossian, M.A. (2001b) Geographic distribution and prevalence. In: Eckert, J., Gemmell, M.A., Meslin, F.X., Pawloski, Z.S. (Eds.), *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A public health problem of global concern*. OIE/WHO, Paris, pp.100-142.

Eckert, J. (2003) Predictive values and quality control of techniques for the diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in definitive hosts. *Acta Trop.*, 85, 157-163.

Eckert, J., Deplazes, P. (2004) Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17, 107-135.

Erome, G., Aulagnier, S. (1982) Contribution à l'identification des proies des rapaces. *Bièvre*, 4 (2), 129-135.

Ferrari, N., Weber, J.M. (1995) Influence of the abundance of food resources on the feeding habits of the red fox, *Vulpes vulpes*, in western Switzerland. *J. Zool. Lond.*, 236, 117-129.

Fichet-Calvet, E., Jomaa, I., Giraudoux, P., Ashford, W. (1999) Estimation of sand rat abundance by using surface indices. *Acta Theriol.*, 44, 353-362.

Fichet-Calvet, E., Pradier, B., Quéré, J.P., Giraudoux, P., Delattre, P. (2000) Landscape composition and vole outbreaks: evidence from an eight year study of *Arvicola terrestris*. *Ecography*, 23, 659-668.

Fischer, C., Reperant, L.A., Weber, J.M., Hegglin, D., Deplazes, P. (2005) *Echinococcus multilocularis* infections of rural, residential and urban foxes (*Vulpes vulpes*) in the canton of Geneva, Switzerland. *Parasite*, 12, 339-346.

Giraudoux, P., Delattre, P., Quéré, J.P., Damange, J.P. (1994) Structure and kinetics of rodent populations, in a region under agricultural land abandonment. *Acta Oecologica*, 15, 385-400.

Giraudoux, P., Pradier, B., Delattre, P., Deblay, S., Salvi, D., Defaut, R. (1995) Estimation of water vole abundance by using surface indices. *Acta Theriol.*, 40, 77-96.

Giraudoux, P., Delattre, P., Habert, M., Quéré, J.P., Deblay, S., Defaut, R., Duhamel, R., Moissenet, M.F., Salvi, D., Truchetet, D. (1997) Population dynamics of fossorial water vole (*Arvicola terrestris* scherman): a land use and landscape perspective. *Agric., Ecosyst. Environ.*, 66, 47-60.

Giraudoux, P., Delattre, P., Takahashi, K., Raoul, F., Quéré, J.P., Craig, P., Vuitton, D. (2002) Transmission ecology of *Echinococcus multilocularis* in wildlife: what can be learned from comparative studies and multiscale approaches? In: Craig, P.S., Pawloski, Z.S. (Eds.), *Cestode Zoonoses: Echinococcosis and Cysticercosis*. IOS Press, Amsterdam, pp.251-266.

Goddard, H.N., Reynolds, J.C. (1993) Age determination in the red foxes (*Vulpes vulpes* L.)

from tooth cementum lines. *Gibier Faune Sauvage*, 10, 173-187.

Grisot, L. (1990) Contribution à l'étude épidémiologique de l'échinococcose multiloculaire dans le Doubs. Thèse de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon.

Hansson, L. (1979) Field signs as indicators of vole abundance. *J. Appl. Ecol.*, 16, 339-347.

Hofer, S., Gloor, S., Muller, U., Mathis, A., Hegglin, D., Deplazes, P. (2000) High prevalence of *Echinococcus multilocularis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) and voles (*Arvicola terrestris*) in the city of Zurich, Switzerland. *Parasitology*, 120, 135-142.

Hudson, P.J., Rizzoli, A., Grenfell, B.T., Heesterbeek, H., Dobson, A.P. (2002) *The Ecology of Wildlife Disease*. Oxford University Press, New York.

Ito, A., Romig, T., Takahashi, K. (2003) Perspective on control options for *Echinococcus multilocularis* with particular reference to Japan. *Parasitology*, 127, 5159-5172.

Konig, A., Romig, T., Thoma, D., Kellermann, K. (2005) Drastic increase of the prevalences of *Echinococcus multilocularis* in fox (*Vulpes vulpes*) in southern Bavaria, Germany. *Eur. J. Wildl. Res.*, 51, 277-282.

Kritsky, D.C., Leiby, P.D. (1978) Studies on sylvatic echinococcosis. V. Factors influencing prevalence of *Echinococcus multilocularis* Leuckart 1863, in red foxes from North Dakota, 1965-1972. *J. Parasitol.*, 64, 625-634.

Laake, J.L., Buckland, S.I., Anderson, D.R., Burnham, K.P. (1993) *Distance User's Guide*. Colorado State University, Fort Collins, CO.

Losson, B., Mignon, B., Brochier, B., Bauduin, B., Pastoret, P.P. (1997) Infestation du renard roux (*Vulpes vulpes*) par *Echinococcus multilocularis* dans la province de Luxembourg (Belgique): résultats de l'enquête effectuée entre 1993 et 1995. *Ann. Méd. Vét.*, 141, 149-153.

Losson, B., Kervyn, T., Detry, J., Pastoret, P.P., Mignon, B., Brochier, B. (2003) Prevalence of *Echinococcus multilocularis* in the red fox (*Vulpes vulpes*) in southern Belgium. *Vet. Parasitol.*, 117, 23-28.

MacDonald, D.W. (1977) On food preference in the red fox. *Mammal. Rev.*, 7, 7-23.

Martínek, K., Kolářová, L., Červený, J. (2001) *Echinococcus multilocularis* in carnivores from the Klatovy district of the Czech Republic. *J. Helminth.*, 75, 61-66.

Miterpaková, M., Dubinský, P., Reiterová, K., Machková, N., Várady, M., Šnábel, V. (2003) Spatial and temporal analysis of the *Echinococcus multilocularis* occurrence in the Slovak Republic. *Helminthologia*, 40, 217-226.

Morilhat, C. (2005) Influence du système sol-végétation-pratiques agricoles des prairies franc-comtoises sur la dynamique de population de la forme fouisseuse du campagnol terrestre (*Arvicola terrestris* Scherman Shaw, 1801). Thèse de l'université de Franche-Comté, 176 pp.

Morishima, Y., Tsukada, H., Nonaka, N., Oku, Y., Kamiya, M. (1999) Coproantigen survey for *Echinococcus multilocularis* prevalence of red foxes in Hokkaido, Japan. *Parasitol. Int.*, 48, 121-134.

Pouille, M.L. (1991) Eco-éthologie du renard roux (*Vulpes vulpes* L.) en Lorraine: influence du mode de distribution des ressources sur le partage de l'espace et les relations interindividuelles. Thèse de l'université Louis Pasteur, Strasbourg, 191 pp.

Pesson, B., Carbiener, R. (1989) Ecologie de l'échinococcose alvéolaire en Alsace: le parasitisme du renard roux (*Vulpes vulpes* L.). *Bull. Ecol.*, 20, 295-301.

Quéré, J.P., Raoul, F., Giraudoux, P., Delattre, P. (2000) An index method of estimating relative population densities of the common vole (*Microtus arvalis*) at landscape scale. *Rev. Ecol. (Terre Vie)*, 55, 25-31.

Raoul, F. (2001) Ecologie de la transmission d'*Echinococcus multilocularis* chez le renard dans l'Est de la France: dépendance au paysage et à la relation proie-prédateur? Thèse de l'université de Franche-Comté, 164 pp.

Raoul, F., Nonaka, N., Piarroux, R., Vuitton, D.A., Giraudoux, P. (2001a) Assessment of the epidemiological status of *Echinococcus multilocularis* in foxes in France using ELISA coprotests on fox faeces collected in the field. *Int. J. Parasitol.*, 31, 1579-1588.

Raoul, F., Defaut, R., Michelat, D., Montadert, M., Pepin, D., Quéré, J.P., Tissot, B., Delattre, P., Giraudoux, P. (2001b) Landscape effects on the population dynamics of small mammal communities: a preliminary analysis of prey-resource variations. *Rev. Ecol. (Terre Vie)*, 56, 339-351.

Raoul, F., Michelat, D., Ordinaire, M., Decote, Y., Aubert, M., Delattre, P., Deplazes, P., Giraudoux, P. (2003) *Echinococcus multilocularis*: secondary poisoning of fox population during a vole outbreak reduces environmental contamination in a high endemicity area. *Int. J. Parasitol.*, 33, 945-954.

Rausch, R.L. (1995) Life-cycle patterns and geographic distribution of *Echinococcus* species. In: Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J. (Eds.), *Echinococcus and hydatid disease*. CAB International, Wallingford, pp.88-134.

Romig, T., Bilger, B., Dinkel, A., Merli, M., MacKenstedt, U. (1999a) *Echinococcus multilocularis* in animal hosts: a new data from western Europe. *Helminthologia*, 36, 185-191.

Romig, T., Kratzer, W., Kimmig, P., Frosch, M., Gaus, W., Flegel, W.A., Gottstein, B., Lucius, R., Beckh, K., Kern, P. (1999b) An epidemiologic survey of human alveolar echinococcosis in southwestern Germany. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61, 566-573.

Romig, T., Dinkel, A., MacKenstedt, U. (2006) The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol. Int.*, 55, S187-S191.

Ruette, S., Sthal, P., Albaret, M. (2003a) Applying distance-sampling methods to spotlight counts of red foxes. *J. Appl. Ecol.*, 40, 32-43.

- Ruette, S., Sthal, P., Albaret, M. (2003b) Comparaison entre les comptages nocturnes de renards réalisés à dix ans d'intervalle dans neuf régions françaises. *Faune Sauvage*, 258, 47-49.
- Saitoh, T., Takahashi, K. (1998) The role of vole populations in prevalence of the parasite (*Echinococcus multilocularis*) in foxes. *Res. Popul. Ecol.*, 40, 97-105.
- Sauer, JR, Williams, BK. (1989) Generalized procedures for testing hypotheses about survival or recovery rates. *J. Wildl. Manage*, 53, 137-142.
- Siegel, S., Castellan, N.J.J. (1988) *Non parametric statistics for the behavioural sciences*. McGraw-Hill International Editions, New-York.
- Spitz, F., Le Louarn, H., Poulet, A., Dassonville, B. (1974). Standardisation des piégeages en ligne pour quelques espèces de rongeurs. *Rev. Ecol. (Terre et Vie)*, 28, 564-578.
- Sréter, T., Széll, Z., Sréter-Lancz, Z., Varga, I. (2004) *Echinococcus multilocularis* in Hungary. *Emerg. Infect. Dis.*, 10, 1344-1346.
- Staubach, C., Thulke, H.H., Tackmann, K., Hugh-Jones, M., Conraths, F.J. (2001) Geographic information system-aided analysis of factors associated with the spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* infections of foxes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65, 943-948.
- Tackmann, K., Loschner, U., Mix, H., Staubach, C., Thulke, H.H., Conraths, F.J. (1998) Spatial distribution patterns of *Echinococcus multilocularis* (Leukart 1863) (Cestoda: Cyclophyllidea: Taeniidae) among red foxes in an endemic focus in Brandenburg, Germany. *Epidemiol. Infect.*, 120, 101-109.
- Vuitton, D.A., Zhou, H., Bresson-Hadni, S., Wang, Q., Piarroux, R., Raoul, F., Giraudoux, P. (2003) Epidemiology of alveolar echinococcosis with particular reference to China and Europe. *Parasitology*, 127, S87-S107.
- Weber, J.M., Aubry, S. (1993) Predation by foxes, *Vulpes vulpes*, on the fossorial form of the water vole, *Arvicola terrestris* scherman, in western Switzerland. *J. Zool. Lond.*, 229, 553-559.
- Yimam, A.E., Nonaka, N., Oku, Y., Kamiya, M. (2002) Prevalence and intensity of *Echinococcus multilocularis* in red foxes (*Vulpes vulpes schrencki*) and raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides albus*) in Otaru city, Hokkaido, Japan. *Jpn. J. Vet. Res.*, 49, 287-296.



**Tableau I.** Sessions et milieux échantillonnés pour l'estimation des densités de rongeurs forestiers et prairiaux.

|   | Type milieu                   | Saison échantillonnage |              |                 |              |              |                 |                  |              |                 |
|---|-------------------------------|------------------------|--------------|-----------------|--------------|--------------|-----------------|------------------|--------------|-----------------|
|   |                               | Octobre<br>2000        | Mars<br>2001 | Octobre<br>2001 | Mars<br>2002 | Mars<br>2004 | Octobre<br>2004 | Décembre<br>2004 | Mars<br>2005 | Octobre<br>2005 |
| <i>(nombre de<br/>lignes de<br/>100 mètres)</i>             | Forêt Fermée                  | 3                      | 3            | 3               | 6            | -            | 2               | -                | 2            | 2               |
|   | Forêt Ouverte                 | 1                      | 1            | 1               | 2            | -            | 2               | -                | 2            | 2               |
|   | Régénération                  | 1                      | 1            | 1               | 2            | -            | 2               | -                | 2            | 2               |
|   | Lisière Forêt<br>Fermée       | 3                      | 4            | 3               | 3            | -            | 2               | -                | 2            | 2               |
|   | Lisière Forêt<br>Ouverte      | 1                      | 1            | 1               | 0            | -            | 2               | -                | 2            | 2               |
|   | Lisière<br>Régénération       | 2                      | 2            | 2               | 1            | -            | 2               | -                | 2            | 2               |
| <i>(nombres<br/>d'intervalles<br/>de 10m<br/>parcourus)</i> | Lisière végétation<br>rase    | -                      | -            | -               | -            | 538          | 505             | 505              | 522          | 507             |
|   | Lisière végétation<br>moyenne | -                      | -            | -               | -            | 511          | 496             | 520              | 504          | 502             |
|   | Haie                          | -                      | -            | -               | -            | 512          | 509             | 511              | 510          | 507             |
|   | Talus                         | -                      | -            | -               | -            | 517          | 507             | 502              | 503          | 485             |
|   | Culture                       | -                      | -            | -               | -            | 530          | 526             | 511              | 501          | 519             |
|   | Prairie paturée               | -                      | -            | -               | -            | 504          | 524             | 527              | 527          | 507             |
|   | Prairie fauchée               | -                      | -            | -               | -            | 426          | 440             | 393              | 389          | 448             |
| Forêt   | -                             | -                      | -            | -               | 425          | 411          | 399             | 399              | 400          |                 |

**Tableau II.** Résultats des comptages aux phares de renards effectués dans le Sud-Est du département des Ardennes de 2002 à 2006. L: longueur totale de transects parcourue.

| Année | Nombre de renards observés (n) | Densité | Coefficient variation | Intervalle confiance 95% |        | Probabilité de détection | Taux de rencontre (n/L) |
|-------|--------------------------------|---------|-----------------------|--------------------------|--------|--------------------------|-------------------------|
|       |                                |         |                       | D mini                   | D maxi |                          |                         |
| 2002  | 155                            | 3,07    | 0,17                  | 2,12                     | 4,46   | 0,50                     | 1,29                    |
| 2003  | 123                            | 2,94    | 0,23                  | 1,79                     | 4,84   | 0,41                     | 1,02                    |
| 2004  | 153                            | 3,14    | 0,17                  | 2,14                     | 4,61   | 0,51                     | 1,54                    |
| 2005  | 124                            | 3,00    | 0,19                  | 1,99                     | 4,52   | 0,43                     | 1,25                    |
| 2006  | 181                            | 3,78    | 0,16                  | 2,64                     | 5,44   | 0,50                     | 1,82                    |

**Tableau III.** Prévalences d'*E. multilocularis* chez le renard roux dans le Sud-Est du département des Ardennes, en fonction du sexe, de la classe d'âge, de l'année et de la saison.

|              | Nombre de renards | Nombre de renards infectés | Prévalence (%) | IC (95%)             |
|--------------|-------------------|----------------------------|----------------|----------------------|
| Male         | 76                | 39                         | 51,30          | 40,84 – 61,70        |
| Femelle      | 73                | 40                         | 54,80          | 47,7 – 69,28         |
| Juvenile     | 68                | 40                         | 58,82          | 47,7 – 69,28         |
| Adulte       | 81                | 39                         | 48,15          | 38,08 – 53,33        |
| 2001-2003    | 50                | 23                         | 46,00          | 33,66 – 58,75        |
| 2004         | 63                | 34                         | 53,97          | 42,49 – 65,12        |
| 2005         | 36                | 22                         | 61,11          | 46,22 – 74,49        |
| Hiver        | 71                | 37                         | 52,11          | 41,29 – 62,78        |
| Printemps    | 28                | 15                         | 53,57          | 37,18 – 69,35        |
| Automne      | 15                | 7                          | 46,67          | 26,59 – 67,71        |
| Eté          | 35                | 20                         | 57,14          | 42,11 – 71,17        |
| <b>Total</b> | <b>149</b>        | <b>79</b>                  | <b>53,02</b>   | <b>45,35 – 60,59</b> |

**Tableau IV.** Comparaison des modèles décrivant le portage de *E. multilocularis* par les renards et les charges parasitaires par renard.

LL = maximum du rapport de vraisemblance; K = nombre de paramètres estimés; n/K = nombre d'observations/K; AICc = Critère d'information d'Akaike, second ordre;  $\Delta_i$  = différence entre l'AICc et la plus faible valeur d'AICc;  $w_i$  = poids d'Akaike.

| <b>a. portage de<br/><i>E. multilocularis</i></b> | LL     | K | n/K   | AICc          | $\Delta_i$ | $w_i$ |
|---|--------|---|-------|---------------|------------|-------|
| 1   | -103,0 | 1 | 149,0 | <b>208,0</b>  | 0          | 0,38  |
| âge   | -102,2 | 2 | 74,5  | 208,4         | 0,4        | 0,32  |
| sexe  | -102,9 | 2 | 74,5  | 209,9         | 1,9        | 0,15  |
| année   | -102,0 | 3 | 49,7  | 210,2         | 2,2        | 0,13  |
| saison  | -102,8 | 4 | 37,3  | 213,8         | 5,7        | 0,02  |
| <b>b. charges parasitaires</b>                    | LL     | K | n/K   | AICc          | $\Delta_i$ | $w_i$ |
| 1   | -710,8 | 2 | 74,5  | <b>1425,6</b> | 1,5        | 0,19  |
| âge   | -710,7 | 3 | 49,7  | 1427,6        | 3,6        | 0,07  |
| sexe  | -709,2 | 3 | 49,7  | 1424,6        | 0,6        | 0,30  |
| année   | -707,9 | 4 | 37,3  | 1424,1        | 0,0        | 0,40  |
| saison  | -708,9 | 5 | 29,8  | 1428,1        | 4,1        | 0,05  |

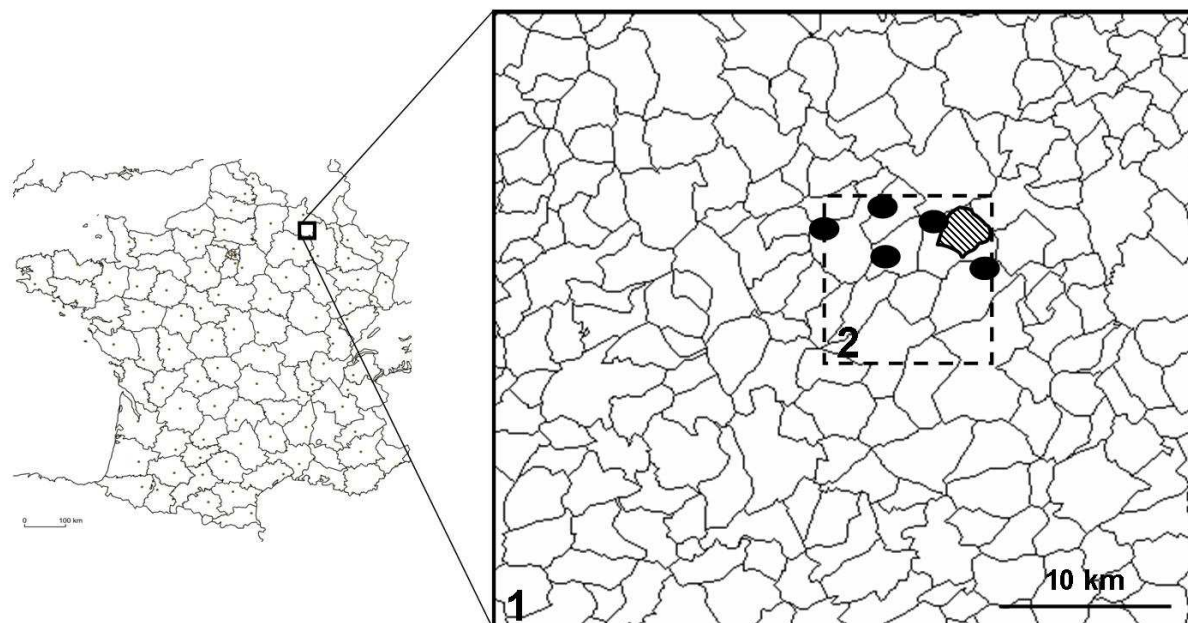
**Tableau V.** Répartition de la charge parasitaire (nombre de vers par individu) parmi les renards porteurs d'*E. multilocularis*

| Catégories de charges parasitaires | Nombre de renards porteurs | % par rapport au nombre total de renards positifs | Nombre total de vers dans la catégorie | % par rapport au nombre total de vers |
|------------------------------------|----------------------------|---|--|---------------------------------------|
| 1-100                              | 33                         | 41,8  | 670                                    | 0,3                                   |
| 101-1000                           | 19                         | 24,0  | 8 115                                  | 3                                     |
| 1001-10 000                        | 21                         | 26,6  | 67 631                                 | 25,0                                  |
| >10 000                            | 6                          | 7,6   | 193 854                                | 71,7                                  |
| Total                              | 79                         | 100 %   | 270 270                                | 100 %                                 |

**Tableau VI.** Nombre d'apparitions des différentes catégories alimentaires dans les estomacs et des fèces de renards.

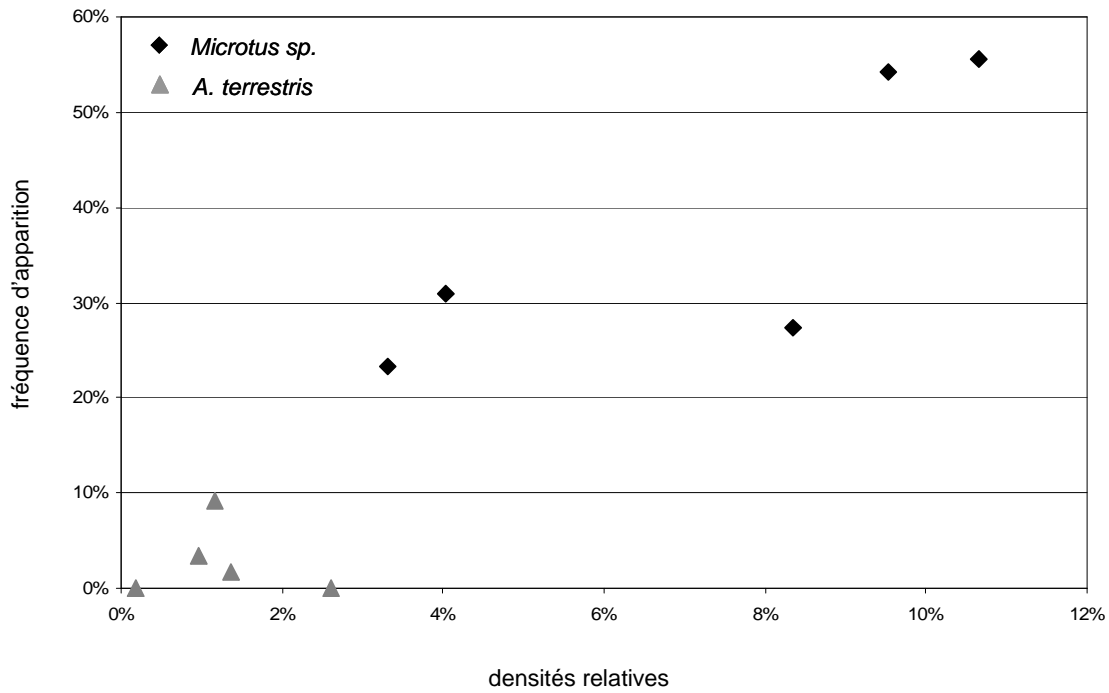
Fréquence d'apparition: nombre d'estomacs ou de fèces dans lesquels l'item considéré apparaît sur le nombre d'estomacs ou de fèces analysés (exprimé en pourcentage).

|                                   | Estomacs (N=98)                    |                            | Fèces (N=144)                    |                            |
|-----------------------------------|------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------|
|                                   | Nombre d'estomacs contenant l'item | Fréquence d'apparition (%) | Nombre de fèces contenant l'item | Fréquence d'apparition (%) |
| <b>a. catégories alimentaires</b> |                                    |                            |                                  |                            |
| rongeurs                          | 50                                 | 51                         | 70                               | 49                         |
| autres mammifères                 | 36                                 | 37                         | 4                                | 3                          |
| oiseaux                           | 34                                 | 35                         | 18                               | 13                         |
| invertébrés                       | 25                                 | 26                         | 52                               | 36                         |
| fruits                            | 20                                 | 20                         | 63                               | 44                         |
| <b>b. catégories de rongeurs</b>  |                                    |                            |                                  |                            |
| <i>Microtus sp.</i>               | 33                                 | 34                         | 47                               | 33                         |
| <i>A. terrestris</i>              | 7                                  | 7                          | 4                                | 3                          |
| <i>Apodemus sp.</i>               | 8                                  | 8                          | 8                                | 6                          |
| <i>C. glareolus</i>               | 2                                  | 2                          | 6                                | 4                          |

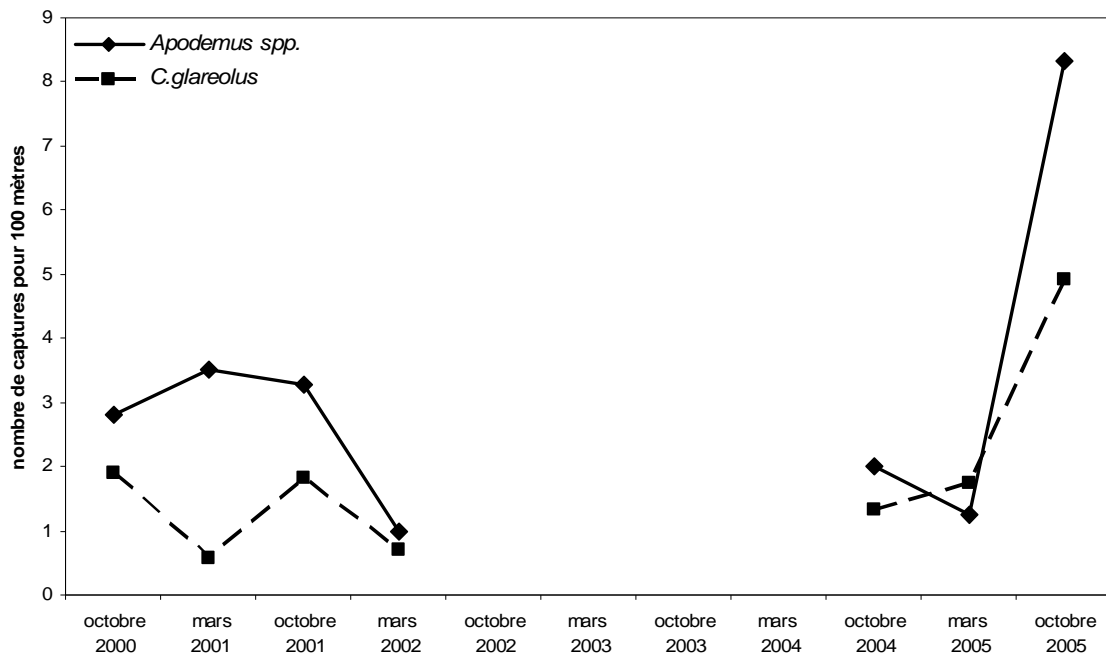


**Figure 1.** Localisation des différents sites d'étude.

1: Zone de collecte de cadavres; 2. Zone de comptage aux phares (estimation des densités de renards); ronds noirs: site de transects (estimation des rongeurs prairiaux, collecte de fèces), zone hachurée: site de piégeage des rongeurs en forestiers.



**Figure 2.** Densités relatives de *Microtus sp.* et *A. terrestris* estimées par la méthode indiciaire et fréquence relative d'apparition de ces rongeurs dans les fèces et estomacs, en mars, octobre et décembre 2004, et en mars et octobre 2005



**Figure 3.** Evolution saisonnière des densités relatives de rongeurs forestiers échantillonnés dans le sud-est des Ardennes d'octobre 2000 à octobre 2005.



**II.3. Article 2**

***Echinococcus multilocularis* IN THE REGION OF THE FRENCH ARDENNES:  
INVESTIGATION OF THE GENETIC POLYMORPHISM  
BY EmsB MICROSATELLITE TARGET**

J. Knapp<sup>1,2</sup>, M.-H. Guislain<sup>3,4</sup>, J.M. Bart<sup>1</sup>, F. Raoul<sup>3</sup>, B. Gottstein<sup>2</sup>, P. Giraudoux<sup>3</sup> and R. Piarroux<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Parasitology Department, SERF Team (Equipe Santé Environnement Rural Franche-Comté), Faculty of Medicine, University of Franche-Comté, Besançon, France.

<sup>2</sup>Institute of Parasitology, Vetsuisse Faculty, University of Berne, Berne, Switzerland.

<sup>3</sup>Department of Environmental Biology, usc INRA – EA 3184, University of Franche-Comté, 1 place Leclerc, 25030 Besançon, France.

<sup>4</sup>2C2A-CERFE, Rue de la Héronnière, Boulton-aux-Bois, France.

**Abstract**

*Echinococcus multilocularis* is a cestode liable for Alveolar Echinococcosis disease (AE) and represents one of the most serious zoonosis. The historical French endemic area is located in the Eastern and Middle parts of the country, mainly in Franche-Comté, Lorraine and Auvergne regions. Several human cases were recorded in the French Ardennes region (the North-Western limit of *E. multilocularis* range in France), since 1980's, and a previous study on prevalence of *E. multilocularis* in red foxes has shown that more than fifty percent of the foxes harboured the parasite. This phenomenon raises the question of the spatio-temporal dynamic of the cestode in this likely new endemic area. This present study investigated the genetic diversity among adult worms on a range of 900 km<sup>2</sup> in the Ardennes, with the help of the tandem repeated multilocus microsatellite. A total of 140 adult worms, from 25 red foxes, were genotyped. The EmsB target allowed us to discriminate two main genotypes, each divided in sub-groups, leading to the differentiation of 6 clusters. Seven foxes harboured the two main genotypes (28% of the foxes), suggesting a contamination from several origins. These results confirm the usefulness of EmsB target to assess genetic polymorphism on a



regional range and ask the question of the extension of *E. multilocularis* in the European focus.

**Key-words:** *E. multilocularis*, tandem repeated multi-loci microsatellite, Ardennes, new endemic focus, genetic polymorphism, *Vulpes vulpes*

## Introduction

*Echinococcus multilocularis* is a cestode liable to the most worrying cosmopolitan zoonosis, the Alveolar Echinococcosis (AE). This parasite implies in its life cycle different mammalian hosts. A carnivore, mainly the red fox (*Vulpes vulpes*), is the definitive host and harbours adult worms in its small intestine (Thompson et al., 2006). Tapeworms release eggs in the environment with definitive host faeces. A small-mammal (mainly rodent and lagomorphs) becomes intermediate host, eating vegetation contaminated with eggs. Embryophores reach liver by blood circulation and evolve as tumour-like. If an ill rodent is consumed by a definitive host, larvae evolve in adult worms and the parasite cycle carries on. Human can ingest eggs accidentally and develop a parasitic lesion mainly in the liver (Bresson-Hadni et al., 2005). The illness can be fatal if untreated. The tapeworm *E. multilocularis* occurs widespread in the Northern hemisphere and is an extremely serious public health problem in many endemic areas, as in Europe (Vuitton et al., 2003). In this focus 15 to 36 human cases are detected each year, corresponding to annual incidences in human population in high endemic areas estimated between 2 and 40 per 100 000 (Romig et al., 2006). Four countries were considered as primitive European focus: Switzerland, France, Austria and Germany, until the end of the eighties (Eckert et al., 2000; Kern et al., 2003). Since about fifteen years, several cases have appeared in hitherto no-endemic regions, like Poland (Myjak et al., 2003) and Slovakia (Reiterova et al., 2005). Furthermore the recent appearance of *E. multilocularis* in fox population e.g. in Denmark (Saeed et al., 2006) and in Italian Alpine region (Casulli et al., 2005), addresses the question of the parasite extend in Europe. In France, human cases were usually recorded from Franche-Comté, Lorraine, Auvergne and East of the Rhône-Alpes regions. These focus were considered as being endemic since decades (Eckert et al., 2000). Since a few years, ectopic cases have appeared in regions considered as non-endemic, like the French Ardennes, in North-Eastern France (Piarroux et al., 2006; Depaquit et al., 1998). A recent study in this region showed that *E. multilocularis* prevalence in foxes reached 53%

(Guislain, unpublished data). The genetic diversity of the parasite could be used as a tool to date this apparently new phenomenon.

The recent characterization of microsatellite tool supplants classical nuclear and mitochondrial targets by a better power of discrimination in *E. multilocularis* polymorphism studies (Bart et al., 2006; Bretagne et al., 1996; Nakao et al., 2003). Furthermore, the tandem repeated multilocus microsatellite EmsB appears as the most relevant target to investigate genetic diversity between samples of different origins but also into a given focus. This target was isolated and characterised by Bart and co-workers and had proved its quality of sensibility and easy use in fragment size analysis (Bart et al., 2006). This former was previously tested in a world sample panel, composed of isolates coming from Japan, Saint-Lawrence Island and Europe (Knapp et al., 2004). This study allowed splitting *E. multilocularis* sample panel into regional clusters and in addition into local clusters. For example, in Europe 23 genotypes were identified in a sample panel composed by 51 adult worms and parasitic lesions from definitive and intermediate hosts respectively. Furthermore *E. multilocularis* parasitic lesions from rodents from a single field in Switzerland displayed an important genetic homogeneity on a limited area (500m x 500m) (Bart et al., 2006). Then these results led to two hypotheses: the contamination of all the rodents was caused by a unique fox, or by a single EmsB genotype.

The aim of this present study was to assess the genetic diversity of *E. multilocularis* in red fox on a limited area of 900 km<sup>2</sup> (regional range) in a putative new endemic focus, the French region of the Ardennes. The EmsB target was employed to seek for genotypes. These latter were compared with those already found in Europe in a precedent study lead by Knapp et al. (unpublished data).

## **Materials and methods**

### *Collection of E. multilocularis samples*

Adult tapeworms came from a collection of 149 red fox carcasses (trapped or shoot by cars) realized between January 2001 and August 2005 in the south-eastern part of the French department of the Ardennes, on an area of 900 km<sup>2</sup>. Twenty-nine foxes came from the neighbouring Meuse department (south-eastern part of the study site). The fox intestines had been examined (Guislain, unpublished data) following the Sedimentation and Counting Technique (SCT) as described by Raoul et al. (2001). Fifty-three percent of examined foxes (n=79) harboured worms. Precise worm burden was established for all positive foxes, and a

variable number of worms were sampled for each fox (from 2 to 50 adult worms) and stored in 70° ethanol until use.

Foxes were *a posteriori* classified following two worm burden classes: foxes harbouring less than 10 000 adult worms (low to medium worm burden, n=72 foxes) and foxes harbouring more than 10 000 worms (high worm burden, n=7 foxes). According to the number of worms available, up to five worms were selected for each fox with a low to middle burden, and up to 10 worms for each fox with high burden. More samples were isolated from foxes with high burdens in order to (i) screen heterozygosity, which is supposed to be obtained after cross-fertilization between two worms (Haag et al., 1998) and (ii) assess the possibility of colonisation by different genotypes in the small intestine of foxes (Nakao et al., 2003). These both phenomena probably occur more frequently when the *E. multilocularis* population in a single fox is largest.

Microscopic examination of worms was used to select intact worms with at least 3 segments, among which at least one gravid (with visible eggs). We included in this present study only foxes with at least 5 adult worms available, according to the criteria cited above.

#### *E. multilocularis* DNA extraction

Each individual worm, treated separately, was washed three times with distilled water and digested by Proteinase K during a night. Total DNA was extracted with the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Germany), according to the recommendations of the supplier. The purified DNA sample was eluted in 50µl in elution buffer and stored at -20°C, before use for PCR amplification.

#### *Investigate E. multilocularis* polymorphism by *EmsB* microsatellite target

The genetic diversity of *E. multilocularis* was assessed with the tandem repeated multilocus microsatellite target *EmsB* (AY680860), isolated by Bart et al. (2006). This target is composed of two repeated and juxtaposed motifs: (CA)<sub>n</sub> and (GA)<sub>n</sub>, where n is the number of repetition (Table I). The variation of n among *E. multilocularis* samples allowed the identification of different genotypes (Knapp et al., unpublished data). Comparison with available *EmsB* genotypes described by Knapp et al. (unpublished data) in a world panel (European, Chinese, Japanese, Alaskan samples) allowed us to establish the status of *E. multilocularis* coming from the French region of the Ardennes in the European context.

### *Fluorescent-PCR amplification and fragment size analysis*

The study of *E. multilocularis* polymorphism was led by fluorescent PCR amplification and followed by fragment size analysis.

PCR amplification was realized in parallel in two different laboratories, in Besançon (France) and in Berne (Switzerland) to assess reproducibility of the method. PCR reaction was led in a 30µl reaction mixture containing 20 to 50ng of purified DNA of a whole single worm, 200µM of each dNTP (GeneAmp®, Applied Biosystems, NJ, USA), 0.4µM of fluorescent forward primer, 5'-labeled with specific fluorescence dye and 0.7µM of classical reverse primers and 0.5U of AmpliTaq® DNA Polymerase (Applied Biosystems®, NJ, USA) in Berne and 0.5U of REDTaq™ DNA Polymerase (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MI, USA) in Besançon. The amplification reaction was performed in a thermocycler, type Biometra (Whatman Biometra®), under the following conditions: 30 cycles with denaturing at 94°C for 30s, annealing at 60°C for 30s and extension at 72°C for 1min. Products of PCR were studied in size polymorphism by using an automatic sequencer, type ABI Prism 3100 (Applied Biosystems®, CA, USA) in Berne, and a Beckman CEQ 8000 (Beckman Coulter™, CA, USA) in Besançon. Fluorescence signals generated by marked primers were read by colorimetric analysis. Correspondences were automatically established to assess size of the amplified fragments by software integrated to the automatons. Stability of EmsB profiles were checked by repeated (5 times) tests on two samples selected randomly from the *E. multilocularis* panel.

### *Mitochondrial genotyping by ATPase 6 deshydrogenase*

In order to compare the reliability of the microsatellite targets versus markers traditionally used for genotyping of *E. multilocularis*, the ATP synthase subunit 6 gene (*atp6*) was studied for all the 25 foxes. This gene exhibits a high polymorphism among all the mitochondrial genes when compared within *E. multilocularis* samples (Yang et al., 2005) and with other *Echinococcus spp.* samples (Nakao, unpublished data). A primer set, named *atp6Em/F* (5'-GGTTATTGTGAATGATTTTGGTTC-3') and *atp6Em/R* (5'-AATGATCAATCGAAAAATCCAA-3'), defined the mitochondrial genome (AB018440) (Nakao et al., 2002), was designed to amplify a 512bp fragment (Table I). PCR conditions were the same that described above. Amplified products were purified then sequenced with the Beckman CEQ 8000 (Beckman Coulter™, CA, USA).

### *Genotype determination and statistical analysis*

For EmsB target, electrophoregram presented series of peaks corresponding to alleles. Presence of peaks and their associated height were recorded as described by Bart and co-workers (Bart et al., 2006) and improved by Knapp et al. (unpublished data). These data were used to assess genetic diversity provided by EmsB, establishing clusters by hierarchical analysis, using the Euclidean distance and the Unweight Pair Group Method with Arithmetic mean (Legendre and Legendre, 1998). Stability of clusters was tested by a multiscale bootstrap resampling ( $B = 1000$ ), resulting in approximately unbiased  $p$ -values (Shimodaira, 2002, 2004). Clustering analyses were performed by using the R software (R-Development-Core-Team, 2005) and package *pvcust* (Suzuki and Shimodaira, 2005). In previous experiments (Bart et al., 2006), three samples (500, 501 and 502) of one *E. multilocularis* strain maintained *in vivo* in *Meriones unguiculatus* (by serial passages in 6-months-intervals) were tested to demonstrate identical EmsB profiles among identical parasites obtained from different animals at different time points. This experiment allowed us to determine reproducibility and repeatability of EmsB microsatellite analyses. The genetic distance between these three samples was used to calculate a genetic threshold, as employed by Knapp et al. (unpublished data).

### **Results**

One hundred and forty intact and gravid adult worms were isolated from 25 red foxes, from the collection of 79 *E. multilocularis*-infected foxes. The fox R03056 presented a high parasitic burden ( $n = 18630$ ), but it was possible to isolate only 5 entire and mature worms. The details of red foxes and their parasitic burden are available in Table II.

### *Assessment of E. multilocularis polymorphism*

In both laboratories (Besançon and Berne) the 140 adult worms were all positive for amplification by PCR of the EmsB microsatellite target. The repeatability was assessed by performing the whole process (PCR and fragment analysis) on the isolates R05147-2 and R05151-4 in a 5-fold manner with both systems. The standard deviation  $\sigma$  of the genetic distance values was calculated between each repetition (Table III). The best results were obtained with the ABI Prism 3100 automaton for the both samples. Fragment size analyses of the sample panel were realised on this former.

The *E. multilocularis* panel presented two distinct genotypes (A) and (B) (Fig. 1 and Table II). These two genotypes were confirmed by cladistic analysis, which showed a genetic

distance of 0.21 between worms belonging to these two genotypes. The profile (A) was characterised by an allele at 215bp, following by a series of alleles at 225 to 239bp (Fig. 1A). The genotype (B) was characterised by a succession of alleles at 225 to 235bp (Fig. 1B). The first represented 26.4% of the sample panel and the second was found for 73.6% of the isolates. But 7 foxes harboured the two genotypes together in their small intestines. Then 2 foxes harboured only the genotype (A), and 16 foxes the single genotype (B). The genetic distance threshold of 0.08 was applied on the dendrogram to identify clusters among the sample panel, as described by Knapp and co-authors and calculated on the samples 500, 501 and 502 as describe above (Knapp et al., unpublished data) (Figure 2). Samples with less than 0.025 of genetic distance were pooled to clarify the dendrogram. This threshold led to split samples with the genotype (A) into 2 clusters, and samples with genotype (B) into 4 clusters.

#### *Mitochondrial genotyping by ATPase 6 deshydrogenase*

A total of 32 adult worms were screened from the 25 foxes (2 worms, i.e. 1 worm per profile, were examined for the seven foxes harbouring mixed contamination). Twenty-nine sequences presented 100% homology with the reference sequence (GbR AB027557). Only three worms (R05172-3, R05170-16 and R03070-3) presented each one mutation (Table IV). Thus it was impossible to discriminate the two main EmsB profiles (A and B) from this target.

#### **Discussion**

This study, focused on the French region of the Ardennes, followed the investigation of the genetic diversity of *E. multilocularis* in the main endemic foci (China, Japan, Alaska and Europe) (Knapp, unpublished data).

This present investigation was led in the aim of assessing the polymorphism status of *E. multilocularis* on a regional range (900 km<sup>2</sup>) and in a likely new endemic area (Depaquit et al., 1998). The hierarchical analysis allowed us to discriminate 2 main genotypes, (A) and (B). They were clearly separated by an important genetic distance, which allowed us to considerate these formers as two distinct entities found in the studied area. The genetic threshold fixed at 0.08 split the panel into 6 clusters (2 and 4 clusters respectively), showing possible occurrence of mutations among these genotypes. These clusters could result on small differences among EmsB fragments, only due to variations of their copy numbers and represented on electrophoregrams by variations on the height of peaks (data not shown). The genotype (B) seems to be predominant in the total parasitic biomass sampled (108/140 worms). Few foxes harboured only the genotype (A) (2/25 foxes). Different hypothesis could

be formulated: (i) the genotype (B) could reduce the colonisation of the genotype (A) maybe by its biological characteristics, due to a particular phenotype or (ii) the genotype (A) was appeared more recently in the area. But these both genotypes were found together and independently in 7 out of 25 foxes and then the second hypothesis could be held. The case of mixed contamination was already met (Nakao et al., 2003). This suggests a possible multi-contamination of fox during the hunting activity, triggering a colonisation of the small intestine by different parasite populations. A parasitic accumulation could also be possible, as three of the four higher burdens resulted from the presence of both genotypes. Furthermore, these four foxes harboured more than 80% of the parasitic burden and thus could be the main actors in the contamination of the environment.

In this context it was interesting to investigate a possible recombination, occurring after cross-fertilization. However, in this study, we failed to identify heterozygotes between the EmsB genotypes (A) and (B). This phenomenon could be explained by a sympatric existence of the two genotypes in the same area. Moreover, the great complexity of EmsB target could not allow us to identify isolates resulting from a crossing-fertilization. Furthermore *E. multilocularis* does not follow the Hardy-Weinberg laws, and as a consequence it is not possible to calculate the expected rate of recombination. The use of a single-locus microsatellite should enable us to investigate this phenomenon, and increase the knowledge about reproduction and cross-fertilization of the parasite in the definitive host, as described by several authors (Haag et al., 1998; Nakao et al., 2003).

The microsatellite analysis allowed us to raise a genetic diversity in *E. multilocularis*, not found with the *atp6* mitochondrial target in this area. These results increase the potential of the EmsB target to subtype samples with an apparent genetic homogeneity. A further step should be to search for possible exchanges existing with the neighbouring foci. In comparison with rodents caught in a Swiss field of about 500m x 500m, harbouring a single EmsB genotype, more exchanges are susceptible to appear at a regional range. With our present findings, the hypothesis of the contamination of the Swiss rodents by a single fox is privileged. The regional range seems to be adapted for this kind of study, where phenomenon of exchanges between different areas can be taken in consideration. Results of this investigation, conducted on a limited area of 900 km<sup>2</sup>, can also be considered as a part of a larger picture of *E. multilocularis* diversity in Europe. Studies are being conducted at the present time on a larger adult worm panel, realized on several countries by the EchinoRisk Project. Genetic diversity between new and older endemic countries could improve knowledge about parasite spreading. The emergence of *E. multilocularis* in new endemic

areas could be due to an extension of this cestode from the endemic Alpine area as Germany or Austria to areas still free of *E. multilocularis*. Thus a possible source of parasite, made of a single genotype, could supply new sites. In this case, the genetic diversity could be lower in new areas than in the source one. The genetic polymorphism of *E. multilocularis* could be superimposed to geographical data in further researches to understand the occurrence of some genotypes in particular areas and to seek for a possible geographic structure in *E. multilocularis* genotypes. The public health prevention should be intensified in new endemic foci as the French region of the Ardennes where the prevalence of *E. multilocularis* in fox is known to be worrying.

### Acknowledgements

This work was financially supported by PPF Program of the University of Franche-Comté (Programme Pluri-Formations “Milieux naturels, milieux anthropisés”).

### References

- Bart, J.M., Knapp, J., Gottstein, B., El-Garch, F., Giraudoux, P., Glowatzki, M.L., Berthoud, H., Maillard, S., Piarroux, R. (2006) EmsB, a tandem repeated multi-loci microsatellite, new tool to investigate the genetic diversity of *Echinococcus multilocularis*. *Infect. Genet. Evol.*, 6, 390-400.
- Bresson-Hadni, S., Piarroux, R., Bartholomot, B., Miguet, J.P., Manton, G., Vuitton, D. (2005) Echinococcose alvéolaire - Alveolar echinococcosis. *EMC - Hépatogastroentérologie*, 2, 86-104.
- Bretagne, S., Assouline, B., Vidaud, D., Houin, R., Vidaud, M. (1996) *Echinococcus multilocularis*: microsatellite polymorphism in U1 snRNA genes. *Exp. Parasitol.*, 82, 324-328.
- Casulli, A., Manfredi, M.T., La Rosa, G., Di Cerbo, A.R., Dinkel, A., Romig, T., Deplazes, P., Genchi, C., Pozio, E. (2005) *Echinococcus multilocularis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) of the Italian Alpine region: is there a focus of autochthonous transmission? *Int. J. Parasitol.*, 35, 1079-1083.
- Depaquit, J., Gallego, A., Usseglio, F., Liance, M., Favriel, J.M. (1998) L'échinococcose alvéolaire dans le département français des Ardennes: cas isolés ou nouveau foyer? *Parasite*, 5, 285-287.
- Eckert, J., Conraths, F.J., Tackmann, K. (2000) Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? *Int. J. Parasitol.*, 30, 1283-1294.



- Haag, K.L., Araujo, A.M., Gottstein, B., Zaha, A. (1998) Selection, recombination and history in a parasitic flatworm (*Echinococcus*) inferred from nucleotide sequences. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 93, 695-702.
- Knapp, J, Bart, J.M., Chalon, A., El-Garch, F., Breyer, I., Morgenthaler, P., Gottstein, B., Piarroux, R. (2004) Interest of microsatellite analysis to assess genetic diversity in *Echinococcus multilocularis*. IX European multicolloquium of Parasitology. Valencia, Spain
- Kern, P., Bardonnnet, K., Renner, E., Auer, H., Pawlowski, Z., Ammann, R.W., Vuitton, D.A. (2003) European echinococcosis registry: human alveolar echinococcosis, Europe, 1982-2000. *Emerg. Infect. Dis.*, 9, 343-349.
- Legendre, P., Legendre, L. (1998) Numerical ecology, 2nd English edition. Elsevier Science BV, Amsterdam.
- Myjak, P., Nahorski, W., Pietkiewicz, H., von Nickisch-Roseneck, M., Stolarczyk, J., Kacprzak, E., Felczak-Korzybska, I., Szostakowska, B., Lucius, R. (2003) Molecular confirmation of human alveolar echinococcosis in Poland. *Clin. Infect. Dis.*, 37, e121-125.
- Nakao, M., Sako, Y., Ito, A., (2003) Isolation of polymorphic microsatellite loci from the tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Infect. Genet. Evol.*, 3, 159-163.
- Nakao, M., Yokoyama, N., Sako, Y., Fukunaga, M., Ito, A. (2002) The complete mitochondrial DNA sequence of the cestode *Echinococcus multilocularis* (Cyclophyllidea: Taeniidae). *Mitochondrion*, 1, 497-509.
- Piarroux, M., Bresson-Hadni, S., Capek, I., Knapp, J., Watelet, J., Dumortier, J., Abergel, A., Minello, A., Gérard, A., Beytout, J., Piarroux, R., Kantelip, B., Delabrousse, E., Vaillant, V., Vuitton, D., FrancEchino, p.l.r. (2006) Surveillance de l'échinococcosse alvéolaire en France : bilan de cinq années d'enregistrement 2001-2005. *BEH*, 27-28, 206-208.
- Raoul, F., Deplazes, P., Nonaka, N., Piarroux, R., Vuitton, D.A., Giraudoux, P. (2001) Assessment of the epidemiological status of *Echinococcus multilocularis* in foxes in France using ELISA coprotests on fox faeces collected in the field. *Int. J. Parasitol.*, 31, 1579-1588.
- R-Development-Core-Team (2005) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.r-project.org>.
- Reiterova, K., Miterpaková, M., Turcekova, L., Antolova, D., Dubinsky, P. (2005) Field evaluation of an intravital diagnostic test of *Echinococcus multilocularis* infection in red foxes. *Vet. Parasitol.*, 128, 65-71.
- Romig, T., Dinkel, A., Mackenstedt, U. (2006) The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol. Int.*, 55 Suppl, S187-191.
- Saeed, I., Maddox-Hyttel, C., Monrad, J., Kapel, C.M. (2006) Helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Denmark. *Vet. Parasitol.*, 3521.

Shimodaira, H. (2002) An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. *Syst. Biol.*, 51, 492-508.

Shimodaira, H. (2004) Approximately unbiased test of regions using multistep-multiscale bootstrap resampling. *Ann. Stat.*, 32, 2616-2641.

Suzuki, R., Shimodaira, H. (2005) pvclust: hierarchical clustering with p-values. R package version 1.0-3 <http://www.is.titech.ac.jp/~shimo/prog/pvclust/>.

Thompson, R.C., Kapel, C.M., Hobbs, R.P., Deplazes, P. (2006) Comparative development of *Echinococcus multilocularis* in its definitive hosts. *Parasitology*, 132, 709-716.

Vuitton, D.A., Zhou, H., Bresson-Hadni, S., Wang, Q., Piarroux, M., Raoul, F., Giraudoux, P. (2003) Epidemiology of alveolar echinococcosis with particular reference to China and Europe. *Parasitology*, 127 Suppl, S87-107.

Yang, Y.R., Rosenzvit, M.C., Zhang, L.H., Zhang, J.Z., McManus, D.P. (2005) Molecular study of *Echinococcus* in west-central China. *Parasitology*, 131, 547-555.

**Table I.** Primer sequences and characteristics of microsatellite loci in *E. multilocularis*

| Primer name<br>(*primer<br>labelled) | Primer sequence  | Fragment<br>size (bp) | Tm<br>(°C) | Repetition     | Designed               |
|--------------------------------------|--|-----------------------|------------|----------------|------------------------|
| EmsB1/2 A*<br>EmsB1/2 C              | 5'-GTGTGGATGAGTGTGCCATC-3'<br>5'-CCACCTTCCCTACTGCAATC-3'       | 209-243               | 60         | (CA)n<br>(GA)n | in house<br>(AY680860) |
| atp6Em/F<br>atp6Em/R                 | 5'-GGTTATTGTGAATGATTTTGGTTC-3'<br>5'-AATGATCAATCGAAAAATCCAA-3' | 512                   | 69         | /              | New / in<br>house      |

**Table II.** Description and characteristics of the red fox panel and parasitic burden.*Em: Echinococcus multilocularis*

| Code   | Department | sex | <i>Em</i> burden | Date of<br>sampling | Nb of<br>adult<br>worm | Genotype<br>(A) | Genotype<br>(B) |
|--------|------------|-----|------------------|---------------------|------------------------|-----------------|-----------------|
| R02030 | [55]       | F   | 4247             | 24/02/2002          | 5                      | 0               | 5               |
| R03056 | [08]       | F   | 18630            | 10/02/2003          | 5                      | 0               | 5               |
| R03061 | [08]       | F   | 1290             | 09/03/2003          | 5                      | 0               | 5               |
| R03064 | [08]       | F   | 1797             | 04/04/2003          | 5                      | 0               | 5               |
| R04126 | [08]       | F   | 1230             | 02/11/2004          | 5                      | 3               | 2               |
| R04131 | [08]       | M   | 46               | 19/11/2004          | 5                      | 0               | 5               |
| R04136 | [55]       | M   | 30               | 07/12/2004          | 5                      | 0               | 5               |
| R04138 | [08]       | M   | 190              | 18/12/2004          | 5                      | 0               | 5               |
| R05147 | [08]       | M   | 16510            | 15/01/2005          | 10                     | 8               | 2               |
| R05149 | [08]       | M   | 14               | 30/01/2005          | 5                      | 3               | 2               |
| R05151 | [08]       | F   | 1430             | 07/02/2005          | 5                      | 0               | 5               |
| R05152 | [08]       | F   | 38               | 13/02/2005          | 5                      | 0               | 5               |
| R05153 | [08]       | F   | 2470             | 14/02/2005          | 5                      | 0               | 5               |
| R05154 | [08]       | M   | 4697             | 15/02/2005          | 5                      | 1               | 4               |
| R05156 | [08]       | M   | 3522             | 16/02/2005          | 5                      | 0               | 5               |
| R05157 | [08]       | M   | 420              | 17/02/2005          | 5                      | 1               | 4               |
| R05161 | [08]       | M   | 1820             | 03/03/2005          | 5                      | 2               | 3               |
| R05163 | [08]       | F   | 26               | 07/03/2005          | 5                      | 0               | 5               |
| R05164 | [08]       | F   | 18               | 10/03/2005          | 5                      | 0               | 5               |
| R05167 | [08]       | M   | 6520             | 27/04/2005          | 5                      | 5               | 0               |
| R05169 | [08]       | M   | 117              | 04/05/2005          | 5                      | 0               | 5               |
| R05170 | [08]       | F   | 73380            | 13/05/2005          | 10                     | 4               | 6               |
| R05172 | [08]       | M   | 4870             | 16/05/2005          | 5                      | 0               | 5               |
| R05173 | [08]       | F   | 32520            | 10/06/2005          | 10                     | 10              | 0               |
| R05174 | [08]       | M   | 65               | 13/06/2005          | 5                      | 0               | 5               |
|        |            |     |                  |                     |                        |                 | 103             |
|        |            |     | 175897           |                     | 140                    | 37 (26.4%)      | (73.6%)         |

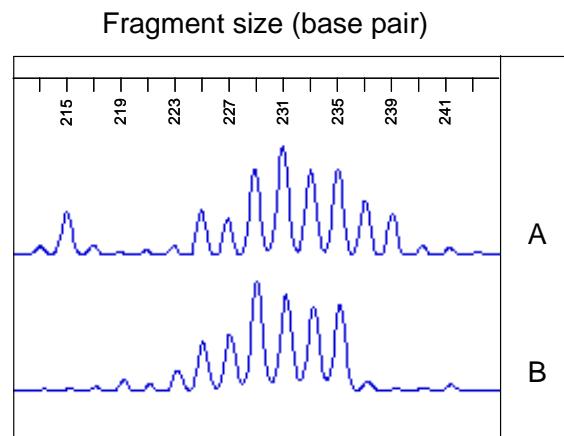
**Table III.** Comparison of results obtained with Applied Biosystems® (ABI) and Beckman Coulter™ apparatus. For the two systems, standard deviation ( $\sigma$ ) was calculated on the genetic distance values of the 5 repetitions of the samples R05147 and R05151.

| isolate  | ABI system |          | Beckman system |          |
|----------|------------|----------|----------------|----------|
|          | R05147-2   | R05151-4 | R05147-2       | R05151-4 |
| $\sigma$ | 0.0042     | 0.0035   | 0.0059         | 0.0085   |

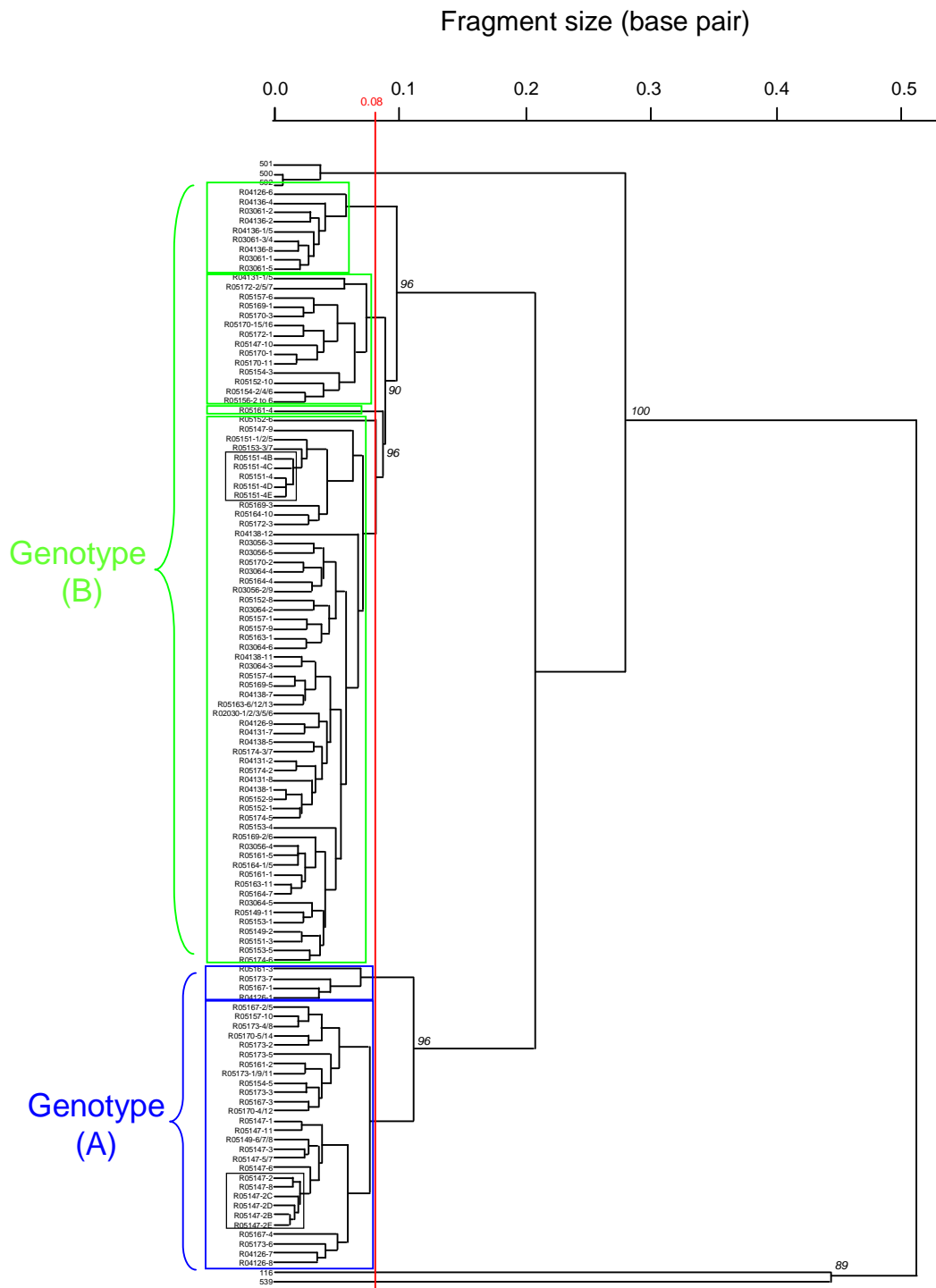
**Table IV.** Mutations identified after sequencing of the ATPase 6 dehydrogenase gene (Gb R AB027557) realised on a single (for foxes harbouring one EmsB genotype) or two worms (for foxes harbouring the both EmsB genotypes).

| Code             | ATPase 6 dehydrogenase gene<br>(GbR AB027557) |     |     |     |     |     |
|------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|
|                  | N   | AA  | N   | AA  | N   | AA  |
|                  | 63  | 22  | 376 | 120 | 409 | 137 |
|                  | A   | Ser | G   | Ala | T   | Cys |
| <b>R05170-16</b> | G   | Gly |     |     |     |     |
| <b>R05172-3</b>  |   |     | A   | Thr |     |     |
| <b>R03070-3</b>  |   |     |     |     | A   | Ser |

N:  
Nucleotide  
AA: Amino Acid



**Figure 1.** Electrophoregrams of EmsB loci, achieved with the automatic sequencer ABI Prism 3100<sup>TM</sup>. Peaks less than 10% of the higher peak were considered as artefacts.



**Figure 2.** Dendrogram realised with EmsB amplification data, by hierarchical cluster analysis (Euclidian distance, average link clustering method), with R software and pvclust package. Stability of clusters was tested by a multi-scale bootstrap resampling ( $B = 1000$ ), resulting in approximately unbiased  $p$ -values (in italics). Samples discriminated by a genetic distance lower than 0.025 were pooled, to simplify the tree. Sample 116, originating from a Mauritanian camel, and sample 539, originating from an Algerian sheep, were *E. granulosus* samples and were included as an out-group control. The samples 500, 501 and 502 (strain maintained *in vivo* on *Meriones unguiculatus*) were used to calculate the genetic threshold. The two black boxes represented the 5-time repetition of R05147-2 and R05151-4 samples.

#### **II.4. Conclusion de la première partie**

L'étude menée dans le sud des Ardennes nous a permis de mettre en évidence un taux de transmission important du parasite dans cette zone de nouvelle endémie, puisque la moitié des renards sont porteurs d'*E. multilocularis*. Comme dans les autres régions d'endémie historique, les fortes prévalences chez les renards semblent associées à une consommation importante d'au moins une espèce de rongeur hôte intermédiaire par ce carnivore (en l'occurrence *Microtus arvalis*). Cependant, contrairement à la situation Franc-comtoise où la spécialisation du régime alimentaire du renard sur ces hôtes intermédiaires est liée aux pullulations de rongeurs (Raoul, 2001), elles-mêmes associées aux caractéristiques du paysage (Delattre et al., 1996, 1999; Raoul et al., 2001), dans les Ardennes, la structure du paysage ne semble pas à l'origine de pullulations d'hôtes intermédiaires.

L'utilisation des outils biomoléculaires met en évidence la présence de deux génotypes parasitaires déjà identifiés en Europe (Knapp et al., unpublished data), qui coexistent non seulement dans la population de renards étudiée mais aussi, parfois, dans un même renard. Il serait pertinent de pouvoir déterminer si le génotype B, majoritaire dans les échantillons testés, pourrait correspondre à un génotype apparu antérieurement au génotype A. La caractérisation génotypique des populations de parasites doit être poursuivie au sein de la zone d'endémie et dans les zones de nouvelle endémie pour pouvoir comprendre l'importance relative des différents génotypes dans la contamination des hôtes et dans l'expansion géographique du parasite.

A ce stade, un changement de grain d'analyse est requis, d'une part pour rechercher des facteurs expliquant la forte prévalence constatée en s'intéressant à l'environnement entourant les renards; d'autre part pour tenter de préciser le rôle de chacun des deux génotypes dans la transmission parasitaire, en les rapprochant des données de terrain sur le fonctionnement du cycle d'*E. multilocularis*.

### **III. DEUXIEME PARTIE**

**Hétérogénéité spatiale d'*Echinococcus multilocularis*  
chez les renards, à une étendue régionale (900 km<sup>2</sup>)  
et un grain local (1 km<sup>2</sup>)**





### III.1. Objectifs de la deuxième partie

L'hétérogénéité est de règle dans les systèmes vivants et cela est d'autant plus vrai lorsque l'on s'intéresse aux parasites (Wilson et al., 2002). Aussi, nous avons cherché à caractériser la distribution spatiale des prévalences vulpines et des charges parasitaires dans la zone d'étude du sud des Ardennes pour déterminer dans quelle mesure certains facteurs connus comme agissant sur la transmission parasitaire à un grain régional (densités d'hôtes intermédiaires, paysage, Giraudoux et al., 2002) peuvent intervenir à un grain local. Le choix d'un grain d'étude de quelques kilomètres carrés n'est pas anodin, puisqu'il est représentatif du milieu dans lequel évoluent non plus la population de renards, mais les individus.

Par l'étude de l'influence de la localisation des renards sur leur statut parasitaire (porteur ou sain), l'analyse du paysage autour des lieux de collecte des renards et l'analyse de leur charge parasitaire mise en relation avec le type génétique du parasite, notre objectif est de répondre aux questions suivantes:

- A étendue régionale et grain d'analyse local, peut-on identifier des caractéristiques du paysage qui peuvent favoriser l'infestation des renards?
- A cette échelle d'analyse, y a-t-il un lien entre prévalence vulpine et abondance des hôtes intermédiaires?
- Quelle est la distribution spatiale des différents génotypes d'*Echinococcus multilocularis* portés par les renards?

Ces analyses ont fait l'objet de la publication suivante (**article 3**) intitulée:

**Guislain, M.-H.**, Knapp, J., Poulle, M.-L., Raoul, F., Giraudoux, P. Factors influencing the spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* infection of red fox on a 1km<sup>2</sup> resolution.



**III.2. Article 3**

**FACTORS INFLUENCING THE SPATIAL DISTRIBUTION OF *Echinococcus multilocularis* INFECTION OF RED FOX ON A 1 KM<sup>2</sup> RESOLUTION**

Guislain Marie-Hélène <sup>1,2</sup>, Knapp Jenny <sup>3</sup>, Poulle Marie-Lazarine <sup>2,4</sup>, Raoul Francis <sup>1</sup> & Giraudoux Patrick <sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Department of Environmental Biology, usc INRA-EA 3184, University of Franche-Comté, 1 place Leclerc, 25030 Besançon, France

<sup>2</sup>) 2C2A-CERFE, rue de la Héronnière, 08240 Boult-aux-Bois, France

<sup>3</sup>) Laboratory of Parasitology, SERF Team, University of Franche-Comté, 25000 Besançon, France

<sup>4</sup>) Laboratory of Parasitology-Mycology, EA 3800, UFR de Médecine, IFR 53, 51 rue Cognac-Jay, 51095 Reims Cedex, France

**Abstract**

Understanding biological association between spatial distribution of disease and environmental variables is the key factor for initiating preventive actions against diseases. In the case of *Echinococcus multilocularis*, a cestode responsible for a rare but lethal zoonosis, a very heterogeneous distribution within host population is frequently observed, and some authors have put forward the role of landscape, rodent population dynamics or abiotic conditions to explain this heterogeneity on a continental extend. We studied *E. multilocularis* infection of red fox (*Vulpes vulpes*) on a new endemic area in the Ardennes, northeastern France, seeking with a very fine resolution (1 km<sup>2</sup>) for the presence of *E. multilocularis* in red foxes, quantifying worm burden, and analysing the spatial distribution of positive foxes. Furthermore, we compared the abundance of rodent populations between a low and a high endemic areas, and we characterised the landscape surrounding positive and negative foxes. Results showed a high heterogeneity of *E. multilocularis* distribution within the red fox population, with an effect of the Y coordinate of the foxes to their infection and a North-South prevalence gradient ranging from less than 20% in the North of the area to more than 80% in the South. Worm burdens were highly aggregated. *Microtus sp.* were the most abundant in areas with high prevalences, and a higher proportion of grassland was found in

the landscape surrounding positive foxes than in the landscape surrounding negative ones. We discussed the effects of environmental conditions on *E. multilocularis* transmission on a local (1 km<sup>2</sup>) grain.

**Key-words :** *Echinococcus multilocularis*, spatial distribution, red fox, landscape composition, parasite genotypes, *Microtus*, French Ardennes

## Introduction

Understanding the fundamental biological association between spatial distribution of disease and environmental variables is the key factor allowing public health practitioners to move beyond retrospective fire-fighting to prospective, preventive actions (see Hess et al., 2001). However, this understanding still remains a challenge for many diseases, especially for those involving a wildlife component in the parasitic life cycle, because of the diversity of the environmental variables involved (Giraudoux et al., 2002). One example of this situation is provided by *Echinococcus multilocularis* (*E. multilocularis*), a tiny cestode belonging to the *Taeniidae* family. Fox plays a key role in *E. multilocularis* cycle as definitive hosts harbouring adult worms in their intestines, while small mammals, mainly rodents, are the intermediate hosts harbouring larval form of the parasite in their liver (Rausch, 1995). Adult worms produce eggs that are released in the environment with the fox's faeces.

*E. multilocularis* is responsible of Alveolar Echinococcosis, a rare but possibly lethal zoonosis. Despite this disease is of special importance due to its wide geographic distribution and its local public health impact (eg central China, Alaska, Vuitton et al., 2003; Schantz et al., 1995), the understanding of its whole epidemiological system is still limited since only a few of the large number of interacting factors involved in the parasite cycle have been studied in details (Giraudoux et al., 2003; Eckert and Deplazes, 2004). One of the present challenges concerning prevention of human alveolar echinococcosis is to identify the environmental variables influencing the heterogeneous distribution of *E. multilocularis* prevalence in the wildlife host populations.

*E. multilocularis* prevalence in host populations is spatially heterogeneous over the continental extend of its distribution, with an increase from the rather uniform biotope condition of Arctic tundra region to sub-Arctic regions of North America and Eurasia (Eckert and Deplazes, 2004). Despite the wide distribution of foxes and the ubiquity of susceptible small mammals in most European habitats, the parasite has so far not been recorded in the

south-east of Europe, Iberian Peninsula, Great Britain, Finland and regions east to Poland and Slovakia (Romig et al., 2006). Furthermore, its prevalences in foxes in the european endemic area varies in a great extend from one region to another (Gilot et al., 1988; Pesson and Carbiener, 1989; Raoul et al., 2001; Miterpaková et al., 2003; Sréter et al., 2004; Van der Giessen et al., 2004). In a more general way, Romig et al. (1999) indicated that the parasite is mainly present in hilly regions, with a cold climate and an extensive agriculture.

On a regional grain (following Hobbs, 2003, the grain is considered here as the resolution chosen for a study, namely the smallest difference definable) numerous attempts have been made to link the spatial heterogeneity of *E. multilocularis* prevalence in foxes to vegetation types (Gilot et al., 1988; Pesson and Carbiener, 1989), to landscape features affecting the density of intermediate hosts (Raoul et al., 2001; Staubach et al., 2001) and/or to abiotic factors (mainly humidity) affecting the egg survival (Sréter et al., 2004; Shaikenov, 2006). High prevalences in human and definitive hosts were observed when the landscape contained a high proportion of the optimal habitat for the main intermediate host : grasslands for *Microtus arvalis* and *Arvicola terrestris* in most parts of Europe, dense undergrowth in Japanese forests for *Clethrionomus rufocanus*, shrubland resulting from deforestation for *Microtus limnophilus* and *Cricetulus longicaudatus* in South Gansu, China (Pesson and Carbiener, 1989, Tackmann et al., 1998, Viel et al., 1999; Raoul et al., 2001, Giraudoux et al., 2003).

By contrast, very few attempts have been made on a local grain to link the spatial heterogeneity of *E. multilocularis* prevalence to environmental factors such as humidity, landscape pattern and rodent density. Veit et al. (1995) showed that egg conservation is dependant on humidity and temperature, and Hansen et al. (2003, 2004) indicated that the modeling of the local heterogeneity of *E. multilocularis* can be improved when taking into account the proximity of water. By another way, Martinek et al. (2001) and Staubach et al. (2001) found a higher proportion of pastures - assumed to be associated to high intermediate host density - and a lower proportion of forest in the landscape surrounding infected *versus* uninfected foxes. However, Romig et al. (2006) did not find any correlation between infection of *E. multilocularis* in foxes and the proportion of grassland in the landscape. The role of landscape pattern in explaining the infection of foxes through soil humidity and/or intermediate host density needs therefore to be clarified. Furthermore, the genetic type of worms must be considered, since there are considerable differences in virulence and infectivity among *E. granulosus* genetic types (Bart et al., 2003). The presence of different *E. multilocularis* strains may modify parasite transmission, through differences in

development or in egg production between strains (Thompson, 1995), or through spread of new strains within fox populations in new endemic areas.

The aim of this study was to explore the role of landscape characteristics and intermediate host densities on the spatial heterogeneity of *E. multilocularis* infection in foxes and of worm genetic types on a regional extend with a local (1 km<sup>2</sup>) resolution.

## Methods

### *Study area*

The study was conducted on a 900 km<sup>2</sup> area located in northeastern France and included the southeastern part of the Ardennes region and a part of the Meuse region. Altitude ranges from 200 m to 300 m above sea level. Climate is sub-continental with average temperatures lower than 6°C during five months by year, and regular precipitations all the year long with an average of 60 mm per month. The landscape comprised 60 % of agricultural land and 35 % of forests. Arable lands and grasslands represented 46 % and 53 % of the agricultural land respectively (inventory of Ardennes cadastral surfaces in 2003, <http://ddaf.ardennes.agriculture.gouv.fr>). The human population density was very low (10 inhabitants / km<sup>2</sup>) and spread out in very small villages.

### *Detection of Echinococcus multilocularis in foxes*

Trappers, hunters and some inhabitants of the study area were informed that a collection of fox carcass was undertaken for the present study. As a result, an amount of 181 carcasses of foxes, which were trapped, hunted, or killed by traffic, were collected from January 2001 to March 2005. They were all necropsied and a total of 149 intestines were isolated to diagnostic. These intestines were inspected with the Sedimentation and Counting Technique (SCT, Eckert, 2000) to seek for the presence of *Echinococcus multilocularis* and to quantify worm burden.

### *Echinococcus multilocularis genotyping*

A total of 140 worms, originating from 25 of the 79 positive foxes found, were sought for genetic heterogeneity with the tandem repeated multilocus microsatellite target EmsB (Knapp et al., unpublished data). Identified genotypes were included in a geographic information system database and localised within the study area.

### *Geographic Information System database and landscape analysis*

From the 149 diagnosed foxes, 81 (54 %) were located in the field with Garmin® GPS, while 47 foxes (32 %) were randomly located in a restricted area (maximum of 13.5 km<sup>2</sup>) based on the information provided by the trappers or hunters, and 21 foxes (14 %) were randomly located within the territory of the municipality where they were collected, since no more precise information was available. Only foxes with precise locations (n=81) were included in the landscape analysis. All data were included in a Geographic Information System (GIS) using ArcView GIS 3.2 (ESRI Inc., Redlands, California). Attributions of random coordinates were realised using ArcToolbox (ESRI Inc., Redlands, California).

Two buffer zones were created around each sampled fox to determine land-use composition: one with a radius of 0.6 km and another with a radius of 1 km. This corresponded to the size of fox home ranges in the study area, estimated to be on average 1 km<sup>2</sup>, with a maximum of 3 km<sup>2</sup> (Henry et al., 2005). Land-use composition of buffer zones was calculated using an overlay analysis performed by intersecting the buffer zones with the Corine Land Cover map of land-use categories (CLC 2000, [www.ifen.fr](http://www.ifen.fr)), as realised by Staubach et al. (2001). Landscape analyses were realised with ArcView GIS 3.2 ® software.

### *Estimation of rodent densities*

The study was focused on grassland rodents, mainly *Microtus arvalis* and *Arvicola terrestris* which are the main intermediate hosts of *E. multilocularis* in Western Europe (Rausch, 1995). Their relative densities were estimated by kilometric transects. Transects consisted of a succession of 10 paces intervals which were considered as “positive” or “negative” relatively to the presence/absence of indices of *Microtus sp.* and *Arvicola terrestris* (Delattre et al., 1990; Giraudoux et al., 1995, Delattre et al., 1999; Quéré et al., 2000). Transects are usually employed for the large range estimation of small mammal relative density (Hansson, 1979; Delattre et al., 1999; Fichet-Calvet et al., 1999; Quéré et al., 2000). Relative densities were expressed for both species as the proportion of 10 paces intervals with positive sightings. Transects were performed in October 2005 in the Northern part of the study area in five sites (s1 to s5), distant from each other by a minimum of 1.5 km and a maximum of 3.25 km, and in the Southern part of the study area in two sites : s6 and s7 (Figure 1). In sites, the same eight different habitats were sampled.



### *Statistical analyses*

Guilain et al. (unpublished data) showed that *E. multilocularis* infection in the present study area was not affected by the sex and age class of foxes, nor by the season and year of collection. These variables were, therefore, not included in the subsequent analyses. The influence of geographic position of foxes on their infection status was determined using logistic regression. Models successively including X (longitude), Y (latitude), X + Y, X + Y and their interaction, X<sup>2</sup>, Y<sup>2</sup>, X<sup>2</sup> + Y<sup>2</sup>, X<sup>2</sup> + Y<sup>2</sup> and their interactions, were compared using the information theoretic method outlined by Burnham and Anderson (2002), and were presented according to Anderson et al. (2001). The fox with the most western location (located at more than 12.5 km from other foxes) was excluded from the logistic regression. Final model was used to make predictive isopleths of prevalence rates. From these isopleths, and following Jenkins et al. (2005), the study area was split into an “high endemic area” (prevalence > 50 %) and a “low endemic area” (prévalence ≤ 50 %) and the proportions of intervals positive for *Microtus sp.* and *Arvicola terrestris* were compared between these two areas using a  $\chi^2$  test. We also compared worm burden in infected foxes between these two areas using a Mann-Whitney U-test, assuming that worm burden of infected was higher in the high endemic area than in the low one.

Furthermore, the mean percentage of grassland and forest in the buffer zones of infected *versus* non-infected foxes were compared by performing an unilateral z-test (Bouyer, 1996).

### **Results**

The number of foxes tested for *E. multilocularis* infection was highly variable from one municipality to another (Table I). Among the 149 foxes collected, 66 % came from only 25 % of the 28 municipalities, due to a restricted number of locally active hunters.

Two models could be retained to explain the spatial distribution of *E. multilocularis* infection in foxes: one with Y and another one with Y<sup>2</sup>. The simplest one was chosen, namely the model including the latitude, i.e. Y (Table II). Isopleth of predictive values of prevalence indicated a gradient from North to South, with estimated prevalences ranging from values lower than 20% in the North to values higher than 80% in the South (Figure 1). The northern part of the area was delimited with prevalence predicted values lower than 50% (isopleth 0.5, Figure 1) and was thus considered as the “low endemic area” of the study area, while the southern part of the area delimited with estimated prevalence values higher than 50% was considered as the “high endemic area”.

The worm burden was highly variable from one individual to another (Table I). They ranged from 2 to 16 510 worms per fox in the northern area, and from 1 to 73 380 worms per fox in the southern area (Figure 1). Worm burden in positive foxes were not significantly higher in the high endemic area than in the low endemic one (Mann-Whitney U-test,  $p=0.40$ ), even if more than 52% of the total worm biomass estimated on the study area was originating from municipalities n° 17 and n° 24, located in the high endemic area (Table I).

When comparing the proportion of grassland and forest surrounding infected foxes to those surrounding non-infected ones (Table III), the mean percentage of grassland in 600 m radius buffer zones was higher ( $Z=2.61$ ,  $p<0.001$ ) and the mean percentage of forest was lower ( $Z=3.17$ ,  $p<0.001$ ). Similar results were obtained for 1000 m radius buffer zones (Table III), with a higher mean percentage of grasslands surrounding infected than non-infected foxes ( $Z=2.81$ ,  $p<0.001$ ), and low mean percentage of forest ( $Z=3.75$ ,  $p<0.001$ ).

During October 2005, 3875 and 1578 transect intervals were walked in the northern part and southern part of the study area respectively. *Microtus sp.* abundance index varied from 3.4 % to 18 % in the five sites of the low endemic area, while it was of 28.7% and 35.3% in the two sites of the high endemic area, although the same eight habitat types were sampled. The total proportion of *Microtus sp.* positive intervals was higher in the high endemic area than in the low one (31.9% versus 10.6%,  $p<0.001$ ). During the same session, *Arvicola terrestris* relative abundance index varied from 0.7% to 5.7% in the five sites of the low endemic area, while it was of 0.7% and 1.3% in the two sites of the high endemic area. By contrast to *Microtus sp.*, the total proportion of *A. terrestris* positive intervals were higher in the low-endemic area than in the high-endemic one (3.5% versus 1 %,  $p<0.001$  ).

Two different genotypes were found within the study site (Knapp et al., unpublished data). The two foxes harbouring worms with genotype A were located in the center of the study area while the 16 foxes harbouring worms with genotype B and the 7 foxes harbouring a mix of worms with genotype A and of worms with genotype B were located in the southern as well as the northern part of the study area (Figure 2). Among the eight foxes provided by a same trapper (coming from the same municipality and from traps distant from each other of a maximum of 500 m), one harboured worms with genotype A, five harboured worms with genotype B, and two harboured worms with a mix of worms with genotype A and of worms with genotype B (Figure 2).

## Discussion

The present study demonstrated that the spatial heterogeneity of *E. multilocularis* prevalence in foxes, already described on a regional grain (see Ito et al., 2003; Giraudoux et al., 2002, 2006 for reviews) can also be observed on a more local grain (1 km<sup>2</sup>). Furthermore, a spatial gradient of fox prevalence was brought to the fore in the Ardennes area, as observed by Tackmann et al. (1998) in Germany, and by Van der Giessen et al. (2004) in the Netherlands. The spatial gradient of fox prevalence described by Tackmann et al. (1998) in northwestern Brandenburg (Germany) corresponded to a central area of 400 km<sup>2</sup> surrounded by concentric circles where prevalence decreased rapidly in a distance range of 26 km around the high-endemic focus. Similarly, Van der Giessen et al. (2004) assumed that the spatial gradient of fox prevalence they observed in a 865 km<sup>2</sup> Dutch area, ranging from 0 to 20 %, could be linked with the distance from the neighbouring endemic region. No explanatory factors linked to landscape or intermediate hosts were evoked in these studies. The spatial gradient we observed in the Ardennes varied in a far greater extent, from 20% in the Northern part of the study area, to more than 80% in the Southern part, which can be considered as a high endemic area. The question was to know which environmental factors could be the cause of this gradient.

This south of the study area corresponded to Aire and Meuse alluvial plains, where winter floods into adjacent grasslands are frequent. This situation may favour the survival of *E. multilocularis* eggs in the environment, as egg survival is known to be better in humid conditions (Veit et al., 1995). We therefore can assume that the spatial gradient of fox prevalence we observed could be partially linked to a spatial gradient of soil humidity, in accordance with the results of Staubach et al. (2001), Hansen et al. (2003) and Shaikenov et al. (2006).

Landscape surrounding infected foxes contained a higher proportion of grassland and a lower proportion of forest than landscape surrounding uninfected foxes, as observed by Staubach et al. (2001) and Martinek et al. (2001). Grasslands provide optimal habitat for *Microtus sp.* Indeed, we found a higher *Microtus sp.* density in the high endemic area (southern part) than in the low endemic area (northern part) of the study area. On another way, *A. terrestris* seems to play only a minor role in *E. multilocularis* transmission, with a surprising lower density in the highest endemic area, in contradiction with previous studies (Raoul, 2001).

These results originating from a local grain are in accordance with those from a regional grain, showing the importance of landscape favourable to high levels of intermediate hosts on transmission pattern (Ito et al., 2003; Giraudoux et al., 2002, 2006). However, although the

proportion of grassland in a given area emerges as a risk factor in studies on different spatial ranges, landscape parameters could not define precise prevalence levels, but provide a broader frame within which other parameters were likely to influence transmission as assumed by Romig et al. (2006).

When studying *E. multilocularis* transmission, one has to take into account the very high variability of the worm burden from one fox to another. Few information is available on this parameter because most of the studies used PCR, ELISA copro-tests, or IST (intestinal scrapping technique), which only allow to provide an infection status of the fox (positive or negative fox) or, at the best, to estimate categories of worm burden harboured by a fox (Deplazes et al., 2003; Craig et al., 2003). In proportion, few studies used the Sedimental Counting Technique which is less practical, time-consuming, but provides quantitative data which are more informative about environmental contamination.

On a regional grain, heterogeneity of worm burdens has already been observed (Hildreth et al., 2000; Raoul et al., 2001; Miterpaková et al., 2003; Sréter et al., 2004). Miterpaková et al. (2003) found, at the range of the Slovak Republic, that the highest mean worm burdens (determined by SCT) were recorded in regions with the highest prevalence rates, while Raoul et al. (2001) found no differences in the distribution of *E. multilocularis* worm burden in foxes (classified into three classes of worm burdens) between high and low endemicity areas in Franche-Comté, eastern France. A few studies described *E. multilocularis* worm burden in foxes at a local grain (Hofer et al., 2000; Fischer et al., 2005) but without providing data on its spatial heterogeneity. We did not observed a difference in worm burden of infected foxes from high to low endemic area but half of the worm biomass was present in only two municipalities, coming from foxes trapped in very restricted areas. Therefore, *E. multilocularis* biomass was highly aggregated in space within several square kilometers. Higher amounts of *E. multilocularis* eggs in the environment could probably increase the probability of egg ingestion by a higher number of intermediate hosts, leading to higher prevalences in fox population, at the condition that foxes with high burden effectively produce high numbers of eggs (Eckert et al., 2001).

Genotypes A and B were identified in foxes, and high worm burden were associated with both genotypes (Knapp et al., unpublished data). Furthermore, they were encountered across the entire study area, in the low and the high endemic areas. This results did not allow to conclude that a particular genotype could lead to a more efficient contamination. Further researches are thus needed to determine if the two genotypes have the same infectious potential and could contribute together to a higher level of *E. multilocularis* transmission.

Working on a local grain allowed us to detect endemic foci of several kilometers squares and therefore to study environmental factors linked to *E. multilocularis* transmission. In Western Europe, distance travelled by a fox for daily movements ranged from 4 to 12 km (reviews in Goszczyński, 2002) and from 1.5 to 35 km during dispersal (Voigt and Macdonald, 1984; Mulder, 1985), so the choice of the grain (some kilometres squares) and the extend of the study site (900 km<sup>2</sup>) seems to be well-adapted to the study of individual and populational red fox dynamics.

This study consisted of preliminary attempts to analyse environmental factors linked to *E. multilocularis* transmission on a local grain in southeastern Ardennes, a new endemic area of *E. multilocularis* distribution. Future analyses should include detailed landscape features, as hydrologic data around foxes, which can influence eggs survival. Studies of grassland and rodent gradients from North to South should allow to precise grassland impact on *E. multilocularis* transmission at this grain. However, understanding which environmental factors control the spatial distribution of *E. multilocularis* eggs and local processes of transmission requires to investigate the distributions of both fox faeces and intermediate hosts on a micro-local grain (1000 m<sup>2</sup>).

### **Acknowledgments**

Financial support for this study was provided by the French « Direction Régionale à la Recherche et à la Technologie », the « Conseil Régional Champagne-Ardennes », the « Communauté de Communes de l'Argonne Ardennaise » and the « Programme pluriformation Milieux Naturels – Milieux anthropisés ». We would like to thank the « Fédération départementale des Chasseurs des Ardennes », as well as local hunters and inhabitants for their help in fox collection.

### **References**

- Anderson, D.R., Link, W.A., Johnson, D.H., Burnham, K.P. (2001) Suggestions for presenting the results of data analyses. *J. Wildl. Manage.*, 65, 373-378.
- Bart, J.M., Breyer, I., Gottstein, B., Romig, T., Piarroux, R. (2003) Development of molecular tools to explore genetic diversity in *Echinococcus multilocularis*. *Helminthologia*, 40, 117-121.
- Bouyer, J. (1996) *Méthodes statistiques*. ESTEM, éditions INSERM, 351 pp.

- Burnham, K.P., Anderson, D.R. (2002) *Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach*. 2nd edition. Springer, 496 pp.
- Craig, P. (2003) *Echinococcus multilocularis*. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 16, 437-444.
- Delattre, P., Giraudoux, P., Damange, J.P., Quéré, J.P. (1990) Recherche d'un indicateur de la cinétique démographique des populations du campagnol des champs (*Microtus arvalis*). *Rev. Ecol. (Terre Vie)*, 45, 375-384.
- Delattre, P., de Sousa, B., Fichet-Calvet, E., Quéré, J.P., Giraudoux, P. (1999) Vole outbreaks in a landscape context: evidence from a six year study of *Microtus arvalis*. *Landscape Ecol.*, 14, 401-412.
- Deplazes, P., Dinkel, A., Mathis, A. (2003) Molecular tools for studies on the transmission biology of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology*, 127, S53-S61.
- Eckert, J., Deplazes, P. (2004) Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17, 107-135.
- Eckert, J., Rausch, R.L., Gemmell, M.A., Giraudoux, P., Kamiya, M., Liu, F.-J., Schantz, P.M., Romig, T. (2001) Epidemiology of *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus vogeli* and *Echinococcus oligarthus*. In: Eckert, J., Gemmell, M.A., Meslin, F.X., Pawloski, Z.S. (Eds), *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A public health problem of global concern*. OIE/WHO, Paris, pp.164-182.
- Eckert, J., Conraths, F.J., Tackmann, K. (2000) Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? *Int. J. Parasitol.*, 30, 1283-1294.
- Fichet-Calvet, E., Jomaa, I., Giraudoux, P., Ashford, W. (1999) Estimation of sand rat abundance by using surface indices. *Acta Theriol.*, 44, 353-362.
- Fischer, C., Reperant, L.A., Weber, J.M., Hegglin, D., Deplazes, P. (2005) *Echinococcus multilocularis* infections of rural, residential and urban foxes (*Vulpes vulpes*) in the canton of Geneva, Switzerland. *Parasite*, 12, 339-346.
- Gilot, B., Doche, B., Deblock, S., Petavy, A.F. (1988) Eléments pour la cartographie écologique de l'échinococcose alvéolaire dans le Massif central (France): essai de délimitation d'un foyer. *Can. J. Zool.*, 66, 696-702.
- Giraudoux, P., Craig, P.S., Delattre, P., Bao, G., Bartholomot, B., Harraga, S., Quéré, J.P., Raoul, F., Wang, Y., Shi, D., Vuitton, D.A. (2003) Interactions between landscape changes and host communities can regulate *Echinococcus multilocularis* transmission. *Parasitology*, 127, S1-S11..
- Giraudoux, P., Delattre, P., Takahashi, K., Raoul, F., Quéré, J.P., Craig, P., Vuitton, D. (2002) Transmission ecology of *Echinococcus multilocularis* in wildlife: what can be learned from comparative studies and multiscale approaches? In: Craig, P.S., Pawlowski, Z.S. (Eds.), *Cestode Zoonoses: Echinococcosis and Cysticercosis*. IOS Press, Amsterdam, pp.251-266.
- Giraudoux, P., Pleydell, D., Raoul, F., Quéré, J.-P., Wang, Q., Yang, Y., Vuitton, D.A., Qiu, J., Yang, W., Craig, P.S. (2006) Transmission ecology of *Echinococcus multilocularis*: what

are the ranges of parasite stability among various host communities in China? *Parasitology Int.*, 55, S237-S246.

Goszczyński, J. (2002) Home ranges in red fox: territoriality diminishes with increasing area. *Acta Theriol.*, 47, 103-114.

Hansen, F., Jeltsch, F., Tackman, K., Staubach, C., Thulke, H.H. (2004) Processes leading to a spatial aggregation of *Echinococcus multilocularis* in its natural intermediate host *Microtus arvalis*. *Int. J. Parasitol.*, 34, 37-44.

Hansen, F., Tackmann, K., Jeltsch, F., Wissel, C., Thulke, H.H. (2003) Controlling *Echinococcus multilocularis* - Ecological implications of field trials. *Prev. Vet. Med.*, 60, 91-105.

Hansson, L. (1979) Field signs as indicators of vole abundance. *J. Appl. Ecol.*, 16, 339-347.

Henry, C., Poulle, M.L., Roeder, J.-J. (2005) Effect of sex and female reproductive status on seasonal home range size and stability in rural red foxes (*Vulpes vulpes*). *Ecoscience*, 12, 2002-2009.

Hess, G.R., Randolph, S.E., Arneberg, P., Chemini, C., Furlanello, C., Harwood, J., Roberts, M.G., Swinton, J. (2002) Spatial aspects of disease dynamics. In: Hudson, P.J., Rizzoli, A., Grenfell, B.T., Heesterbeek, H., Dobson, A.P. (Eds.): *The ecology of wildlife diseases*. Oxford University Press, Oxford.

Hildreth, M.B., Sriram, S., Gottstein, B., Wilson, M., Schantz, P.M. (2000) Failure to identify alveolar echinococcosis in trappers from south Dakota in spite of high prevalence of *Echinococcus multilocularis* in wild canids. *J. Parasitol.*, 86, 75-77.

Hobbs, N.T. (2003) Challenges and opportunities in integrating ecological knowledges across scales. *Forest Ecol. Manage.*, 181, 223-238.

Hofer, S., Gloor, S., Muller, U., Mathis, A., Hegglin, D., Deplazes, P. (2000) High prevalence of *Echinococcus multilocularis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) and voles (*Arvicola terrestris*) in the city of Zürich, Switzerland. *Parasitology*, 120, 135-142.

Ito, A., Romig, T., Takahashi, K. (2003) Perspective on control options for *Echinococcus multilocularis* with particular reference to Japan. *Parasitology*, 127, 5159-5172.

Jenkins, D.J., Romig, T., Thompson, R.C.A. (2005) Emergence, re-emergence of *Echinococcus sp.* - a global update. *Int. J. Parasitol.*, 35, 1205-1219.

Martínek, K., Kolářová, L., Červený, J. (2001) *Echinococcus multilocularis* in carnivores from the Klatovy district of the Czech Republic. *J. Helminth.*, 75, 61-66.

Míterpaková, M., Dubinský, P., Reiterová, K., Machková, N., Várady, M., Šnábel, V. (2003) Spatial and temporal analysis of the *Echinococcus multilocularis* occurrence in the Slovak Republic. *Helminthologia*, 40, 217-226.

Mulder, J.L. (1985) Spatial organization, movements and dispersal in a Dutch red fox population. *Revue Ecol. (Terre et Vie)*, 40, 133-138.

Pesson, B., Carbiener, R. (1989) Ecologie de l'échinococcose alvéolaire en Alsace: le parasitisme du renard roux (*Vulpes vulpes* L.). *Bull. Ecol.*, 20, 295-301.

Quéré, J.P., Raoul, F., Giraudoux, P., Delattre, P. (2000) An index method of estimating relative population densities of the common vole (*Microtus arvalis*) at landscape scale. *Rev. Ecol. (Terre Vie)*, 55, 25-31.

Raoul, F. (2001) Écologie de la transmission d'*Echinococcus multilocularis* chez le renard dans l'Est de la France: dépendance au paysage et à la relation proie-prédateur? Thèse de l'université de Franche-Comté, 164 pp.

Raoul, F., Nonaka, N., Piarroux, R., Vuitton, D.A., Giraudoux, P. (2001) Assessment of the epidemiological status of *Echinococcus multilocularis* in foxes in France using ELISA coprotests on fox faeces collected in the field. *Int. J. Parasitol.*, 31, 1579-1588.

Rausch, R.L. (1995) Life-cycle patterns and geographic distribution of *Echinococcus* species. In: Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J. (Eds.), *Echinococcus and hydatid disease*. CAB International, Wallingford, pp.88-134.

Romig, T., Dinkel, A., MacKenstedt, U. (2006) The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol. Int.*, 55, S187-S191.

Romig, T., Thoma, D., Weible, A.K. (2006) *Echinococcus multilocularis* - a zoonosis of anthropogenic environments? *J. Helminth.*, 80, 207-212.

Romig, T., Bilger, B., Dinkel, A., Merli, M., MacKenstedt, U. (1999) *Echinococcus multilocularis* in animal hosts: a new data from western Europe. *Helminthologia*, 36, 185-191.

Schantz, P.M., Chai, J., Craig, P.S., Eckert, J., Jenkins, D.J., Macpherson, C.N.L., Thakur, A. (1995) Epidemiology and control of hydatid disease. In: Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J. (Eds.): *Echinococcus and hydatid disease*. CAB International, Wallingford, pp.233-330.

Shaikenov, B.S. (2006) Distribution and ecology of *Echinococcus multilocularis* in Central Asia. *Parasitol. Int.*, 55, S213 – S219.

Sréter, T., Széll, Z., Sréter-Lancz, Z., Varga, I. (2004) *Echinococcus multilocularis* in Hungary. *Emerg. Infect. Dis.*, 10, 1344-1346.

Staubach, C., Thulke, H.H., Tackmann, K., Hugh-Jones, M., Conraths, F.J. (2001) Geographic information system-aided analysis of factors associated with the spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* infections of foxes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65, 943-948.

Tackmann, K., Loschner, U., Mix, H., Staubach, C., Thulke, H.H., Conraths, F.J. (1998) Spatial distribution patterns of *Echinococcus multilocularis* (Leukart 1863) (Cestoda: Cyclophyllidae: Taeniidae) among red foxes in an endemic focus in Brandenburg, Germany. *Epidemiol. Infect.*, 120, 101-109.



Thompson, R.C.A. (1995) Biology and systematics of *Echinococcus*. In: Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J. (Eds.): *Echinococcus and hydatid disease*. CAB International, Wallingford, pp.1-50.

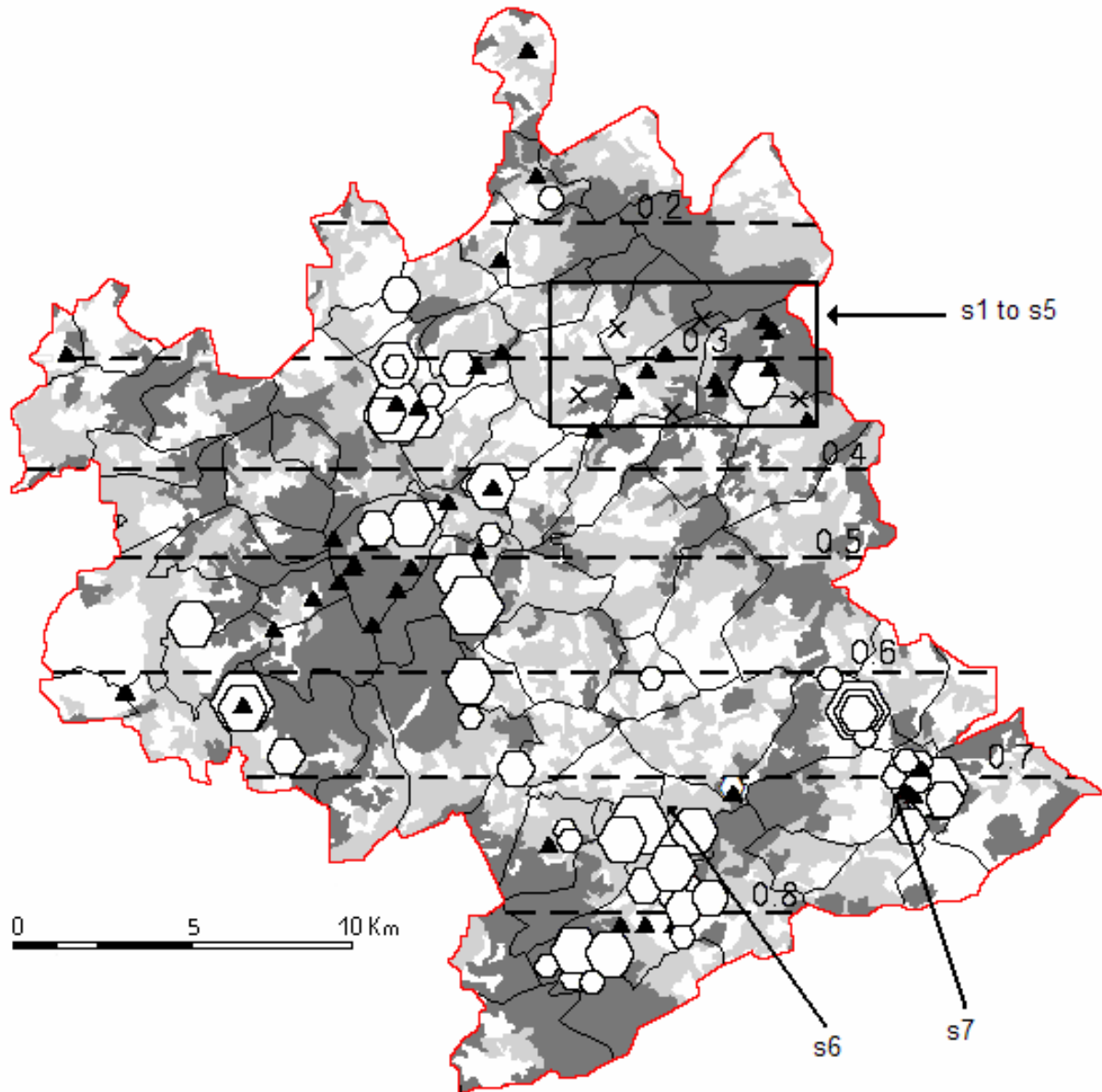
Van Der Giessen, J.B.W., Rombout, Y., Teunis, P. (2004) Base line prevalence and spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* in a newly recognized endemic area in the Netherlands. *Vet. Parasitol.*, 119, 27-35.

Veit, P., Bilger, B., Schad, V., Shafer, J., Frank, W., Lucius, R. (1995) Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasitology*, 110, 79-86.

Viel, J.F., Giraudoux, P., Abrial, V., Bresson-Hadni, S. (1999) Water vole (*Arvicola terrestris scherman*) density as risk factor for human alveolar echinococcosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61, 559-565.

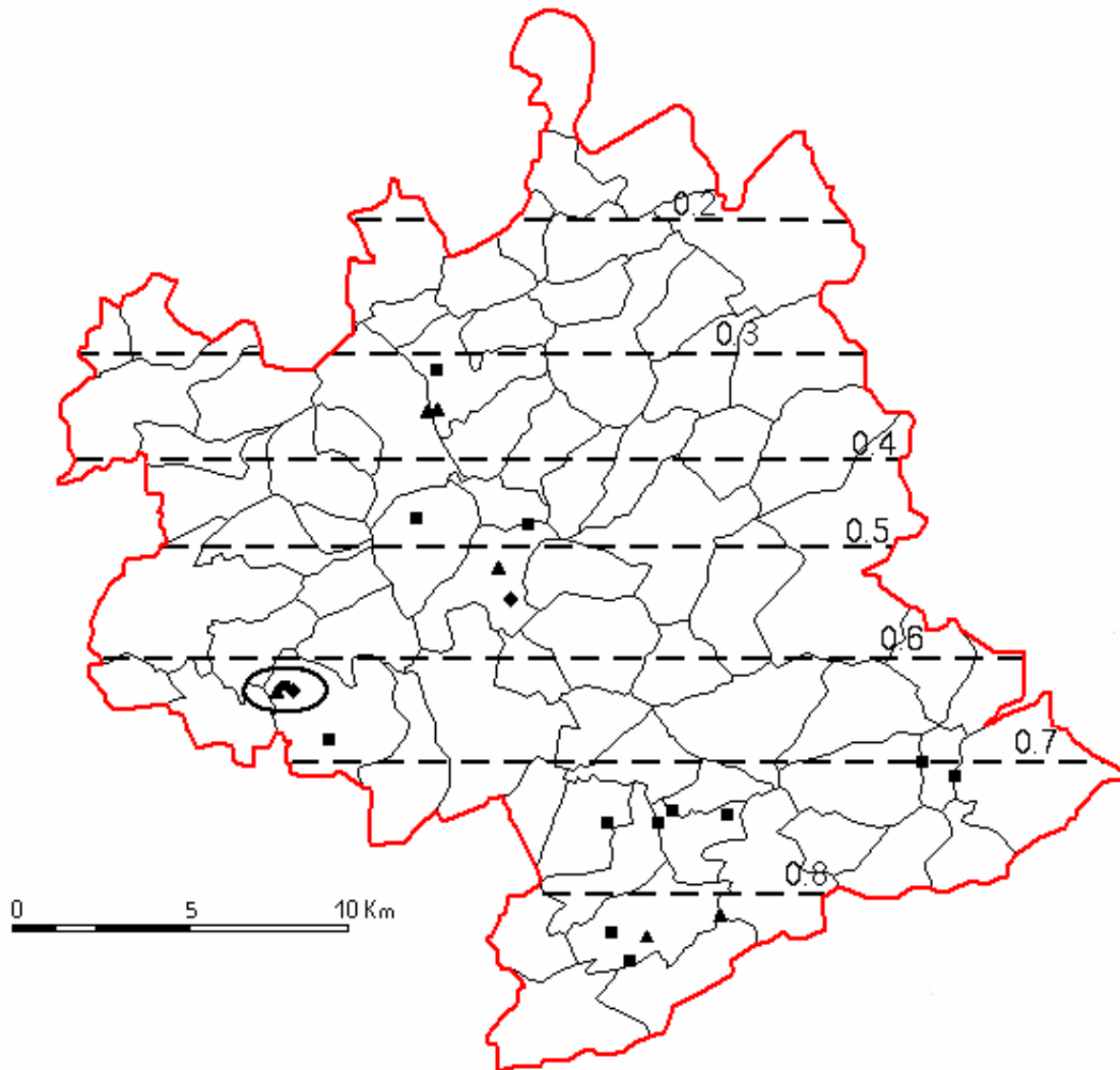
Voigt, D.R., Macdonald, D.W. (1984) Variation in the spatial and social behaviour of the red fox, *Vulpes vulpes*. *Acta Zool. Fennica*, 171, 261-265.

Vuitton, D.A., Zhou, H., Bresson-Hadni, S., Wang, Q., Piarroux, R., Raoul, F., Giraudoux, P. (2003) Epidemiology of alveolar echinococcosis with particular reference to China and Europe. *Parasitology*, 127, S87-S107.



**Figure 1.** Location of foxes infected (white hexagons) and uninfected (black triangles) with *Echinococcus multilocularis* on the French Ardennes study area and isopleths of predictive prevalence across the study site (hatched lines with values from 0 to 1).

White hexagons size is proportional to worm burden. Light grey: grassland; dark grey: forest; black lines: limits of municipalities; black crosses inside black square: location of rodent densities estimation areas s1 to s5.



**Figure 2.** Location of 25 foxes, each with 5 to 10 worm genotyped. Black diamonds: foxes harbouring worms with genotype A, n=2; black squares: foxes harbouring worms with genotype B, n=15; black triangles: foxes harbouring a mix of worms with genotype A and with genotype B, n=7; lines = isopleths of prevalence. Into the black circle: 1 fox harbouring worms sampled with genotype A, 5 foxes harbouring worms sampled with genotype B, 2 foxes harbouring a mix of worms sampled with genotype A and with genotype B (these 8 foxes were captured in the same trap).

**Table I.** Characteristics of the municipalities where foxes were tested for the presence of *Echinococcus multilocularis* (Em) in their intestines.

| Municipality number | Number of foxes tested for <i>Em</i> | Number of positive foxes | Prevalence (%) | Total worm burden | Minimum – maximum worm burden |
|---------------------|--------------------------------------|--------------------------|----------------|-------------------|-------------------------------|
| 1                   | 2                                    | 0                        | -              | 0                 | 0                             |
| 2                   | 2                                    | 1                        | -              | 2                 | 2                             |
| 3                   | 1                                    | 0                        | -              | 0                 | 0                             |
| 4                   | 1                                    | 1                        | -              | 170               | 170                           |
| 5                   | 1                                    | 0                        | -              | 0                 | 0                             |
| 6                   | 27                                   | 12                       | 44.4           | 26411             | 5 – 16510                     |
| 7                   | 4                                    | 0                        | -              | 0                 | 0                             |
| 8                   | 12                                   | 1                        | 8.3            | 4253              | 4253                          |
| 9                   | 1                                    | 0                        | -              | 0                 | 0                             |
| 10                  | 3                                    | 2                        | -              | 1675              | 208 - 1467                    |
| 11                  | 1                                    | 0                        | -              | 0                 | 0                             |
| 12                  | 1                                    | 1                        | -              | 9157              | 9157                          |
| 13                  | 4                                    | 0                        | -              | 0                 | 0                             |
| 14                  | 11                                   | 4                        | 33.3           | 2307              | 7 – 2066                      |
| 15                  | 6                                    | 4                        | -              | 37301             | 19 - 32520                    |
| 16                  | 1                                    | 0                        | -              | 0                 | 0                             |
| 17                  | 13                                   | 9                        | 69.2           | 92718             | 1 – 73380                     |
| 18                  | 2                                    | 2                        | -              | 608               | 23 - 585                      |
| 19                  | 1                                    | 1                        | -              | 3410              | 3410                          |
| 20                  | 1                                    | 1                        | -              | 160               | 160                           |
| 21                  | 2                                    | 1                        | -              | 2                 | 2                             |
| 22                  | 9                                    | 8                        | 88.9           | 14491             | 4 – 11126                     |
| 23                  | 10                                   | 6                        | 60             | 912               | 1 – 855                       |
| 24                  | 10                                   | 8                        | 80             | 47448             | 17 – 41688                    |
| 25                  | 4                                    | 3                        | -              | 1482              | 6 – 1430                      |
| 26                  | 8                                    | 6                        | 75             | 23740             | 5 – 18630                     |
| 27                  | 1                                    | 1                        | -              | 4                 | 4                             |
| 28                  | 10                                   | 7                        | 70             | 4019              | 5 – 1797                      |
| <b>Total</b>        | <b>149</b>                           | <b>79</b>                | <b>53.0</b>    | <b>270270</b>     | <b>1 – 73380</b>              |

**Table II.** Model comparisons for modeling the spatial distribution of *E. multilocularis* prevalence in foxes.

LL = maximum log-likelihood ; K = number of estimated parameters ; n/K = numbers of observations/K ; AICc = first order Akaike Index Criterion ;  $\Delta_i$  = difference between AICc and the lowest value of AICc;  $w_i$  = Akaike weights; X = longitude; Y = latitude.

| Models                         | LL      | K | n/K    | AICc          | $\Delta_i$ | $w_i$ |
|--------------------------------|---------|---|--------|---------------|------------|-------|
| 1                              | -102.25 | 1 | 148.00 | 206.52        | 20.47      | 0     |
| X                              | -101.43 | 2 | 74.00  | 206.95        | 20.90      | 0     |
| <b>Y</b>                       | -91.12  | 2 | 74.00  | <b>186.31</b> | 0.26       | 0.20  |
| X + Y                          | -91.10  | 3 | 49.33  | 188.36        | 2.31       | 0.07  |
| X*Y                            | -88.89  | 4 | 37.00  | 186.07        | 0.02       | 0.23  |
| X <sup>2</sup>                 | -101.43 | 2 | 74.00  | 206.93        | 20.88      | 0     |
| Y <sup>2</sup>                 | -91.12  | 2 | 74.00  | 186.31        | 0.26       | 0.20  |
| X <sup>2</sup> +Y <sup>2</sup> | -91.10  | 3 | 49.33  | 188.36        | 2.30       | 0.07  |
| X <sup>2</sup> *Y <sup>2</sup> | -88.89  | 4 | 37.00  | 186.05        | 0          | 0.23  |

**Table III.** Mean percentage ( $\pm$  sd) of forest and grassland in buffer zones of 600 m and 1000 m radius surrounding infected foxes (n = 42) and uninfected foxes (n = 39).

|               |                  | Grassland (%)   | Forest (%)      |
|---------------|------------------|-----------------|-----------------|
| 600 m radius  | Infected foxes   | 44.9 $\pm$ 21.9 | 21.2 $\pm$ 23.5 |
|               | Uninfected foxes | 29.6 $\pm$ 29.9 | 42.7 $\pm$ 35.7 |
| 1000 m radius | Infected foxes   | 42.8 $\pm$ 16.5 | 22.5 $\pm$ 19.4 |
|               | Uninfected foxes | 30.1 $\pm$ 23.5 | 44.7 $\pm$ 32.0 |

### **III.3. Conclusion de la deuxième partie**

L'étude de la transmission parasitaire à une étendue régionale et à grain local a permis de mettre en évidence une forte hétérogénéité de la prévalence globale, les prévalences pouvant dépasser 80% dans le sud du terrain d'étude. Les charges parasitaires sont elles aussi très hétérogènes et leur distribution spatiale révèle des zones de quelques kilomètres carrés où la contamination environnementale est vraisemblablement très importante. L'analyse de la composition du paysage entourant les renards semble confirmer l'influence de l'importance des milieux prairiaux et des densités de *Microtus arvalis* sur le fait qu'un renard soit infecté ou non par *E. multilocularis*.

Cependant, s'il est intéressant de déterminer les caractéristiques de l'environnement paysage apparemment propice à la transmission au niveau des individus hôtes définitifs, il est également important d'identifier plus précisément les milieux dans lesquels les hôtes intermédiaires ont le plus de risques d'être infecté du fait de leur abondance et de la présence de fèces de renards, potentiellement porteuses d'œufs du parasite. Ainsi, la suite de ce travail portera sur l'étude de l'ouverture du filtre de rencontre à une étendue locale et un grain micro-local.



## **IV. TROISIEME PARTIE**

**Approche à une étendue locale (90 km<sup>2</sup>) de la transmission d'*Echinococcus multilocularis* : étude des distribution des fèces de renards et des rongeurs hôtes intermédiaires, à un grain micro-local (1000 m<sup>2</sup>)**





#### **IV.1. Objectifs de la troisième partie**

A un grain micro-local, l'ouverture du filtre de rencontre, c'est-à-dire la rencontre entre parasite et hôte, dépend de la juxtaposition spatiale entre les œufs du parasite et le rongeur hôte intermédiaire. La localisation des œufs est étroitement associée au lieu de dépôt des fèces de renard. Même s'il n'est pas exclu que les insectes, les invertébrés ou l'eau soient impliqués dans la dissémination des œufs (Rausch, 1995; Bush et al., 2001), il est généralement admis que ceux-ci restent positionnés à l'endroit même du sol ou sur la végétation sur lesquels les fèces de renard ont été déposées. De plus, le lieu de dépôt va conditionner la conservation à plus ou moins long terme des propriétés infectieuses des œufs d'*E. multilocularis*, par l'intermédiaire de l'hygrométrie et des températures micro-locales (Veit et al., 1995; Hansen et al., 2003, 2004). Ces derniers paramètres varient avec les caractéristiques du milieu considéré. Par ailleurs, la présence et l'abondance des rongeurs hôtes intermédiaires varient en fonction du milieu et de ses propriétés en terme d'alimentation et de refuge (Spitz, 1977; Delatte et al., 1988; Butet et Leroux, 1994; Giraudoux et al., 1994 ; Butet et al., 2006). Aussi, il convient de caractériser la distribution des fèces de renard, celle des hôtes intermédiaires et les modalités de la juxtaposition spatiale précise (de l'ordre de quelques mètres) entre les deux, en prenant en considération les densités relatives de chacun dans différents types de milieu. Par des transects de collecte de fèces de renards et de recherche d'indices de rongeurs prairiaux, nous cherchons à répondre aux questions suivantes :

- Quelles sont les variables qui influencent la distribution des fèces de renards ?
- La distribution des hôtes intermédiaires coïncide-t-elle avec celles des fèces de renards?
- Peut-on caractériser des milieux « à risque » où la transmission parasitaire s'effectuerait de façon intense ?

Cette analyse a fait l'objet d'une publication (**article 4**) intitulée :

Guislain, M.-H.; Raoul, F., Poulle, M.-L., Knapp, J., Giraudoux, P. Fox faeces and vole distribution: a local range approach to *Echinococcus multilocularis* transmission.



**IV.2. Article 4**

**FOX FAECES AND VOLE DISTRIBUTION ON A LOCAL RANGE IN NORTH-EASTERN  
FRANCE: ECOLOGICAL DATA IN A PARASITOLOGICAL PERSPECTIVE FOR  
*ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS***

Guislain Marie-Hélène <sup>1)2)</sup>; Raoul Francis <sup>1)</sup>; Poulle Marie-Lazarine <sup>2)3)</sup> & Giraudoux Patrick<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Environmental Biology, EA 3184-usc INRA, University of Franche-Comté, 1 place Leclerc, 25030 Besançon, France

<sup>2)</sup> 2C2A-CERFE, rue de la Héronnière, 08240 Boult-aux-Bois, France

<sup>3)</sup> Laboratory of Parasitology-Mycology, EA 3800, UFR Médecine, IFR 53, University of Reims Champagne Ardennes, Reims, France

**Abstract**

The completion of the life cycle of *Echinococcus multilocularis* can only be achieved with an spatial overlap between intermediate host species and definitive host faeces, these last being an essential vehicle for the spreading of infective parasite eggs. We conducted a preliminary study in north eastern France to investigate factors influencing the importance of this overlap on a local range. The density of the red fox (*Vulpes Vulpes*, main definitive host) was estimated using the Line Transect method and no variation over time could be found. Kilometric transects were walked during winter in five sites and eight habitats to collect fox faeces and to estimate the relative densities of *Microtus arvalis* and *Arvicola terrestris* voles (main intermediate hosts) through surface indices. We used a model comparison approach to test the importance of sites, years, seasons, habitats and climatic factors on the distribution of the 145 collected fox faeces. Habitat and climatic conditions were the strongest predictors of the number of faeces collected, while vole densities had no predictive. Densities of both *Microtus sp.* and fox faeces were higher in medium-height vegetation edge. The consequences of such results to understand local transmission processes and human exposure are discussed.

**Key-words:** *Echinococcus multilocularis*, *Microtus*, *Arvicola terrestris*, *Vulpes vulpes*, faeces, transmission, local range, habitat.

**Introduction**

Ecological data on the ecology and spatial distribution of wildlife species involved in parasitic transmission are essential from an epidemiological point of view, since modifications in the population dynamics and in the spatio-temporal overlap of species range might modulate zoonotic risk (Patz et al., 2004). Mechanisms leading to sustainable transmission in a parasite-host system are formalized by the concept of “meeting and compatibility filters” (Euzet and Combes, 1980; Holmes, 1986; Combes, 2001). The compatibility filter is modulated by immunological and biochemical processes involved in host and parasite recognition and defence mechanisms. The meeting filter is dependent on ecological processes, which are related to survival conditions of parasitic free-stages and to population dynamics and behaviour of the parasite host species.

Main cestode parasites responsible for zoonosis, such as tenias, need an obligate two-host cycle, comprising an herbivorous intermediate host and a carnivorous definitive host. The adult cestode is present in the definitive host intestine, where it produces eggs that are excreted in the environment via faeces. When ingested by a physiologically receptive intermediate host, eggs develop into larvae. The cestode development cycle is completed when the intermediate host is predated by a definitive host, allowing the larvae to become adults. Several factors come up to regulate a more or less important opening of the meeting filter between intermediate and definitive host, at various spatial and temporal ranges, such as densities of each host species, spatial proximity between the different hosts and environmental conditions around eggs (Combes, 2001).

Human alveolar echinococcosis, caused by infection by the larval stage of the cestode tapeworm *Echinococcus multilocularis*, is widespread in the Northern Hemisphere (Eckert et al., 2001) and can cause human death if diagnosed at a late stage. In Europe, 455 human cases have been recorded from 1981 to 2000 (Kern et al., 2003). In Western Europe, *E. multilocularis* definitive hosts are typically canids (mainly of the genus *Vulpes* and *Canis*) and felids, while intermediate hosts are rodents of the *Arvicolinae* sub-family (Thompson and McManus, 2001). Combinations of definitive and intermediate hosts vary according to the geographical location of the parasite.

In Europe, red fox (*Vulpes vulpes*) and grassland rodents (*Microtus arvalis* and *Arvicola terrestris*) are the main definitive and intermediate hosts respectively. Average prevalence in small mammals intermediate hosts on a regional range is very low (about 0.1%), but microfoci have been found in eastern France, with *E. multilocularis* prevalence rates locally exceeding 10% within a few 100 m<sup>2</sup> (Delattre et al., 1988, 1990b; Giraudoux et al., 2002). Moreover, in Switzerland, prevalence in rodent can reach 10-39% in *Arvicolidae* (Gottstein et

al., 1996, 2001; Hofer et al., 2000). Comparative studies in Europe have shown that *E. multilocularis* prevalence in foxes was dependent on landscape composition. Indeed, higher prevalence was recorded in landscapes favouring intermediate hosts population outbreaks (Pesson and Carbiener, 1989; Raoul et al., 2001b; Staubach et al., 2001; Giraudoux et al., 2003).

Little is known about transmission processes occurring on a local range (some square kilometres). Though transportation of *E. multilocularis* eggs by flies has been mentioned once in the literature (Rausch, 1995), one generally considers that the probability that a small mammal ingest a viable egg will partly depend upon the densities of eggs and of small mammal populations and upon the spatial overlap between them. As the Arvicolids and Microtine home range hardly exceeds 500 square meters (Spitz, 1977; Airoldi, 1978), *E. multilocularis* eggs have to be deposited via fox faeces within this range. Thus, the spatial proximity between intermediate hosts and definitive hosts faeces might be an important parameter controlling the meeting filter. This is likely to be a function of fox defecating behaviour, as well as of fox and grassland rodent densities. At this range, rodent distribution among habitats has been described as very heterogeneous (Delattre et al., 1988; Butet and Leroux, 1994, Giraudoux et al., 1994; Butet et al., 2006), and only one study indicated a heterogeneous distribution of fox faeces (Giraudoux et al., 2002). Furthermore, no data is available on the relationship between rodents and fox faeces distribution, despite its obvious interest in assessing the spatial variability of transmission.

Our objectives were to explore predictive factors of the spatial distribution of *E. multilocularis* intermediate hosts (*A. terrestris* and *M. arvalis*) and of faeces of *E. multilocularis* definitive host (red fox) on a very local range. We focused on ecological factors such as season, rainfall, temperature, habitat and rodent densities as potential predictive factors. This study is a first step in understanding the processes of parasite transmission on a local scale.

## **Materials and methods**

### *Study area*

The study was conducted from March 2004 to October 2005 in a 90-km<sup>2</sup> rural area in the Ardennes, north-eastern France (N 49°28'57''; E 4°59'28''). The first human case of alveolar echinococcosis was diagnosed in 1984 in this region (Depaquit et al., 1998), which is located at the western limit of the *E. multilocularis* European distribution (Giraudoux et al., 2001).

Altitude ranges between 200 and 300 meters above sea level. The climate is continental with average temperatures lower than 6°C during five months of the year and regular precipitations all year long (60 mm per month on the average). The study area includes arable land (28%), grassland (32%), and forest (35%). The human population density is very low (8 inhabitants / km<sup>2</sup>) and distributed in very small discrete villages. Foxes are trapped and hunted the whole year round.

#### *Fox density estimation*

Minimum fox density was estimated by distance-sampling method, as described by Ruelle et al. (2003). Ten spotlight counts were carried out yearly, from 2003 to 2006, during January and February, after fox dispersion and before its breeding season. A spotlight count consisted of a course of ten 1 km-long sections. Surveys were carried out between 21:00 and 01:00 hours, except in case of heavy rain or fog. One driver and two observers were present for each count. The car speed was 10-15 km/h and observers screened each side of the road with hand-held spotlights. For each observed fox, the perpendicular distance between the initial position of the fox (at first sight) and the road was measured using a laser telemeter. The densities of foxes were estimated from sighting data using the software DISTANCE 4.2 (Laake et al., 1993). Densities were estimated modelling their detection function,  $g(x)$ , which is the probability in detecting a red fox that it is at distance  $x$  from the road. The analysis consisted of fitting the best model, grouping distance data (perpendicular distances between first sight of fox and the vehicle) into 60-m intervals and comparing different models. Akaike's Information Criterion (AIC) was used to select the most appropriate model.

Densities were estimated according to the general equation  $\hat{D} = \frac{n}{2 \cdot L \cdot ESW}$  (Buckland et al., 1993) where  $n$  is the number of sightings;  $L$  the total transect length and  $ESW$  the effective strip width. The estimate of  $ESW$  was calculated from the estimated detection function obtained from models. A Chi-squared test was used to compare fox densities between years (Sauer and Williams, 1989; Ruelle et al., 2003).

#### *Estimation of voles and fox faeces abundance*

We estimated relative vole densities (= abundance index) by an index method (Delattre et al., 1999; Quéré et al., 2000) usually employed for the large range estimation of small mammal relative density (Hansson, 1979; Delattre et al., 1999; Fichet-Calvet et al., 1999; Quéré et al., 2000). It is based on walked transects consisting of a succession of ten pace intervals, each of

them measuring approximately 10 meters long. A band of two meters width was screened on each side of transects, to detect vole presence indices. Such methods have been calibrated against density estimates based on trapping (Delattre et al., 1990a; Quéré et al., 2000; Giraudoux et al., 1995). We concentrated on *A. terrestris* and *M. arvalis* because they are the main intermediate hosts of *E. multilocularis* in France (Rausch, 1995). *M. arvalis* is sympatric with *Microtus agrestis* in our study area, the latter at much lower density. Since both species can share the same habitat and cannot be distinguished by their presence indices, they were referred to as *Microtus sp.* We detected the presence of *Microtus sp.* through runways in vegetation and burrow entries, in association with fresh faeces and/or evidence of recent vegetation consumption (Delattre et al., 1990a) and the presence of *A. terrestris* through earth tumuli features (Giraudoux et al., 1995). Each 10 paces interval walked was considered “positive” or “negative” relative to the presence or the absence of *A. terrestris* and *Microtus sp.*

Furthermore, all carnivore faeces found on transects and identified as fox faeces on the basis of their odour and shape were collected and individually identified. Their geographical coordinates (Universal Transverse Mercator coordinate system) were recorded using Global Positioning system (GPS), as well as the habitat and the type of environmental features around them.

Walked transects were performed in five study sites, distant from each other by a minimum of 1.5 km and a maximum of 3.25 km. At each site, transects were walked in eight different habitats: forest, arable land, pasture (presence of livestock for more than one month per year), meadow (presence of livestock for less than one month per year), lower-height vegetation edge (same height as neighbouring plots), medium-height vegetation edge (vegetation height from 0.5 meters to 2 meters), hedge (vegetation of more than 2 meters height, trees) and road and stream bank. Intervals walked in any other habitat than these eight ones were removed from the analyses (0.3% of the walked intervals). Since the visibility of fox faeces and burrow systems of rodents is dependent on the vegetation type and height, transects were walked from October to March, when the vegetation was at its lowest. From 2004 to 2005, transects were walked during winter months, before and after *Arvicola* and *Microtus* reproduction. Furthermore, an additional session was carried out in December 2004 to collect information about fox faeces distribution at the beginning of the fox mating period, which occurs between December and February (Cavallini et Santini, 1996). The chi-square goodness-of-fit test (Siegel and Castellan, 1988) was used to detect annual variations in the faeces Kilometric Abundance Index (KAI) by assessing the degree of correspondence between the observed and



expected numbers of faeces found by winter. The expected numbers of faeces found were calculated under the hypothesis that the number of faeces found during a given period is only dependent on the distance walked during this period. The 2003-2004 winter corresponds to the March 2004's transects; the 2004-2005 winter corresponds to the October 2004, December 2004 and March 2005's transects; the 2005-2006 winter corresponds to the October 2005's transect.

### *Statistical modelling*

Contiguous transect intervals walked during a given sampling period at a given site and in a given habitat were pooled, and constituted a sampling unit. Generalized Linear Models (GLM) were used to test factors associated with: (i) the number of intervals positive for *Microtus sp.* ("MICROTUS" response variable), (ii) the number of intervals positive for *A. terrestris* ("ARVICOLA" response variable) and, (iii) the number of fox faeces found ("FAECES" response variable). Models were computed using both Poisson link and negative binomial link functions, under the respective hypotheses of a random distribution and of an over-dispersion of rodents and faeces in habitats. Models were compared using the information theoretic method outlined by Burnham and Anderson (2002), and presented according to Anderson et al. (2001). "INTERVALS" (number of intervals walked) was in first position in all models. We explored potential explanatory factors, which were thought to be relevant with regard to our study objectives: site, climate (rain and temperature), month, year, habitat, and densities of grassland rodents.

Modelling the relative densities of MICROTUS and ARVICOLA, we first considered the effect of adding "SITE" (the study site where intervals were walked), as vole density can vary within a distance of a few kilometres (Delattre et al., 1999; Giraudoux et al., 1997). Then, we successively explored the effects of "RAIN" (cumulative rainfall during the month preceding transects), "TEMPERATURE" (mean temperature during the month preceding transect), "MONTH" (the month transect was walked: March, October or December) and "YEAR" (the year transect was walked: 2004 or 2005). Indeed, important rainfall is assumed to damage vole's runways, and favours their dispersion (Saucy and Schneiter, 1997). Temperature can influence reproduction and mortality. The densities of *Microtus sp.* and *A. terrestris* might vary from March to October, due to reproduction cycle. Furthermore, vole densities vary from one year to another for both *Microtus sp.* (Delattre et al., 1999) and *A. terrestris* (Giraudoux et al., 1997). Because several studies have shown that densities of both *Microtus sp.* and *A. terrestris* varied according to habitat (Delattre et al., 1988; Butet and Leroux, 1994;

Giraudoux et al., 1994; Raoul et al., 2001a; Butet et al., 2006), our prior hypothesis concerning vole abundance considered that “HABITAT” (the type of habitat where the intervals were walked) was the most potential explanatory variable. So, this variable was placed at the end of the models, in order to check its effect, the other variables being controlled. We also explored the effect of ARVICOLA (after HABITAT) when modelling MICROTUS, and the effect of MICROTUS after HABITAT when modelling ARVICOLA, in order to assess a potential covariance between species (Giraudoux et al., 1994; Raoul et al., 2001a).

Modelling relative FAECES densities, we first considered the effect of adding “SITE” to assess heterogeneity in the spatial distribution at the range of the whole study area. Then, we checked the effect of MONTH, assuming that the fox faeces decomposition rate could differ from one season to another, as demonstrated for herbivores faeces (Nchanji and Plumptre, 2001; Hemami and Dolman, 2005). We also explored the effects of RAIN and TEMPERATURE because Cavallini (1994) reported that faeces life-span depended on rainfall over a period of twenty days before scats collection, and the effect of HABITAT, as it might influence *E. multilocularis* egg preservation or fox defecation behaviour. Our prior hypothesis concerning relative fox faeces density was that it depended on relative vole density. So we investigated the effects of MICROTUS and ARVICOLA on FAECES, after taking the effect of HABITAT into account, as we assumed the latter had a marked effect on relative vole densities. Since fox density estimation was undertaken in winter only, this variable has not been included as a predictive variable of fox faeces density. Analyses were realised using the R 2.2.1. (R Development Core Team, 2005) and the pgirmess 1.2.5. package for model selection (Giraudoux, 2006a)

## Results

A total number of 19,479 intervals were walked, from which 1,393; 243 and 139 were positive for *Microtus sp.*, *A. terrestris* and fox faeces respectively (Table 1). From 669 to 834 intervals were walked by site and by session, and an average of  $487 \pm 45$  intervals were walked by habitat and by session. “Forest” was not sampled at site 5 because this habitat was absent there. “Meadow” was rare at sites 2 and 5; from 29 to 43 and from 57 to 108 intervals were walked by session in these two sites respectively.

A total of 145 red fox faeces were collected (135 intervals with only one fox drop, three intervals with two faeces and one interval with four faeces), among which 126 (87%) were in edges (46 being collected in medium-height vegetation edges). Ninety percent of the 145

faeces were found on non-conspicuous supports, such as earth, grass or moss. Only 14 faeces were found on more visible supports: cow dung (2 faeces), stone (2 faeces), scratched earth (2 faeces) and mole hill (8 faeces). While the sampling effort remained relatively constant from one session to another, climate parameters varied, and the number of faeces collected by session decreased (Table 1).

#### *Fox density and fox faeces density*

The estimates of red fox densities varied from 3 foxes per km<sup>2</sup> in winters of 2003-2004 and of 2004-2005, to 4 foxes per km<sup>2</sup> in the winter of 2005-2006, however, fox densities did not vary significantly between winters ( $\chi^2 = 2.34$ ,  $ddl = 2$ ,  $p = 0.31$ ). In contrast, the number of faeces found significantly varied between winters ( $Chi^2 = 47.38$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0.001$ ). Faeces KAI were of 1.51 faeces/km in winter of 2003-2004 (39 km walked), 0.65 faeces/km in winter of 2004-2005 (115.7 km walked) and 0.23 faeces/km in winter of 2005-2006 (38.7 km walked).

#### *Determinants of *Microtus sp.*, *A. terrestris* and fox faeces abundance*

Modelling was based on a total of 919 sampling units. Fox faeces, *M. arvalis* and *A. terrestris* were present in 109, 432 and 91 units respectively. Table 2 shows the combination of variables that were examined for each response variable, the loglikelihood and Akaike Information Criteria being those of the negative binomial error. Those for the Poisson error are not presented here. Indeed, differences of AIC or corrected AIC (AICc, if the number of observation is lesser than 40 times the number of explanatory variables) values between the best negative binomial model and the best Poisson model for the “MICROTUS”, “ARVICOLA” and “FAECES” response variables were of -770.8 (AICc), - 217.5 (AICc) and -18.9 (AIC) respectively, which clearly favoured the choice of negative binomials models exclusively. This indicates that response variables were not randomly distributed but typically over-dispersed, as suggested by the dispersion parameter  $\theta$  ( $\pm$  standard deviation) considering the best models:  $\theta = 0.64 \pm 0.06$  for MICROTUS;  $\theta = 0.20 \pm 0.04$  for ARVICOLA;  $\theta = 0.76 \pm 0.24$  for FAECES.

The relative abundance of *Microtus sp.* was best explained by the effects of month and mean rainfall during the preceding month, and an interaction term between month and habitat (Table 2a). The relative abundance of *A. terrestris* was best explained by the effects of site, month and habitat and an interaction term between month and habitat (Table 2b). The relative abundance of fox faeces (Table 2c) was best explained by the effects of site, month, rain and habitat.

### *Distribution of Microtus sp., A. terrestris and fox faeces among habitats*

Figure 1 shows the fitted values of each model selected. Higher relative *Microtus sp.* densities were generally observed in meadows, banks and medium-height vegetation edges, whatever the month, while lower relative densities were predicted in hedges, on arable land and in forests (Fig. 1a). Higher relative densities of *A. terrestris* were observed in meadows. Very low relative densities of this species were observed in banks, on arable land and in forests (Fig. 1b). The highest faeces KAI were observed in low and medium-height vegetation hedges, while intermediate levels were found in edges and banks. The lowest KAI were in pastures, meadows, forests and on arable land (Fig. 1c). On the whole, faeces KAI were higher in edges and lower in plots.

### **Discussion**

Most studies dealing with the ecology of *E. multilocularis* transmission have been conducted from continental to regional areas (Eckert and Deplazes, 2004; Giraudoux et al., 2006b; Romig et al., 2006; for reviews). In contrast, only one study (Giraudoux et al., 2002) simultaneously addressed fox faeces and *E. multilocularis* intermediate host distributions on a very local range. Results presented here are therefore an original attempt to link fox faeces and rodent distributions taking into account ecological considerations, and a preliminary step to incorporate these data in a parasitological context.

The better fit of models using the negative binomial models indicated that fox faeces and intermediate hosts were typically over-dispersed. To our knowledge, this is the first field evidence of the spatial clustering of both intermediate hosts and potentially contaminative material on a local range and on a fine grain. This may help to better understand processes leading to the spatial aggregative patterns of prevalence observed in definitive and intermediate *E. multilocularis* hosts (Raoul et al., 2001b; Staubach et al., 2001; Giraudoux et al., 2002; Hansen et al., 2004; Van der Giessen et al., 2004).

### *Variations in intermediate hosts densities*

The abundance index of *Microtus sp.* did not exceed 11 % over the study period, which is far from 80 % recorded in the Jura mountains during population outbreaks in landscapes dominated by grassland (Giraudoux et al., 1997; Delattre et al., 1999). In the same way, the relative densities of *A. terrestris* were of a few percents. Thus, in our study area almost equally composed of arable land, grassland, and forests, both *Microtus sp.* and *A. terrestris*

densities appeared to be much lower than in landscapes dominated by grassland. In accordance with most studies on vole population dynamics, the relative abundance of these two species appeared to be seasonal, which is reflected by the variable MONTH in model. Seasonal densities in small rodents are classically linked to reproduction, mortality, movements, etc. Controlling for seasons, our study showed higher relative densities of *Microtus sp.* in meadows and in banks and medium-height vegetation edges and lowest relative densities in forests and on arable land. Those variations among habitats are in accordance with the high level of heterogeneity of *Microtus sp.* within the habitats already described (Butet and Leroux, 1994; Giraudoux et al., 1994; Delattre et al., 1996; Butet et al., 2006).

#### *Variations in fox faeces density*

Density of faeces varied according to months, which could be expected to be linked to seasonal fluctuations in fox population. Assuming this, we should find a minimum number of faeces in March, when population is at its lowest level. Our data do not support this hypothesis. They are in accordance with Cavallini (1994), who noticed that the faeces index was not related to the seasonal fluctuations in fox numbers, as it neither increased following spring reproduction, nor decreased during the fox hunting season. Cavallini (1994) rather suggests that the number of faeces found in the field is linked to faeces persistence time. This can vary according to season for elephant (Nchanji and Plumtre, 2001) and to season, habitat and climatic conditions for cervids (Hemami and Dolman, 2005). Furthermore, William and Warren (2004) indicated that the action of invertebrates can diminish persistence time of sheep faeces. A few studies also showed a decrease in carnivore faeces persistence time in relation with removal by small mammals (Sanchez et al., 2004) or with rainfall (Cavallini, 1994). The number of faeces we found was significantly related to rainfall: the number of faeces decreased by a factor six during the study period with a concomitant increase of rainfall. This supports the hypothesis that increased rainfall may have decreased faeces persistence time.

In accordance with Goszczynski (1990), we observed that the majority of faeces were simply left on non-conspicuous supports. This supports the results of Asa et al. (1985), Asa (1993) and Gese and Ruff (1997) arguing that canids use mainly urine instead of faeces for scent-marking. Our results showed the heterogeneity of fox faeces distribution among sites and among habitats. This suggests a complex pattern of spatial fox faeces distribution in the whole study area and among habitats within sites. To our knowledge, there is a lack of studies on

faeces distribution according to habitats at a fine grain. Webbon et al. (2004) recorded no differences in the number of fox faeces found among sites classified as arable, pastoral or mixed. Giraudoux et al. (2002) compared fox faeces densities among habitats on a smaller spatial range. They sought for faeces in ploughed field borders, road verges and other habitats (mainly grasslands) and found a significantly higher density of fox faeces both on the borders of ploughed fields and on road verges. Our results come to confirm those results since the highest densities of faeces were in edge habitats. No significant linear correlation between fox faeces and small mammal densities was found. A potential confounding effect of the variable habitat can be suspected.

#### *Habitats and parasite transmission*

*Echinococcus multilocularis* was detected in 6 faeces only (ELISA copro-test confirmed by PCR and DNA sequencing, 5 of them in edges, data not shown), precluding any attempt of modeling parasite data straightforwardly. However, assuming that parasite distribution is a function of faeces density, the observed variations in the relative abundance of both faeces and voles between habitats suggested different levels of parasite transmission from contaminated faeces to rodents, depending on the micro-habitats (Fig. 2). In habitats such as arable land and forest, since both relative abundances of fox faeces and rodents were low, the transmission of *E. multilocularis* eggs from contaminated faeces to the intermediate host was unlikely to occur. In contrast, in habitats such as medium-height vegetation edge and bank, both high fox faeces and intermediate host densities were recorded. This suggests a higher opening degree of the meeting screen in this habitat, e.g a higher estimated meeting risk. Between these two situations, in the other habitats density of fox faeces could vary differently from those of voles, each density acting positively or negatively on the estimated meeting risk, which may result in intermediate levels of transmission intensity, i.e. in hedge. Because it is known that elevated temperature and desiccation can effectively reduce eggs infectivity (Veit et al., 1995), microclimate factors linked with habitat should be taken into account (Hanssen et al., 2004). On the one hand, high vegetation in medium-height vegetation edges and hedges may dampen the effects of hot temperatures and desiccation in summer, allowing a better egg survival. On the other hand, mechanical actions (ploughing, grazing, etc.) in plots could offer good conditions for eggs preservation by burying them in the soil (Delattre et al., 1988, 1990b). Medium-height vegetation edges may therefore be a key habitat for *E. multilocularis* transmission because both intermediate hosts and faeces of definitive hosts are present in high density, possibly in association with more favourable conditions for egg

preservation. However, the effect of micro-local environmental conditions linked to habitat on egg preservation still needs to be addressed for proper estimation of transmission risks. Finally, human exposure may additionally depend on local habits (e.g. dandelions and mushrooms are by far more collected in grassland than in edges).

In conclusion, this preliminary study shows that, at a fine grain of some square meters, environmental conditions may change greatly regarding relative intermediate host and faeces densities and habitat conditions that may affect egg survival. Those aspects should then (i) pave the road to studies targeted toward transmission processes on a local range, and (ii) be better quantified in various landscapes in order to understand which focal habitats may present a greater risk for transmission and may be a possible target for prevention control.

### **Acknowledgements**

Financial and logistic support for this study was provided by the French « Direction Régionale à la Recherche et à la Technologie », the « Conseil Régional Champagne-Ardenne », the « Communauté de Communes de l'Argonne Ardennaise » and the « Programme pluriformation Milieux Naturels – Milieux anthropisés », University of Franche-Comté.

### **References**

- Airolidi, J.P. (1978) Etude par capture et recapture d'une population de Campagnols terrestres *Arvicola terrestris scherman* Shaw. *Rev. Ecol. (Terre Vie)*, 32, 3-45.
- Anderson, D.R., Link, W.A., Johnson, D.H., Burnham, K.P. (2001) Suggestions for presenting the results of data analyses. *J. Wildl. Manage.*, 65, 373-378.
- Asa, C.S., Peterson, E.K., Seal, U.S., Mech, L.D. (1985) Deposition of anal-sac secretions by captive wolves (*Canis lupus*). *J. Mamm.*, 66, 89-93.
- Asa, C.S. (1993) Relative contributions of urine and anal-sac secretions in scent marks of large felids. *Amer. Zool.*, 33, 167-172.
- Buckland, S.T., Anderson, D.R., Burnham, K.P., Laake, J.L. (1993) *Distance sampling. Estimating Abundance of Biological Populations*. Chapman & Hall, London, UK.
- Burnham, K.P., Anderson, D.R. (2002) *Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach*. Springer Editions, 496 pp.
- Butet, A., Leroux, A. (1994) Spatial and temporal density fluctuations in common vole

populations in a marsh in western France. *Pol. Ecol. Stud.*, 20, 137-146.

Butet, A., Paillat, G., Delettre, Y. (2006) Factors driving small rodents assemblages from field boundaries in agricultural landscapes of western France. *Landscape Ecol.*, 21, 449-461.

Cavallini, P. (1994) Faeces count as an index of fox abundance. *Acta Theriol.*, 39, 417-424.

Cavallini, P., Santini, S. (1996) Reproduction of the red fox *Vulpes vulpes* in Central Italy. *Ann. Zool. Fenn.*, 33, 267-274.

Combes, C. (2001) *Les associations du vivant. L'art d'être parasite*. Flammarion, Paris.

Delattre, P., Pascal, M., Le Pesteur, M.H., Giraudoux, P., Damange, J.P. (1988) Caractéristiques écologiques et épidémiologiques de l'*Echinococcus multilocularis* au cours d'un cycle complet des populations d'un hôte intermédiaire (*Microtus arvalis*). *Can. J. Zool.* 66, 2740-2750.

Delattre, P., Giraudoux, P., Damange, J.P., Quéré, J.P. (1990a) Recherche d'un indicateur de la cinétique démographique des populations du campagnol des champs (*Microtus arvalis*). *Rev. Ecol. (Terre Vie)*, 45, 375-384.

Delattre, P., Giraudoux, P., Quéré, J.P. (1990b) Conséquence épidémiologique de la réceptivité d'un nouvel HI du ténia multiloculaire (*Em*) et de la localisation spatiotemporelle des rongeurs infestés. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 310, 339-344.

Delattre, P., Giraudoux, P., Baudry, J., Quéré, J.P., Fichet, E. (1996) Effect of landscape structure on Common Vole (*Microtus arvalis*) distribution and abundance at several space scales. *Landscape Ecol.*, 11, 279-288.

Delattre, P., de Sousa, B., Fichet-Calvet, E., Quéré, J.P., Giraudoux, P. (1999) Vole outbreaks in a landscape context: evidence from a six years study of *Microtus arvalis*. *Landscape Ecol.*, 14, 401-412.

Depaquit, J., Gallego, A., Usseglio, F., Liance, M., Favriel, J.M. (1998) L'échinococcose alvéolaire dans le département français des Ardennes: cas isolés ou nouveau foyer? *Parasite*, 5, 285-287.

Eckert, J., Rausch, R.L., Gemmell, M.A., Giraudoux, P., Kamiya, M., Liu, F.J., Schantz, P.M., Romig, T. (2001) Epidemiology of *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus vogeli* and *Echinococcus oligarthus*. In: Eckert, J., Gemmell, M.A., Meslin, F.X., Pawlowski, Z.S. (eds) *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A public health problem of global concern*. OIE/WHO, Paris, pp 164-182.

Eckert, J., Deplazes, P. (2004) Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17, 107-135.

Euzet, L., Combes, B. (1980) Les problèmes de l'espèce chez les animaux parasites. *Mem. Soc. Zool. France*, 40, 239-285.

Fichet-Calvet, E., Jomaa, I., Giraudoux, P., Ashford, W. (1999) Estimation of sand rat



abundance by using surface indices. *Acta Theriol.*, 44, 353-362.

Gese, E.M., Ruff, R.L. (1997) Scent-marking by coyotes, *Canis latrans*: the influence of social and ecological factors. *Anim. Behav.*, 54, 1155-1166.

Giraudoux, P., Delattre, P., Quéré, J.P., Damange, J.P. (1994) Structure and kinetics of rodent populations, in a region under agricultural land abandonment. *Acta Oecol.*, 15, 385-400.

Giraudoux, P., Pradier, B., Delattre, P., Deblay, S., Salvi, D., Defaut, R. (1995) Estimation of water vole abundance by using surface indices. *Acta Theriol.*, 40, 77-96.

Giraudoux, P., Delattre, P., Habert, M., Quéré, J.P., Deblay, S., Defaut, R., Duhamel, R., Moissenet, M.F., Salvi, D., Truchetet, D. (1997) Population dynamics of fossorial water vole (*Arvicola terrestris scherman*): a land use and landscape perspective. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 66, 47-60.

Giraudoux, P., Raoul, F., Bardonnnet, K., Vuillaume, P., Tourneux, F., Cliquet, F., Delattre, P., Vuitton, D.A. (2001) Alveolar echinococcosis: characteristics of a possible emergence and new perspectives in epidemiosurveillance. *Méd. Mal. Infect.*, 31, 247-256.

Giraudoux, P., Delattre, P., Takahashi, K., Raoul, F., Quéré, J.P., Craig, P., Vuitton, D. (2002) Transmission ecology of *Echinococcus multilocularis* in wildlife: what can be learned from comparative studies and multiscale approaches? In: Craig P, Pawlowski Z (eds) *Cestode Zoonoses: Echinococcosis and Cysticercosis*. IOS Press, pp 251-266.

Giraudoux, P., Craig, P.S., Delattre, P., Bao, G., Bartholomot, B., Harraga, S., Quéré, J.P., Raoul, F., Wang, Y., Shi, D., Vuitton, D.A. (2003) Interactions between landscape changes and host communities can regulate *Echinococcus multilocularis* transmission. *Parasitology*, 127, S1-S11.

Giraudoux, P. (2006a) pgrmness: miscellaneous functions for analysis and display of ecological and spatial data. R package version 1.2.5 <http://lbe.univ-fcomte.fr/telechar/>

Giraudoux, P., Pleydell, D., Raoul, F., Quéré, J.P., Wang, Q., Yang, Y., Vuitton, D.A., Qiu, J., Yang, W., Craig, P.S.; (2006b) Transmission ecology of *Echinococcus multilocularis*: what are the ranges of parasite stability among various host communities in China? *Parasitol. Int.*, 55, S237-S246.

Goszczyński, J. (1990) Scent marking by red foxes in Central Poland during the winter season. *Acta Theriol.*, 35, 7-16.

Gottstein, B., Saucy, F., Wyss, C., Siegenthaler, M., Jacquier, P., Schmitt, M., Brossard, M., Demierre, G. (1996) Investigations on a swiss area highly endemic for *Echinococcus multilocularis*. *Appl. Parasitol.*, 37, 129-136.

Gottstein, B., Saucy, F., Deplazes, P., Reichen, J., Demierre, G., Busato, A., Zuercher, C., Pugin, P. (2001) Is high prevalence of *Echinococcus multilocularis* in wild and domestic animals associated with disease incidence in humans? *Emerg. Infect. Dis.*, 7, 408-412.

Hansen, F., Jeltsch, F., Tackman, K., Staubach, C., Thulke, H.H; (2004) Processes leading to

a spatial aggregation of *Echinococcus multilocularis* in its natural intermediate host *Microtus arvalis*. *Int. J. Parasitol.*, 34, 37-44.

Hansson, L. (1979) Field signs as indicators of vole abundance. *J. Appl. Ecol.*, 16, 339-347.

Hemami, M.R., Dolman, P.M. (2005) The disappearance of muntjac (*Muntiacus reevesi*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) pellet groups in a pine forest of lowland England. *Eur. J. Wildl. Res.*, 51, 19-24.

Hofer, S., Gloor, S., Muller, U., Mathis, A., Hegglin, D., Deplazes, P. (2000) High prevalence of *Echinococcus multilocularis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) and voles (*Arvicola terrestris*) in the city of Zurich, Switzerland. *Parasitology*, 120, 135-142.

Holmes, J.C. (1987) The structure of helminth communities. *Int. J. Parasitol.*, 17, 203-208.

Kern, P., Bardonnnet, K., Renner, E., Auer, H., Pawlowski, Z., Ammann, R.W., Vuitton, D.A., Kern, P., and the European Echinococcosis Registry (2003) European Echinococcosis Registry: human alveolar echinococcosis, Europe, 1982-2000. *Emerg. Infect. Dis.*, 9, 343-349.

Laake, J.L., Buckland, S.T., Anderson, D.R., Burnham, K.P; (1993) *DISTANCE User's Guide*. Colorado Cooperative Fish and Wildlife Research Unit, Colorado State University, Fort Collins, CO.

Nchanji, A.C., Plumtre, A.J. (2001) Seasonality in elephant dung decay and implications for censuring and population monitoring in southwestern Cameroon. *Afr. J. Ecol.*, 39, 24-32.

Patz, J.A., Daszak, P., Tabor, G.M., Aguirre, A.A., Pearl, M., Epstein, J., Wolfe, N.D., Kilpatrick, A.M., Foufopoulos, J., Molyneux, D., Bradley, D.J., and the Members Of The Working Group on Land Use (2004) Unhealthy landscapes: policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. *Environ. Health Perspect.*, 112, 1092-1098.

Pesson, B., Carbiener, R. (1989) Ecologie de l'échinococcose alvéolaire en Alsace: le parasitisme du renard roux (*Vulpes vulpes* L.). *Bull. Ecol.*, 20, 295-301.

Quéré, J.P., Raoul, F., Giraudoux, P., Delattre, P. (2000) An index method of estimating relative population densities of the common vole (*Microtus arvalis*) at landscape scale. *Rev. Ecol. (Terre Vie)*, 55, 25-31.

Raoul, F., Defaut, R., Michelat, D., Montadert, M., Pépin, D., Quéré, J.P., Tissot, B., Delattre, P., Giraudoux, P. (2001a) Landscape effects on the population dynamics of small mammal communities: a preliminary analysis of prey-resource variations. *Rev. Ecol. (Terre Vie)*, 56, 339-351.

Raoul, F., Nonaka, N., Piarroux, R., Vuitton, D.A., Giraudoux, P. (2001b) Assessment of the epidemiological status of *Echinococcus multilocularis* in foxes in France using ELISA coprotests on fox faeces collected in the field. *Int. J. Parasitol.*, 31, 1579-1588.

Rausch, R.L. (1995) Life-cycle patterns and geographic distribution of *Echinococcus* species. In: Thomson RCA, Lymbery AJ (eds) *Echinococcus and hydatid disease*. CAB International,

Wallingford, pp 88-134.

Romig, T., Dinkel, A., MacKenstedt, U. (2006) The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol. Int.*, 55, S187-S191.

Ruette, S., Sthal, P., Albaret, M. (2003) Applying distance-sampling methods to spotlight counts of red foxes. *J. Appl. Ecol.*, 40, 32-43.

Sanchez, D.M., Krausman, P.R., Livingston, T.R., Gipson, P.S. (2004) Persistence of carnivore scat in the Sonoran Desert. *Wildl. Soc. Bull.*, 32, 366-372.

Saucy, F., Schneiter, B. (1997) Juvenile dispersal in the vole *Arvicola terrestris* during rainy nights: a preliminary report. *Bull. Soc. Vaud. Sc. Nat.*, 84, 333-345.

Sauer, J.R., Williams, B.K. (1989) Generalized procedures for testing hypotheses about survival or recovery rates. *J. Wildl. Manage.*, 53, 137-142.

Siegel, S., Castellan, N.J.J. (1988) *Non parametric statistics for the behavioural sciences*. McGraw-Hill International Editions, New-York.

Spitz, F. (1977) Le campagnol des champs (*Microtus arvalis* (Pallas)) en Europe. *Bull. OEPP.*, 7, 165-175.

Staubach, C., Thulke, H.H., Tackmann, K., Hugh-Jones, M., Conraths, F.J. (2001) Geographic information system-aided analysis of factors associated with the spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* infections of foxes. *Am. J. Med. Hyg.*, 65, 943-948.

Thompson, R.C.A., MacManus, D.P. (2001) Aetiology: parasites and life-cycles. In: Eckert, J., Gemmell, M.A., Meslin, F.X., Pawlowski, Z.S. (eds) *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A public health problem of global concern*. OIE/WHO, Paris, pp 1-19.

Van Der Giessen, J.B.W., Rombout, Y., Teunis, P. (2004) Base line prevalence and spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* in a newly recognized endemic area in the Netherlands. *Vet. Parasitol.*, 119, 27-35.

Veit, P., Bilger, B., Schad, V., Schäfer, J., Frank, W., Lucius, R. (1995) Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasitology*, 110, 79-86.

Webbon, C.C., Baker, P.J., Harris, S. (2004) Faecal density counts for monitoring changes in red fox numbers in rural Britain. *J. Appl. Ecol.*, 41, 768-779.

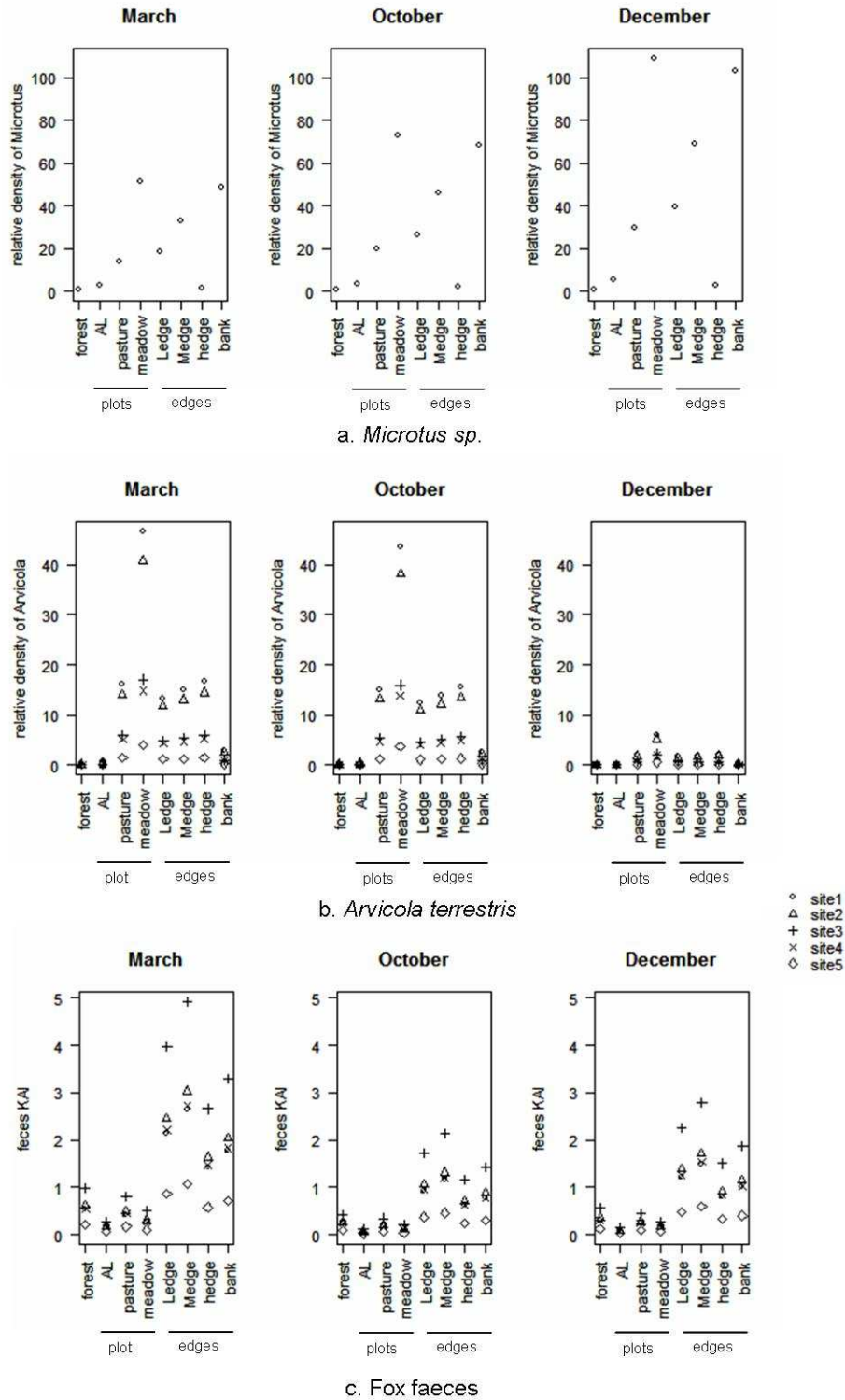
Williams, B., Warren, J. (2003) Effects of spatial distribution on the decomposition of sheep faeces in different vegetation types. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 103, 237-243.

**Table I.** Number of intervals walked and of fox faeces collected, relative rodent densities, and cumulative rainfall and mean temperature the month before transects, according to sampling session.

|   | March 2004 | October 2004 | December 2004 | March 2005 | October 2005 |
|---|------------|--------------|---------------|------------|--------------|
| Number of intervals walked  | 3963       | 3918         | 3868          | 3855       | 3875         |
| Number of fox faeces collected  | 60         | 29           | 25            | 24         | 9            |
| Fox faeces Kilometric Abundance Index                                 | 1.51       | 0.75         | 0.62          | 0.60       | 0.23         |
| Number of intervals positive for <i>Microtus sp.</i> / 100 intervals  | 3.31       | 4.03         | 9.54          | 8.35       | 10.66        |
| Number of intervals positive for <i>A. terrestris</i> / 100 intervals | 1.36       | 0.97         | 0.18          | 1.12       | 2.61         |
| Cumulative rainfall (mm) during the previous month                    | 22.8       | 21.2         | 37.2          | 54.5       | 59.1         |
| Mean temperature (°C) during the previous month                       | 4.1        | 15.5         | 5.9           | 1.2        | 15.7         |

**Table II.** Comparison of negative binomial models for **a** *Microtus sp.*; **b** *Arvicola terrestris*; **c** fox faeces. LL = maximized log-likelihood; K= number of estimated parameters; n/K= number of observations/K; AIC = first order Akaike Information Criterion; AICc= second order Akaike Information Criterion;  $\Delta_i$ = difference between AIC and the lowest value of AIC or between AICc and the lowest value of AICc;  $w_i$  = Akaike weights. INTERVALS = total number of intervals walked; SITE: 5 study sites; RAIN= cumulative rainfall during the month preceding transects; TEMPERATURE = mean temperature during the month preceding transect; MONTH = March, October or December; HABITAT = 8 categories; MICROTUS = number of intervals with *Microtus sp.* indices; ARVICOLA = number of intervals with *Arvicola terrestris* indices. MONTH : HABITAT; MONTH : RAIN; MONTH : TEMPERATURE = interactions between quoted variables. Bold characters = Best AIC or AICc values

| (a) Models of <i>Microtus sp.</i> abundance       | LL      | K  | n/K   | AICc          | $\Delta_i$ | $w_i$ |
|---|---------|----|-------|---------------|------------|-------|
| INTERVALS   | -1344.5 | 3  | 306.3 | 2695.0        | 289.5      | 0     |
| INTERVALS+SITE                                    | -1340.0 | 7  | 131.3 | 2694.2        | 288.7      | 0     |
| INTERVALS+RAIN                                    | -1329.2 | 4  | 229.8 | 2666.3        | 260.9      | 0     |
| INTERVALS+RAIN+TEMPERATURE                        | -1328.7 | 5  | 183.8 | 2667.4        | 261.9      | 0     |
| INTERVALS+RAIN+MONTH                              | -1322.5 | 6  | 153.2 | 2657.2        | 251.7      | 0     |
| INTERVALS+RAIN+MONTH+HABITAT                      | -1195.3 | 13 | 70.7  | 2417.1        | 11.6       | 0     |
| INTERVALS+RAIN+MONTH+HABITAT+ARVICOLA             | -1195.3 | 14 | 65.6  | 2419.1        | 13.6       | 0     |
| INTERVALS+RAIN+MONTH+HABITAT+MONTH:HABITAT        | -1174.9 | 27 | 34.0  | <b>2405.5</b> | 0          | 1     |
| b) Models of <i>Arvicola terrestris</i> abundance | LL      | K  | n/K   | AICc          | $\Delta_i$ | $w_i$ |
| INTERVALS   | -450.8  | 3  | 306.3 | 907.6         | 75.6       | 0     |
| INTERVALS+SITE                                    | -437.3  | 7  | 131.3 | 888.7         | 56.7       | 0     |
| INTERVALS+SITE+RAIN                               | -436.4  | 8  | 114.9 | 889.1         | 57.1       | 0     |
| INTERVALS+SITE+TEMPERATURE                        | -435.8  | 8  | 114.9 | 887.7         | 55.7       | 0     |
| INTERVALS+SITE+MONTH                              | -426.8  | 9  | 102.1 | 871.7         | 39.7       | 0     |
| INTERVALS+SITE+MONTH+HABITAT                      | -400.8  | 16 | 57.4  | 834.1         | 2.14       | 0.23  |
| INTERVALS+SITE+MONTH+HABITAT+MICROTUS             | -400.7  | 17 | 54.1  | 836.0         | 4.0        | 0.09  |
| INTERVALS+SITE+MONTH+HABITAT+MONTH:HABITAT        | -385.0  | 30 | 30.6  | <b>832.0</b>  | 0          | 0.68  |
| c) Models of fox faeces abundance                 | LL      | K  | n/K   | AIC           | $\Delta_i$ | $w_i$ |
| INTERVALS   | -409.8  | 3  | 306.3 | 825.6         | 74.6       | 0     |
| INTERVALS+SITE                                    | -401.6  | 7  | 131.3 | 817.2         | 66.2       | 0     |
| INTERVALS+SITE+MONTH                              | -394.3  | 9  | 102.1 | 806.5         | 55.6       | 0     |
| INTERVALS+SITE+MONTH+RAIN                         | -383.7  | 10 | 91.9  | 787.3         | 36.3       | 0     |
| INTERVALS+SITE+MONTH+RAIN+TEMPERATURE             | -383.6  | 11 | 83.5  | 789.3         | 38.3       | 0     |
| INTERVALS+SITE+MONTH+RAIN+HABITAT                 | -358.5  | 17 | 54.1  | <b>751.0</b>  | 0          | 0.42  |
| INTERVALS+SITE+MONTH+RAIN+HABITAT+MICROTUS        | -357.5  | 18 | 51.1  | 751.1         | 0.1        | 0.40  |
| INTERVALS+SITE+MONTH+RAIN+HABITAT+ARVICOLA        | -358.3  | 18 | 51.1  | 752.6         | 1.65       | 0.18  |



**Figure 1.** Predictions of the best models for relative densities of **a** *Microtus sp.* (number of positive intervals/100 intervals); **b** *Arvicola terrestris* (number of positive intervals/100 intervals); **c** fox faeces Kilometric Abundance Index (KAI) (number of faeces found/100 intervals). AL = Arable Land; Ledge = Lower-height vegetation edge; Medge = medium-height vegetation edge. Rainfall continuous variable was fixed to a constant value of 39mm (mean value for the five sessions).

---

| Habitats                      | Faeces relative density | Intermediate host relative density | Estimated meeting risk |
|-------------------------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------|
| Arable land                   |                         |                                    |                        |
| Forest                        | +                       | +                                  | Low                    |
| Pasture                       | +                       | ++                                 | Low to Medium          |
| Meadow                        | +                       | +++                                | Medium                 |
| Hedge                         | +++                     | +                                  | Medium                 |
| Lower-height vegetation edge  | +++                     | ++                                 | Medium to High         |
| Medium-height vegetation edge |                         |                                    |                        |
| Bank                          | +++                     | +++                                | High                   |

**Figure 2.** Influence of faeces and intermediate host relative densities on the estimated meeting risk. +, low relative density; ++, medium relative density; +++, high relative density.

### **IV.3. Conclusion de la troisième partie**

Nos résultats montrent que, indépendamment de l'effet de variables temporelles ou climatiques globales, le nombre de fèces de renard trouvées dépend du milieu considéré. Si le nombre de fèces n'est pas linéairement lié à aux densités de rongeurs hôtes intermédiaires, certains milieux présentent cependant des densités de fèces et de rongeurs élevées, permettant ainsi probablement une meilleure ouverture du filtre de rencontre.

Il importe donc de considérer les aspect locaux de la transmission dans les études épidémiologiques, pour établir si certains milieux, de part leurs propriétés et les abondances de fèces et de rongeurs hôtes intermédiaires, peuvent être considérés comme « à risque ».

Le filtre de rencontre entre les œufs du parasite et les hôtes intermédiaires peut être régulé par de nombreuses autres variables, telles que la prévalence des renards, qui module le nombre de fèces porteuses d'œufs. De même, les charges portées variant en fonction des individus, le nombre de fèces porteuses d'œufs et le nombre d'œufs par fèces émises par un renard positif, dépendra de sa charge parasitaire et du stade de développement des vers dans ses intestins (immatures, matures, sénescents). Il convient de plus de considérer la seconde partie du cycle et ainsi déterminer quels facteurs régulent le degré d'ouverture du filtre de rencontre entre les larves du parasite (présentes dans le foie des rongeurs) et l'hôte définitif.





## V. DISCUSSION

La forte prévalence (53 %) que nous avons mise en évidence dans la population de renards du Sud des Ardennes indique que les caractéristiques environnementales de cette région de récente endémie sont actuellement propices à la transmission des stades infectants du parasite d'un hôte à l'autre. Elle signifie en effet que, durant la période d'étude, l'intensité de la transmission de la biomasse parasitaire a été telle que plus d'un renard sur deux a consommé au moins un rongeur porteur des larves du parasite. Les larves se sont développées pour devenir des vers adultes capables de produire des œufs et ces œufs, disséminés dans l'environnement, pourront contaminer à leur tour d'autres rongeurs ou, accidentellement, l'Homme.

### V.1. Synthèse de la contribution de cette étude à la connaissance du cycle d'*E. multilocularis*

L'étude de la transmission d'*E. multilocularis* dans le sud-est des Ardennes a montré que l'on peut observer de fortes prévalences vulpines, d'une part, en région de récente endémie où relativement peu d'études ont été conduites, d'autre part, dans une région dont la composition du paysage n'est pas propice aux pullulations de rongeurs, contrairement aux caractéristiques des régions dans lesquelles ont été jusqu'à présent relevées la plupart des fortes prévalences vulpines. De plus, dans les Ardennes, le principal hôte intermédiaire semble être un *Microtus* et, contrairement à ce qui est généralement observé, *A. terrestris* ne semble pas jouer un facteur clé dans le cycle parasitaire. La forte consommation de *Microtus* sp. par les renards et le fait qu'elle soit corrélée à l'abondance de ce rongeur, peuvent expliquer la forte prévalence relevée. Une influence de la densité de renard sur la prévalence vulpine est également envisagée mais sans avoir été mise en évidence. Le génotypage des vers adultes portés par les renards a montré la présence de deux génotypes parasites, qui ne semblent cependant pas expliquer de façon directe la forte prévalence et l'hétérogénéité des charges parasitaires décrites au cours de l'étude.

L'analyse spatiale des données de prévalence et des charges parasitaires à une étendue régionale (900 km<sup>2</sup>) et un grain local (1 km<sup>2</sup>) a montré que la composition du paysage et les densités de rongeurs hôtes intermédiaires semblent avoir une influence sur le cycle

parasitaire: les renards infectés semblent fréquenter des secteurs plus riches en prairies que ceux non infectés et ils sont majoritairement dans la partie du terrain d'étude la plus riche en *Microtus sp.*

Enfin, à une étendue locale (90 km<sup>2</sup>) et un grain micro-local (1000 m<sup>2</sup>), les caractéristiques du milieu pourraient moduler la possibilité de rencontre entre le parasite et les hôtes intermédiaires. En effet, certains milieux sont propices à des densités importantes de fèces de renards et de rongeurs prairiaux, la végétation y est donc probablement plus contaminée que dans les autres types de milieux et le cycle parasitaire peut y être plus intense (Figure 8).

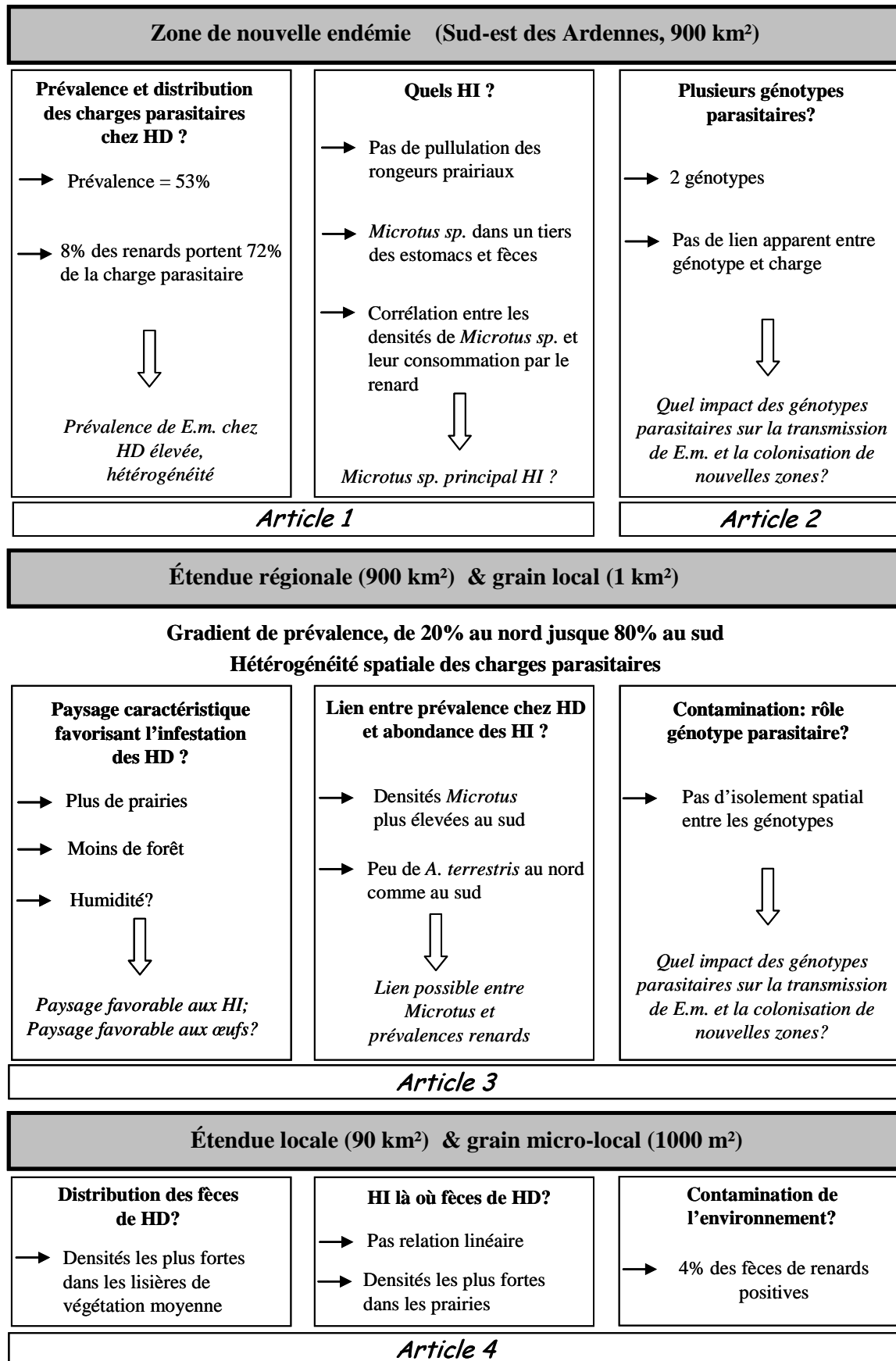


Figure 8 : Synthèse des questions et résultats de l'étude

HD = hôte définitif (renard), HI = hôtes intermédiaires, *E.m.* = *Echinococcus multilocularis*

## **V.2. Importance de l'étude des zoonoses parasitaires**

Parce qu'elle peuvent être à l'origine de cas de contamination humaine, l'identification des caractéristiques environnementales associées aux fortes prévalences vulpines d'*E. multilocularis* constitue un enjeu de santé publique. De plus, sur un plan plus théorique, l'étude de l'effet des variables environnementales sur la transmission parasitaire contribue à améliorer notre compréhension de la complexité des systèmes écologiques, étape indispensable pour anticiper les effets des profondes modifications subies par l'environnement depuis les dernières décennies. Qu'elles soient directement provoquées par l'homme (urbanisation, déforestation, intensification de l'agriculture...) ou dues au réchauffement climatique, ces modifications rapides de l'environnement, qui ont débuté au 19<sup>ème</sup> siècle et ne cessent de s'accélérer, ont un effet sur la transmission des pathogènes et l'émergence des maladies infectieuses (Patz et al., 2004), de même que la modification des comportements humains (Macpherson, 2005).

Deux exemples concrets de l'effet des modifications de l'environnement sur le risque de transmission de maladies infectieuses sont apportés par des zoonoses transmises par un vecteur tique (l'encéphalite à tiques et la maladie de Lyme), et décrits par Randolph (2001). La situation de l'encéphalite à tiques en Europe montre une émergence dans plusieurs pays, liée à la fois à des hivers plus doux que par le passé et à des changements de pratiques agricoles. Elle pourrait, ainsi, voir son aire de répartition évoluer suite au réchauffement climatique, avec une disparition du virus dans certaines régions et une extension de l'aire de répartition vers le nord de l'Europe. Dans le cas de la maladie de Lyme, dans les états du Nord-Est des Etats-Unis, les habitats favorables aux fortes densités de tiques, et donc à une transmission importante de la bactérie responsable de la maladie de Lyme coïncident à présent avec les habitations humaines qui ont envahi les grandes étendues forestières.

La forêt occupe près de 30 % de la superficie du département des Ardennes et les contours des massifs forestiers ont peu évolué depuis le début du siècle dans une majorité du département. Dans ce sens, l'étude de la transmission d'*E. multilocularis* dans cette région peut servir de référence pour la compréhension du fonctionnement du cycle parasitaire dans une région peu affectée par les modifications de l'environnement. Cependant, dans la zone sud-ouest, qui correspond au début de la plaine de Champagne, de profonds changements ont eu lieu après la seconde guerre mondiale: la forêt qui y était présente a été rasée pour couvrir

les besoins en bois, et les terres converties à la culture intensive de céréales et de plantes fourragères. Aussi, si la majorité des Ardennes est restée une zone très rurale alors que le reste de la France s'urbanisait rapidement, elle n'est pas à l'abri d'un futur développement urbain ou d'un changement des pratiques agricoles, qui modifieraient alors profondément le paysage actuel. Il importe donc d'anticiper les possibles effets de ces modifications du paysage sur la transmission parasitaire.

### **V.3. Comment anticiper et prévenir l'émergence de zoonoses ?**

L'apparition de nouvelles maladies d'une part, et la complexité du fonctionnement des maladies infectieuses déjà présentes d'autre part, font que la plupart des cycles des maladies infectieuses sont encore très mal connus. L'enjeu est double: comprendre le fonctionnement des pathogènes et prévenir leur transmission. Dans ce contexte, les modèles mathématiques apparaissent comme un des outils pour comprendre le fonctionnement des systèmes parasites-hôtes et pour développer des applications utiles et importantes dans le traitement et le contrôle des maladies parasitaires (Bush et al. 2001). De plus, les écarts entre les données empiriques et le modèle théorique peuvent être utilisés pour définir des meilleurs modèles et ainsi, avoir une approche plus fine de la biologie du parasite (Torgerson, 2003).

Les premières tentatives de modélisation du fonctionnement d'une maladie infectieuse reviennent à Daniel Bernouilli en 1760 qui réalisa une équation décrivant la dynamique d'infection de la variole, puis à McKendrick qui, en 1926, proposa le premier modèle stochastique (Kephart et White, 1991). Depuis, de nombreuses publications sont parues sur le sujet, dénotant les enjeux de la modélisation dans la lutte contre les maladies infectieuses. Grenfell et al. (2002) indiquent ainsi que, de 1996 à 2001, plus de 300 publications sont parues sur la modélisation dans le domaine de l'épidémiologie de la faune sauvage, et ils soulignent l'utilité de cette discipline.

La modélisation a, notamment, été beaucoup utilisée pour simuler l'arrivée de la rage en Angleterre où les renards sont présents en forte densité en milieu urbain (Smith et Harris, 1991) ou pour comparer les différentes méthodes de contrôle possibles (Smith et Wilkinson, 2003). Elle a également été utilisée par White et Harris (1995) pour examiner la distribution fractionnée de la tuberculose bovine chez les blaireaux en Angleterre et mettre en évidence, à l'aide d'un modèle stochastique, l'influence de la distribution spatiale et de la connectivité

entre les sous-populations de blaireaux dans la diffusion de la bactérie. Ces auteurs ont, ainsi, montré que les perturbations des populations de blaireaux, potentiellement provoquées par les campagnes de contrôle, pourraient provoquer une augmentation de la persistance ou de la diffusion de l'infection. Dans le cas du paludisme, des modèles de simulations ont été développés pour étudier les conditions déclenchant une résistance du parasite aux médicaments et pour prédire l'extension de cette résistance (Koella et Antia, 2003).

#### **V.4. Limites de la modélisation et types de données nécessaires**

On peut voir à travers ces exemples que la modélisation est largement employée en parasitologie, notamment pour les microparasites (virus, bactéries, protozoaires). Cependant, il s'avère plus difficile de mettre en place des modèles pour les macroparasites (helminthes et parasitoïdes) à cycle indirect, du fait de l'implication de plusieurs hôtes dans ces cycles (Anderson et May, 1979; May et Anderson, 1979). Dans le cas des macroparasites dont *E. multilocularis* fait partie, les modèles ont permis d'identifier un certain nombre de caractéristiques relatives aux populations d'hôtes : chez les hôtes définitifs, le parasite est peu pathogène, les prévalences sont élevées et la durée de vie de l'hôte est longue, alors que chez les hôtes intermédiaires, le parasite est fortement pathogène, les prévalences sont faibles et la durée de vie de l'hôte est courte (Anderson et May, 1979; May et Anderson, 1979). Cependant, un des facteurs limitant du développement des modèles est la disponibilité des données, certaines étant, de plus, difficiles à quantifier (Keeling, 2005). Ainsi, si la modélisation peut, notamment, permettre aux empiristes de prendre conscience qu'il existe des limites dans les approches théoriques, elle permet aussi aux théoriciens de réaliser l'importance et la difficulté de collecter les données nécessaires pour « alimenter » les modèles (Grenfell et al. 2001).

La modélisation met donc en évidence la nécessité de disposer de données, d'une part issues de plusieurs disciplines et, d'autre part, provenant d'études empiriques pour comprendre des processus biologiques complexes, comme celui du cycle de transmission d'*E. multilocularis*. D'ailleurs, alors que de nombreux modèles ont été développés pour *Echinococcus granulosus*, notamment à partir des travaux de Roberts et al. (1986, 1987), relativement peu ont été proposés pour *E. multilocularis*, à l'exception de ceux développés par Roberts et Aubert (1995), Ishikawa et al. (2003), Hansen et al. (2003, 2004) et Budke et al. (2005). Dans ces modèles, les individus (hôtes définitifs ou hôtes intermédiaires) sont

classés en trois catégories: « non infectés mais susceptibles de l'être », « infectés mais non infectieux » (c'est-à-dire porteurs du parasite en période prépatente), et « infectieux », si le parasite peut passer à l'hôte suivant dès que des conditions sont favorables. Pour parvenir à appliquer ce classement, il faut nécessairement connaître certains paramètres précis, tels que l'espérance de vie des vers adultes dans les renards (durée de la contamination), la durée de maturation des larves dans les campagnols et des vers dans les renards (prépatence), ou encore l'intervalle d'émission des segments ovigères et le nombre d'œufs par segment chez le vers adulte. Ce type de données est difficilement accessible, et ne peut l'être que par des expériences en laboratoire dont les extrapolations aux conditions naturelles sont hasardeuses.

#### **V.5. Apport des données de terrain à la compréhension du cycle parasitaire**

Les études de terrain, du type de celle que nous avons conduite dans les Ardennes, s'avèrent complémentaires des travaux expérimentaux conduits en laboratoire, car elles apportent une partie des données nécessaires à l'identification des facteurs biologiques qui modulent l'intensité de la transmission parasitaire en fonction des conditions environnementales. Par exemple, les études de terrain permettent d'identifier les espèces hôtes responsables de la transmission, les relations existantes entre les différents types d'hôtes, et entre les hôtes et le milieu environnant. De plus, elles permettent de mettre en lumière l'étendue des variations possibles des prévalences et des charges parasitaires. Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à plusieurs des facteurs identifiés par Raoul (2001) comme influençant la transmission d'*E. multilocularis*: prévalence chez les hôtes définitifs, charges parasitaires, occurrence des hôtes intermédiaires dans le régime alimentaire du renard, densités d'hôtes intermédiaires et définitifs, répartition spatiale des œufs et lien possible entre le type génétique du parasite et sa production d'œufs. L'originalité de notre démarche tient à notre choix de coupler l'étude du cycle dans une région de nouvelle endémie avec une approche intégrée à plusieurs fenêtres de perception spatiale. En effet, l'étude du fonctionnement global du cycle d'*E. multilocularis* dans le Sud-est des Ardennes a mis en évidence l'importance du régime alimentaire, alors que les analyses spatiales à différentes étendues et grains se sont révélées être particulièrement adaptées à la mise en évidence de l'agrégation spatiale des renards contaminés et des charges parasitaires, et de la différence dans les degrés d'ouverture du filtre de rencontre en fonction des milieux.



### **V.6. Comparaison du fonctionnement du cycle d'*E. multilocularis* dans les Ardennes à d'autres situations**

Notre étude, réalisée dans le Sud-est des Ardennes sur 900 km<sup>2</sup>, a permis de confirmer que la prévalence vulpine dans une région de nouvelle endémie peut être aussi élevée que celles relevées en régions d'endémie historique (Losson et al., 1997; Romig et al. 1999a, 1999b; Hofer et al., 2000; Raoul et al., 2001; Martinek et al., 2001; Duscher et al., 2006). Nos données n'ont pas permis de mettre en évidence le lien entre l'évolution des densités de renards et celle des prévalences vulpines suggéré par Raoul et al. (2001), Jenkins et al. (2005) et Romig et al. (2006). Un recul sur le plus long terme sera toutefois nécessaire pour préciser cet aspect. Cependant, le fait que la densité estimée de renard soit particulièrement élevée dans la région peut expliquer, en partie, la forte prévalence relevée. L'explication de cette forte prévalence est cependant également à rechercher dans les caractéristiques de la relation prédateur-proie.

La situation ardennaise s'est, en effet, avérée originale en ce qui concerne les liens entre hôtes définitifs et hôtes intermédiaires. En Franche-Comté (Figure 9), zone d'endémie historique, une consommation intensive de campagnols terrestres et de campagnols des champs par les renards semble être un facteur clé dans la transmission parasitaire (Giraudoux et al., 2002). La spécialisation des renards sur le campagnol terrestre dans la zone des plateaux du Jura est proportionnelle à la biomasse présente (Raoul, 2001) et elle est liée à la présence de pullulations de plusieurs mois de ce rongeur (Giraudoux et al., 1997; Giraudoux et al., 2002), provoquées par un ratio élevé dans le paysage de son habitat optimal, la prairie (ROMPA *hypothesis*, Lidicker, 2000). Les fortes prévalences chez les renards se situent donc dans ces zones des plateaux jurassiens, où l'industrie laitière domine (Giraudoux et al., 1997; Raoul et al., 2001). En revanche, dans les Ardennes (Figure 9), le régime alimentaire des renards est composé en grande partie de *Microtus sp.*, et le campagnol terrestre y a une place négligeable. Ce ne sont plus les campagnols terrestres qui sont consommés proportionnellement à leur abondance: les *Microtus* semblent avoir remplacé les campagnols terrestres dans le régime du renard, et par là même dans le cycle de *E. multilocularis*. De plus, la structure du paysage n'est pas favorable à des pullulations de rongeurs prairiaux: les densités de campagnols des champs restent très faibles comparativement à la Franche-Comté et les campagnols terrestres sont quasi inexistantes. Ainsi, à une échelle régionale, l'absence de pullulations de rongeurs prairiaux et de paysages favorisant ces pullulations n'est pas

associée à une faible intensité du cycle du parasite (Figure 9) et à un risque réduit de transmission à l'homme.

| Caractéristiques du cycle                  | Zone d'endémie historique<br><i>Cas de la Franche-Comté</i>                  | Zone de nouvelle endémie<br><i>Cas du Sud-est des Ardennes</i>            |
|--|--|---|
| Principal HD *                             | Renard roux  | Renard roux   |
| Principaux HI *                            | <i>Microtus arvalis</i><br><i>Arvicola terrestris</i>                        | <i>Microtus sp.</i> ? **  |
| Densités HI                                | <i>M. arvalis</i><br><i>A. terrestris</i>                                    | <i>Microtus sp.</i><br><i>A. terrestris</i>                               |
| Consommation des HI par les HD             | <i>M. arvalis</i><br><i>A. terrestris</i>                                    | <i>Microtus sp.</i><br><i>A. terrestris</i>                               |
| Relation densités HI – consommation par HD | <i>A. terrestris</i> : consommation proportionnelle à la biomasse disponible | <i>M. arvalis</i> : consommation proportionnelle à la biomasse disponible |
| Type de paysage agricole                   | Prairies   | Cultures & Prairies   |

\* Ayant un rôle significatif dans la transmission du parasite

\*\* HI présumé d'après le régime alimentaire des renards, cependant les prévalences de *E. multilocularis* chez les *Microtus* sont inconnues

Figure 9. Caractéristiques du fonctionnement du cycle d'*E. multilocularis* dans des zones où plus de 50 % des renards sont porteurs du parasite (la taille des caractères est fonction de l'importance du facteur)

Notre étude est la première menée dans une zone de nouvelle endémie en prenant en compte aussi bien les aspects de dynamique des populations hôtes intermédiaires, que le rôle du paysage et les relations entre hôtes intermédiaires et hôtes définitifs. En effet, les données issues de la plupart des zones dites de nouvelle endémie sont généralement très fragmentaires (Belgique, Pologne, Luxembourg, Républiques Tchèque et Slovaque, Hongrie, Pays-Bas, Italie: détection du parasite chez les renards; Bulgarie, Slovénie, Roumanie: détection du parasite chez des rongeurs; revue in Vervaeke et al., 2003; Casulli et al., 2005): si le renard semble être l'hôte définitif principal, les hôtes intermédiaires sont rarement identifiés et les relations entre hôtes définitifs et hôtes intermédiaires restent donc inconnues. De plus, seulement quelques études se sont pour l'instant intéressées à l'influence du paysage sur la prévalence (Martinek et al., 2001; Miterpakova et al., 2003) ou à l'hétérogénéité des prévalences (Van der Giessen et al., 2004).

Par ailleurs, nous avons constaté que le portage parasitaire varie beaucoup d'un renard à l'autre : une majorité de parasites est portée par un minimum de renards, comme constaté dans la littérature (Hofer et al., 2000; Raoul et al. 2001; Fischer et al., 2005). Des différences de génotypes parasitaires pourraient être avancées pour tenter d'expliquer les différences de charges parasitaires, en supposant qu'un génotype soit responsable des fortes charges, comme cela a été mis en évidence chez les microparasites, pour lesquels les variations de génotypes sont à l'origine de différences de virulence (Rivera et al., 2001; Craig et Scherf, 2001; Su et al., 2003). Dans les Ardennes, nous avons détecté la présence de deux génotypes d'*E. multilocularis* qui ne semblent pas associés à des charges particulières : les plus fortes charges parasitaires que nous avons relevées correspondent aussi bien à un génotype qu'à un autre, ou à la combinaison des deux. Ainsi la question se pose toujours de savoir s'il existe chez *E. multilocularis* des génotypes plus performants que d'autres en termes de transmission.

La forte prévalence mise en évidence dans le sud des Ardennes pourrait également être due, au moins en partie, à une naïveté immunitaire des populations d'hôtes nouvellement en contact avec le parasite (Bush et al., 2002), ou à un fonctionnement particulier du système hôte-parasite dans une zone nouvellement colonisée. Le suivi des helminthes hébergés par les renards au Royaume-Uni (Richards et al., 1995; Smith et al., 2003) indique que ce pays semble pour l'instant exempt d'échinococcose alvéolaire, d'autant plus qu'aucun cas humain autochtone n'y est répertorié (Kern et al., 2003). L'expansion du parasite pourrait y être très rapide et le nombre de cas très important, du fait de cette naïveté immunitaire.

#### **V.7. Extrapolation possible des résultats à l'ensemble du département**

Les caractéristiques de fonctionnement du cycle d'*E. multilocularis* ont été décrites sur une superficie équivalente à un sixième du département des Ardennes. Ce dernier peut être divisé en zones géographiques bien distinctes (Figure 10). La zone 1, qui correspond au massif de l'Ardenne, est quasi exclusivement forestière, c'est la zone la plus humide (en moyenne 1500 mm de pluie par an), la plus fraîche, où l'altitude peut atteindre 500m. La zone 2, dans laquelle l'étude a été menée, est une zone de transition. Ce sont les crêtes ardennaises, essentiellement agricoles, où le paysage est composé de prairies et de cultures, et de forêt pour un tiers de la superficie. La pluviométrie (900-1000 mm par an) et les températures sont elles aussi intermédiaires, l'altitude est de 200 à 300 m. Enfin, la zone 3 est située dans la plaine Champenoise et correspond à une zone de culture intensive de céréales et de plantes

fourragères, où les prairies et les forêts sont absentes. La pluviométrie y est plus faible (800 mm par an) et les températures plus chaudes. Nos résultats semblent pouvoir s'appliquer à l'ensemble de la zone 2. Pour ce qui est du climat et de l'altitude, ils suggèrent que la zone 1 (humide et fraîche) est plus favorable au maintien du parasite que la zone 3 (plus sèche et plus chaude). Les différences marquées de paysage tendent, eux, plutôt à défavoriser la perpétuation du cycle dans les zones 1 et 3, dans la mesure où l'absence de prairies pourrait limiter les densités de rongeurs prairiaux hôtes intermédiaires à des densités inférieures à celles nécessaires pour que le cycle se maintienne. Cependant, le cycle parasitaire semble exister au moins dans la zone 1, puisque des fèces de renards positives y ont été détectées ([www.ententeragezoonoses.com](http://www.ententeragezoonoses.com)). Ainsi, la prospection de ces zones pourrait être une source importante d'information concernant l'influence des espèces d'hôtes intermédiaires et de leur densité sur la transmission d'*E. multilocularis*.

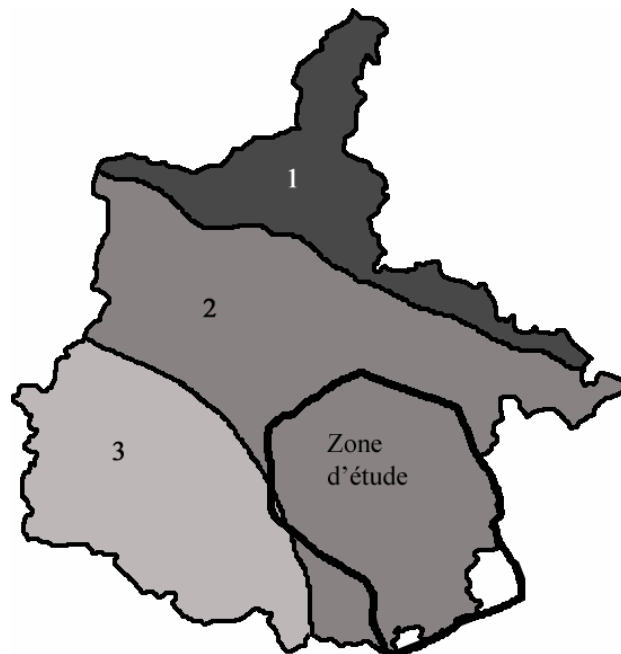


Figure 10. Zonation du département des Ardennes en fonction des principales zones géographiques identifiables

### **V.8. Hétérogénéité spatiale du portage parasitaire à une étendue régionale et un grain local**

Si l'étude des prévalences chez le renard dans différentes régions permet de déterminer l'aire de distribution du parasite et de mettre en évidence sa présence, l'étude de la contamination des renards à une fenêtre d'observation plus fine est préférable pour caractériser de façon plus précise le cycle parasitaire. Dans ce cas, l'étendue régionale, qui est plus à même de prendre en compte le fonctionnement d'une population de renards, et le grain local, assimilable au domaine d'activité des renards, semblent appropriés (voir Figure 11). Nous avons ainsi montré que l'importante hétérogénéité des prévalences vulpines mise en évidence au sein de la zone de répartition du parasite (Eckert et al., 2001b), est de nouveau apparente à une étendue régionale, et que la variabilité de cette prévalence peut être importante puisque la prévalence globale de 53% varie, en fait, de moins de 20% à plus de 80%, (en considérant une étendue régionale et un grain local). A ce grain, les densités de rongeurs hôtes intermédiaires semblent prendre de l'importance par rapport à ce qui a été perçu lors de la détermination du fonctionnement du cycle dans notre région d'étude (première partie de thèse). En effet, les prévalences les plus fortes sont situées dans des secteurs où les densités de *Microtus* sont les plus élevées et ce, même si la composition du paysage de la région n'est pas favorable aux pullulations de rongeurs, contrairement à ce qui est généralement le cas lorsque les prévalences chez les renards sont élevées. De plus, le fait que l'environnement autour des renards infectés semble plus propice à la présence de rongeurs prairiaux hôtes intermédiaires (plus de prairies, moins de forêt) que l'environnement autour des renards sains, confirme l'existence d'un lien entre composition du paysage et probabilité d'infestation des renards et, ce, même en l'absence de pullulations de campagnols. Sur notre terrain et à notre fenêtre d'observation, les densités de campagnols terrestres sont faibles dans les secteurs de forte prévalence, confirmant que cette espèce ne semble pas participer activement au cycle parasitaire dans le sud des Ardennes. L'apparition d'un possible lien entre les densités de *Microtus* hôtes intermédiaires et la contamination des renards nécessite d'affiner les connaissances à ce sujet, pour déterminer les rôles respectifs des *Microtus* et des campagnols terrestres dans la transmission.

De plus, nous avons pu montrer que la distribution spatiale des charges parasitaires à un grain local est très hétérogène : une majorité de parasites est portée par un minimum de renards, et ce sur quelques kilomètres carrés. Il est cependant à déplorer que la plupart des études ne fournissent pas de quantification des charges parasitaires et qu'aucune, à notre connaissance, ne décrive l'hétérogénéité spatiale de ces charges. Elle est pourtant primordiale.

En effet, si l'on considère qu'un ver adulte émet un segment ovigère tous les 15 jours (Eckert et al., 2001a) et que la production d'œufs à l'intérieur d'un renard est proportionnelle au nombre de vers présents, on comprend alors que les renards porteurs d'un faible nombre de vers ne déposent que peu de fèces positives, alors que ceux fortement chargés peuvent déposer des milliers d'œufs avec chaque fèces. Nos résultats semblent indiquer que les renards à forte charge parasitaire sont situés dans les secteurs de plus forte prévalence : une forte biomasse parasitaire agrégée dans une zone restreinte pourrait ainsi faciliter localement la contamination des hôtes.

### **V.9. Identification des milieux à risques à une étendue locale et un grain micro-local**

L'explication de l'agrégation spatiale des charges parasitaires est à rechercher au niveau de la structure du paysage, notamment en s'intéressant, à une fenêtre d'observation plus locale, à la distribution des fèces de renards et, donc potentiellement des œufs d'*E. multilocularis* dans les différents milieux. Le passage à une étendue locale (90 km<sup>2</sup>) et un grain micro-local (1000 m<sup>2</sup>) nous a en effet permis d'aborder la notion de filtre de rencontre (Figure 11).

Comme remarqué en introduction, et comme nous avons pu le constater dans le cas des prévalences d'*E. multilocularis* chez les renards, une apparente homogénéité à un niveau de perception large peut cacher de fortes hétérogénéités à un niveau de perception inférieur. Ainsi, des aires de distribution communes entre rongeurs et renards ne sont pas un gage du passage du parasite dans les hôtes successifs. Le passage du filtre de rencontre nécessite une coïncidence spatiale et temporelle entre parasite et hôte.

Le contact entre les œufs d'échinocoque et les rongeurs implique la présence dans un même milieu de ces deux acteurs, la probabilité de rencontre (c'est-à-dire l'ouverture du filtre) étant d'autant plus élevée que l'un et l'autre sont présents en fortes densités. Or, les œufs étant véhiculés par les fèces de renard, et leurs capacités de déplacement étant nulles, la présence des œufs est inhérente à celle des fèces de renard. Ainsi, la distribution des fèces de renards apparaît comme un facteur clé pour le fonctionnement du cycle. Giraudoux et al. (2002) ont montré en Franche-Comté que les fèces de renards étaient majoritairement présentes dans les lisières de culture et sur les bords des routes. Cependant aucune autre étude n'a examiné cette distribution de façon fine, malgré l'intérêt évident de la question.

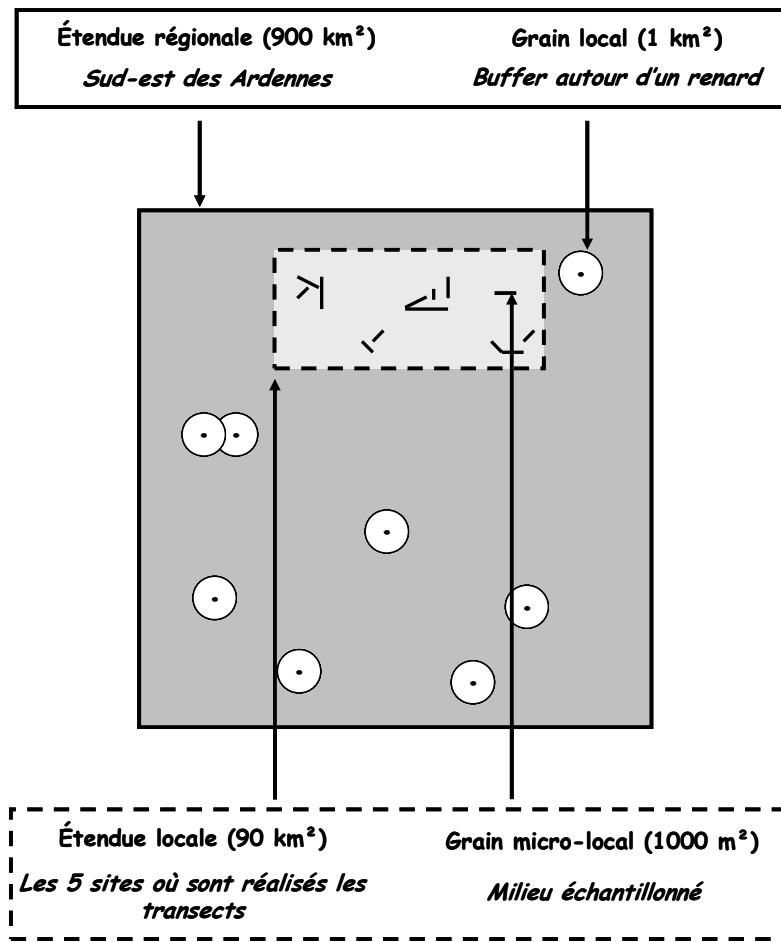


Figure 11. Schéma de l'emboîtement spatial des études régionales et locales

Nos résultats montrent que des fèces sont retrouvées potentiellement dans tous les milieux échantillonnés, mais que ce sont cependant dans les lisières que les densités relatives sont les plus élevées. Il importe désormais de savoir si les conditions climatiques locales qui prévalent dans ce type d'habitat, notamment les conditions d'humidité et de température, peuvent favoriser, ou au contraire diminuer, la survie des œufs (Veit et al. 1995; Hansen et al., 2004) et, par là même, réguler l'ouverture du filtre de rencontre.

Nos résultats ont montré qu'il n'y avait pas de relation linéaire entre les densités de rongeurs et les densités de fèces pour une petite portion de milieu donnée. Cependant, certains milieux présentent dans leur ensemble des densités de fèces et de rongeurs élevées, ce qui optimise probablement l'ouverture du filtre de rencontre. Cette possible ouverture du filtre de rencontre semble confirmée par d'autres études de terrain, concernant les prévalences d'*E. multilocularis* chez *Microtus arvalis* : celles-ci sont généralement faibles (moins de 1%),

mais peuvent localement être supérieures à 10%, dans les lisières de cultures et le long des bords de route, sur quelques centaines de mètres carrés (Delattre et al., 1988; Giraudoux et al., 2002).

La transmission est d'autant plus facilitée que les densités de rongeurs hôtes intermédiaires et de fèces sont élevées. Comme la quantité d'œufs par fèces est présumée être liée à la charge parasitaire des renards, on peut supposer que le nombre d'œufs émis par fèces est très variable en fonction du statut du renard (sain, infecté mais non infectieux, infectieux avec peu de vers, infectieux avec beaucoup de vers). Au cours de notre étude, la contamination des fèces a été testée mais peu d'entre elles ont été diagnostiquées positives; cependant la zone de collecte des fèces s'est avérée a posteriori être située dans un secteur de faible endémie. Le peu de fèces positives ne nous a pas permis de rendre compte de différences locales dans la présence ou l'absence d'œufs.

De plus, lorsque l'on étudie la distribution des fèces, il est important de prendre en compte les facteurs de variabilité de leur persistance dans l'environnement, pour s'assurer que le nombre de fèces trouvées par type de milieu soient bien représentatif de la distribution et de l'abondance relative des fèces dans ces milieux. Or c'est un sujet sur lequel la littérature est actuellement très pauvre. Les principales indications de l'effet de variables telles que les conditions climatiques ou l'activité d'autres animaux sur la persistance des fèces proviennent d'études menées sur des herbivores (Nchanji et Plumptre, 2001; William et Warren, 2004; Hemami et Dolman, 2005). Très peu ont été réalisées sur les fèces de carnivores (Cavallini, 1994; Sanchez et al., 2004). Il apparaît que les fèces peuvent se dégrader très rapidement et disparaître, rendant ainsi les œufs restés sur place indétectables au cours de simple transects. De même, si tout ou une partie des fèces est déplacé, l'emplacement des fèces ne sera alors représentatif que d'une partie de la contamination possible.





## VI. CONCLUSIONS / PERSPECTIVES

Notre étude a souligné une forte prévalence vulpine d'*E. multilocularis* dans une zone pourtant considérée comme une zone de nouvelle endémie. La situation ardennaise s'est avérée originale vis-à-vis de l'importance du genre *Microtus* comme possible principal hôte intermédiaire dans une région où il ne semble pas soumis à pullulations. L'étude du régime alimentaire dans les zones d'endémie est primordiale mais cependant il est à déplorer que peu de résultats soient publiés à ce sujet (Weber et Aubry, 1993; Giraudoux et al., 2002; Raoul, 2001; Saitoh et Takahashi, 1998). Ainsi, il semble pertinent d'explorer davantage, sur le terrain d'étude ardennais et ailleurs, les liens entre les évolutions de densités de *Microtus*, leur consommation par le renard et les prévalences observées. A l'heure actuelle, mise à part au Japon où *C. rufocanus*, rongeur forestier, est l'hôte intermédiaire principal et où les rongeurs prairiaux sont absents, partout ailleurs ce sont les campagnols prairiaux qui semblent être les principaux hôtes intermédiaires impliqués dans la transmission d'*E. multilocularis*. Des études sont à mener dans différentes régions d'Europe pour déterminer si des espèces de rongeurs non prairiaux peuvent permettre le maintien du cycle.

De telles relations ne peuvent être mises en évidence que par des suivis à long terme. On peut également se demander quelle est l'importance relative des campagnols agrestes dans le genre *Microtus*. Puisque la détermination de l'espèce est très difficile lors de l'étude du régime alimentaire (les poils ne permettent pas la distinction, et le nombre de mâchoires retrouvées est minime), et que les transects de collecte d'indices ne permettent pas de distinguer clairement les deux espèces, la seule possibilité pour déterminer les prévalences respectives chez *M. agrestis* et *M. arvalis* en milieu naturel serait le piégeage intensif ciblé sur ces deux espèces, avec cependant la difficulté majeure de parvenir à collecter suffisamment d'animaux pour mettre en évidence les très faibles prévalences (généralement inférieures à 1%).

Le fait que les deux génotypes identifiés dans les Ardennes aient déjà été identifiés dans d'autres régions de France, ainsi qu'en Pologne, Slovaquie, Autriche, Suisse et Allemagne (Knapp, com. pers.) en zone d'endémie historique, vient renforcer le débat sur la détection du parasite dans des régions où il semblait jusque-là absent : correspond-t-elle à une véritable avancée de l'aire de distribution, à un intérêt nouveau pour la recherche de ce

parasite et/ou aux progrès des méthodes de détection (PCR, coprotest ELISA) facilitant le dépistage du parasite, ou encore, à une augmentation de prévalence dans les populations au-dessus d'un seuil permettant la détection du parasite (Romig et al., 1999a) ? L'étude du polymorphisme génétique du parasite pourrait permettre de répondre en partie à cette question, en permettant de retracer l'avancée du parasite en Europe, mais également au sein de zones de nouvelles endémies, en procédant de la même manière que dans les Ardennes par typage des vers en association avec l'analyse spatiale de leur répartition.

De plus, l'étude des génotypes en lien avec les charges parasitaires a montré que l'on pouvait identifier plusieurs génotypes parasitaires dans les populations de renard, sans que l'on puisse toutefois leur associer un niveau de contamination particulier. La recherche des génotypes parasitaires couplée aux données de terrain est à poursuivre, pour déterminer s'il existe chez *E. multilocularis* des génotypes plus performants que d'autres en termes de transmission. Si de tels génotypes parviennent à être identifiés, dans le cadre d'études expérimentales, l'accent devra être mis sur la recherche des mécanismes responsables : production de protoscolex ou d'œufs plus élevée avec ces génotypes qu'avec d'autres, meilleure survie des œufs dans l'environnement extérieur, réponse immunitaire diminuée chez les hôtes, etc.

Deux hypothèses majeures ont pu être avancées pour expliquer la forte hétérogénéité des prévalences et des charges parasitaires à une étendue régionale et un grain local. Le lien entre la structure du paysage et la prévalence a été souligné et constitue une contribution originale de notre étude. En effet, peu de données sont actuellement disponibles sur les conditions environnementales expliquant l'infection des renards à un grain correspondant à leur domaine d'activité. Les caractéristiques des milieux fréquentés par les renards agissent à deux niveaux : elles font varier la probabilité de consommer des rongeurs hôtes intermédiaires, et elles conditionnent la survie des œufs si l'humidité du sol diffère d'un type de milieu à l'autre. Une caractérisation plus fine de l'environnement (humidité des sols, zones pâturées, jachères, zones fréquentées par l'homme, etc.) autour des renards infestés, du même type que celle proposée par Staubach et al. (2001), pourrait être envisagée, en ayant recours à la télédétection et au traitement de données environnementales (typologie des habitats, géologie, hydrologie...). Elle pourrait s'inspirer notamment de la démarche entreprise en Chine dans le canton de Zhang (province du Sichuan) sur l'analyse de la composition du

paysage dans les 2 km entourant les villages où les prévalences humaines d'échinococcose alvéolaire sont élevées (Graham et al., 2004; Danson et al., 2004). Ce type d'étude pourrait permettre, à terme, de déterminer la proximité des paysages ou des habitats à risque par rapport aux zones anthropiques ou aux sites utilisés fréquemment par les populations humaines pour la cueillette ou les activités de loisirs et, ainsi, de permettre de diminuer le risque de contamination humaine en informant les populations sur la présence de zones à risques.

L'approche locale a été très peu explorée dans le cadre de l'étude de la transmission d'*Echinococcus multilocularis*, et beaucoup de points restent à éclaircir. Nous avons pu constater que les possibilités d'ouverture du filtre de rencontre pouvaient varier fortement en fonction du milieu considéré, avec des densités relatives de fèces et de rongeurs plus élevées dans les lisières de végétation moyenne, ce qui pourrait favoriser la transmission du cycle et la contamination humaine. Comme des connaissances sur les différences de conservation des fèces dans l'environnement en fonction du type de milieu et des conditions climatiques s'avèrent nécessaires pour évaluer l'importance des biais dans l'estimation de l'abondance relative des fèces par milieux, des expériences *in situ* sur la durée de persistance de fèces provenant de renards d'élevage et donc de régime alimentaire connu, en fonction des conditions climatiques (pluviométrie moyenne et maximale, températures moyennes, minimales, et maximales, etc) sont à envisager.

De plus, notre travail a porté essentiellement sur les possibilités de contacts entre les oeufs et l'hôte intermédiaire. Cependant, pour montrer que le cycle parasitaire est dépendant de milieux particuliers, il conviendrait d'inclure dans l'étude la contamination environnementale réelle (nombre d'œufs déposés) et les prévalences chez les rongeurs (avec cependant le problème évoqué précédemment de détection du parasite dans des populations où la prévalence est très faible). Le niveau de contamination des milieux pourrait, par la même méthode de collecte de fèces et de test ELISA que celle employée présentement, être estimé en travaillant dans des secteurs préalablement identifiés comme étant potentiellement très contaminés (notamment en réalisant une analyse spatiale des charges et prévalences). De plus, l'utilisation des techniques biomoléculaires précédemment citées (utilisation de la cible microsatellitaire EmsB) appliquée à l'identification non plus des génotypes des vers, mais cette fois, directement à celle des œufs présents dans l'environnement, pourrait, de plus, permettre d'estimer le potentiel contaminant de chaque génotype.

Le piégeage des rongeurs prairiaux pour en permettre le diagnostic, en complément de transects d'estimation de densités de ces mêmes rongeurs et en association avec la détection du parasite dans les fèces ou dans le sol, pourrait permettre de quantifier la transmission parasitaire et d'estimer son efficacité en fonction du milieu considéré. En effet, tout l'intérêt réside ici dans la prévention de la maladie humaine, d'autant plus si certains milieux s'avèrent plus « à risque » que d'autres, comme cela semble être le cas pour les lisières de végétation moyenne. Il est nécessaire d'examiner la situation dans d'autres régions, et de voir l'impact de la variation de paramètres tels que la densité de renards, les pratiques agricoles, le climat, etc., sur la transmission et la notion de milieu à risque.

Enfin, comme le dépôt des fèces dans les différents milieux et la consommation des hôtes intermédiaires contaminés sont dépendants du comportement des renards, davantage d'efforts devraient être consacrés à bien cerner ce comportement. Il faut bien souligner que, de part l'immobilité des oeufs dans l'environnement et la faible mobilité des rongeurs prairiaux (de l'ordre de quelques centaines de mètres, le plus souvent quelques dizaines, Spitz, 1977; Airoidi, 1978), il est nécessaire, pour qu'un renard sain se contamine, qu'il vienne chasser à proximité d'un emplacement où un renard contaminé a déféqué. Ainsi, l'utilisation de l'espace par les renards, qui a déjà été soulignée à une fenêtre d'observation supérieure (fréquentation de milieux propices aux rongeurs hôtes intermédiaires), apparaît ici comme un élément clé dans la compréhension de la perpétuation du cycle d'*E. multilocularis*. Cet aspect éco-éthologique est pourtant largement ignoré dans les études épidémiologiques de ce parasite. Or l'intensité du chevauchement des domaines vitaux des renards, plus connu en milieu urbain, mais également démontré en milieu rural (Pouille et al., 1994; Henry et al., 2005) pourrait agir sur la probabilité de prédation de rongeurs contaminés. Ainsi, il convient d'inclure cet aspect dans de futures études, notamment en cherchant à identifier le patron d'utilisation, pour la chasse et la défécation, de zones communes à plusieurs renards.

La reconnaissance individuelle des fèces de renards faiblement et fortement contaminés pourraient nous éclairer sur le rôle du comportement dans la contamination environnementale. Cependant, il est quasi impossible de savoir avec des moyens traditionnels où un renard donné dépose ses fèces. En effet, l'utilisation de marqueurs inclus dans l'alimentation des renards implique une consommation régulière et individualisée de cette nourriture; de plus le nombre de fèces marquées retrouvé est très faible (Pouille, 1987). Les

progrès constants dans le domaine de la génétique permettent à présent d'envisager l'utilisation de cet outil pour identifier le propriétaire de chaque fèces retrouvée sur le terrain, grâce à la recherche de marqueurs microsatellites dans les cellules épithéliales de renards présentes dans leurs fèces. Ce type d'études est déjà réalisée chez de nombreuses espèces pour en estimer les effectifs, par exemple chez le blaireau (*Meles meles*) en Angleterre (Wilson et al., 2003), l'outarde barbue (*Otis tarda*) à Morocco (Idaghour et al., 2003) ou encore le wombat commun (*Vombatus ursinus*), à Melbourne (Banks et al., 2002).

Ainsi, notre étude met en évidence l'importance, pour la compréhension des mécanismes liés à la transmission parasitaire: 1) d'études conduites en zones de nouvelle endémie, 2) de la détermination du rôle des génotypes parasites dans le cycle, 3) de l'intégration de données issues de différentes fenêtres d'observation, 4) de la prise en compte de l'influence du comportement des renards sur la contamination environnementale. Ces différents axes de recherche constituent autant de pistes prometteuses pour comprendre les mécanismes de transmission d'*Echinococcus multilocularis* et prévenir les risques de contamination.



## VII. BIBLIOGRAPHIE

- Afonso, E., Thulliez, P., Gilot-Fromont, E. (2006) Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*). *Int. J. Parasitol.*, 36, 1373-1382.
- Airoidi, J.P. (1978) Etude par capture et recapture d'une population de campagnols terrestres *Arvicola terrestris scherman* Shaw. *Terre et Vie*, 32, 3-45.
- Anderson, R.M., May, R.M. (1979) Population biology of infectious diseases : Part I. *Nature*, 280, 361-367.
- Artois, M., Fromont, E., Hars, J. (2003) La faune sauvage, indicateur possible du risque de maladie émergente? *Epidémiol. et santé anim.*, 44, 21-31.
- Banks, S.C., Piggott, M.P., Hansen, B.D., Robinson, N.A., Taylor, A.C. (2002) Wombat coprogenetics: enumerating a common wombat population by microsatellite analysis of faecal DNA. *Australian J. Zool.*, 50, 193-204.
- Barbault, R. (2000) *Ecologie générale. Structure et fonctionnement de la biosphère*. 5<sup>e</sup> édition. Dunod, Paris.
- Bart, J.M., Breyer, I., Gottstein, B., Romig, T., Piarroux, R. (2003) Development of molecular tools to explore genetic diversity in *Echinococcus multilocularis*. *Helminthologia*, 40, 117-121.
- Baudet, B., Sidibé, S. (2003) Infection à virus West Nile en Amérique du Nord. *Epidémiol. et santé anim.*, 44, 115-126.
- Bavia, M.E., Hale, L.F., Malone, J.B., Braud, D.H., Shane, S.M. (1999) Geographic information systems and the environmental risk of schistosomiasis in Bahia, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60 (4), 566-572.
- Boucher, J.M., Guislain, M.H., Penalba, C., Froment, G., Fauchart, J.P., Depaquit, J., Poulle, M.L., Ferté, H., Augot, D. (2005) L'échinococcose alvéolaire dans les Ardennes. Congrès de la Société Française de Parasitologie, Besançon, France.
- Budke, C.M., Jiamin, Q., Craig, P.S., Torgerson, P.R. (2005) Modeling the transmission of *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* in dogs for a high endemic region of the Tibetan plateau. *Int. J. Parasitol.*, 35, 163-170.
- Budke, C.M. (2006) Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerg. Inf. Dis.* 12 (2), 296-303.
- Bush, A.O., Fernández, J.C., Esch, G.W., Seed, J.R. (2001) *Parasitism. The diversity and ecology of animal parasites*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Butet, A., Leroux, A. (1994) Spatial and temporal density fluctuations in common vole populations in a marsh in western France. *Pol. ecol. Stud.*, 20, 137-146.



- Butet, A., Paillat, G., Delettre, Y. (2006) Factors driving small rodents assemblages from field boundaries in agricultural landscapes of western France. *Landscape Ecol.*, 21, 449-461.
- Capua, I., Alexander, D.J. (2002) Avian Influenza and human health. *Acta Trop.*, 83, 1-6.
- Casulli, A., Manfredi, M.T., La Rosa, G., Di Cerbo, A.R., Dinkel, A., Romig, T., Deplazes, P., Genchi, C., Pozio, E. (2005) *Echinococcus multilocularis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) of the Italian alpine region: is there a focus of autochthonous transmission? *Int. J. Parasitol.*, 35, 1079-1083.
- Cavallini, P. (1994) Faeces count as an index of fox abundance. *Acta Theriol.*, 39, 417-424.
- Cleaveland, S., Hess, G.R., Dobson, A.P., Laurenson, M.K., MacCallum, H.I., Roberts, M.G., Woodroffe, R. (2002) The role of pathogens in biological conservation. In: Hudson, P.J., Rizzoli, A., Grenfell, B.T., Heesterbeek, H., Dobson, A.P. (Eds.): *The ecology of wildlife diseases*. Oxford University Press, Oxford.
- Colwell, R. (1996) Global climate and infectious disease : the cholera paradigm. *Science*, 274 (5295), 2025-2031.
- Combes, C. (2001) *Interactions durables. Ecologie et évolution du parasitisme*. Masson, collection écologie, Paris.
- Cortinas, M.R., Guerra, M.A., Jones, C., Kitron, U. (2002) Detection, characterization, and prediction of tick-borne disease foci. *Int. J. Med. Microbiol.*, 291(S33), 11-20.
- Craig, A., Scherf, A. (2001) Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 115, 129-143.
- Craig, P. (2003) *Echinococcus multilocularis*. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 16, 437-444.
- Criscione, C.D., Poulin, R., Blouin, M.S. (2005) Molecular ecology of parasites : elucidating ecological and microevolutionary processes. *Mol. Ecol.*, 14, 2247-2257.
- Danson, F.M., Craig, P.S., Man, W., Shi, D., Giraudoux, P. (2004) Landscape dynamics and risk modeling of human alveolar echinococcosis. *Photogramm. Eng. Remote Sens.*, 70, 359-366.
- Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D. (2000) Emerging infectious diseases of wildlife. Threats to biodiversity and human health. *Science*, 287, 443-449.
- Delattre, P., Damange, J.M., Pascal, M., Halbert, M. (1988) Rôle de la prédation et influence de la structure du paysage agricole sur le développement des cycles d'abondance des populations d' *Arvicola terrestris scherman*. *Bull. OEPP*, 18, 415-422.
- Delattre, P., Giraudoux, P., Baudry, J., Quéré, J.P., Fichet, E. (1996) Effect of landscape structure on Common Vole (*Microtus arvalis*) distribution and abundance at several space scales. *Landscape Ecol.*, 11, 279-288.

- Delattre, P., de Sousa, B., Fichet-Calvet, E., Quéré, J.P., Giraudoux, P. (1999) Vole outbreaks in a landscape context: evidence from a six year study of *Microtus arvalis*. *Landscape Ecol.*, 14, 401-412.
- Depaquit, J., Gallego, A., Usseglio, F., Liance, M., Favriel, J.M. (1998) L'échinococcose alvéolaire dans le département français des Ardennes: cas isolés ou nouveau foyer? *Parasite*, 5, 285-287.
- Dobson, A., Foufopoulos, J. (2001) Emerging infectious pathogens of wildlife. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 356, 1001-1012.
- Eckert, J., Conraths, F.J., Tackmann, K. (2000) Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? *Int. J. Parasitol.*, 30, 1283-1294.
- Eckert, J., Rausch, R.L., Gemmell, M.A., Giraudoux, P., Kamiya, M., Liu, F.-J., Schantz, P.M., Romig, T. (2001a) Epidemiology of *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus vogeli* and *Echinococcus oligarthus*. In: Eckert, J., Gemmell, M.A., Meslin, F.X., Pawloski, Z.S. (Eds), *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A public health problem of global concern*. OIE/WHO, Paris, pp.164-182.
- Eckert, J., Schantz, P.M., Gasser, R.B., Torgerson, P.R., Bessonov, A.S., Movsessian, S.O., Thakur, A., Grimm, F., Nikogossian, M.A. (2001b) Geographic distribution and prevalence. In: Eckert, J., Gemmell, M.A., Meslin, F.X., Pawloski, Z.S. (Eds.), *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A public health problem of global concern*. OIE/WHO, Paris, pp.100-142.
- Eckert, J., Deplazes, P. (2004) Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17, 107-135.
- Euzet, C., Combes, B. (1980) Les problèmes de l'espèce chez les animaux parasites. *Mémoires de la Société Zoologique de France*, 40, 239-285.
- Fischer, C., Reperant, L.A., Weber, J.M., Hegglin, D., Deplazes, P. (2005) *Echinococcus multilocularis* infections of rural, residential and urban foxes (*Vulpes vulpes*) in the canton of Geneva, Switzerland. *Parasite*, 12, 339-346.
- Funk, S.M., Fiorello, C.V., Cleaveland, S., Gompper, M.E. (2001) The role of disease in carnivore ecology and conservation. In: Gittleman, J.L., Funk, S.M., Macdonald, D.W., Kayne, R.K., 2001. *Carnivore Conservation*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Giraudoux, P., Delattre, P., Quéré, J.P., Damange, J.P. (1994) Structure and kinetics of rodent populations, in a region under agricultural land abandonment. *Acta Oecol.*, 15, 385-400.
- Giraudoux, P., Delattre, P., Habert, M., Quéré, J.P., Deblay, S., Defaut, R., Duhamel, R., Moissenet, M.F., Salvi, D., Truchetet, D. (1997) Population dynamics of fossorial water vole (*Arvicola terrestris* Scherman): a land use and landscape perspective. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 66, 47-60.
- Giraudoux, P., Delattre, P., Takahashi, K., Raoul, F., Quéré, J.P., Craig, P., Vuitton, D. (2002) Transmission ecology of *Echinococcus multilocularis* in wildlife: what can be learned from

comparative studies and multiscale approaches? In: Craig, P.S., Pawlowski, Z.S. (Eds.), *Cestode Zoonoses: Echinococcosis and Cysticercosis*. IOS Press, Amsterdam, pp.251-266.

Giraudoux, P., Craig, P.S., Delattre, P., Bao, G., Bartholomot, B., Harraga, S., Quéré, J.P., Raoul, F., Wang, Y., Shi, D., Vuitton, D.A. (2003) Interactions between landscape changes and host communities can regulate *Echinococcus multilocularis* transmission. *Parasitology*, 127, S1-S11.

Giraudoux, P., Pleydell, D., Raoul, F., Quéré, J.-P., Wang, Q., Yang, Y., Vuitton, D.A., Qiu, J., Yang, W., Craig, P.S. (2006) Transmission ecology of *Echinococcus multilocularis*: what are the ranges of parasite stability among various host communities in China? *Parasitology Int.*, 55, S237-S246.

Golstman, M., Krechenkova, E.P., Macdonald, D.W. (1996) The Medny arctic foxes : treating a population imperilled by disease. *Oryx*, 30 (4), 251-258.

Graham, A.J., Danson, F.M., Giraudoux, P., Craig, P.S. (2004) Ecological epidemiology: landscape metrics and human alveolar echinococcosis. *Acta Trop.*, 91, 267-278.

Grenfell, B.T., Amos, W., Arneberg, P., Bjørnstad, O.N., Greenman, J.V., Harwood, J., Lanfranchi, P., McLean, A.R., Norman, R.A., Read, A.F., Skorpung, A. (2001). Visions for future research in wildlife epidemiology. In: Hudson, P.J., Rizzoli, A., Grenfell, B.T., Heesterbeek, H., Dobson, A.P. (Eds.): *The ecology of wildlife diseases*. Oxford University Press, Oxford

Gunn, G.J., Saatkamp, H.W., Humphry, R.W., Stott, A.W. (2005) Assessing economic and social pressure for the control of bovine viral diarrhoea virus. *Prev. Vet. Med.*, 72, 149-162.

Hansen, F., Tackmann, K., Jeltsch, F., Wissel, C., Thulke, H.H. (2003) Controlling *Echinococcus multilocularis* - Ecological implications of field trials. *Prev. Vet. Med.*, 60, 91-105.

Hansen, F., Jeltsch, F., Tackman, K., Staubach, C., Thulke, H.H. (2004) Processes leading to a spatial aggregation of *Echinococcus multilocularis* in its natural intermediate host *Microtus arvalis*. *Int. J. Parasitol.*, 34, 37-44.

Hardy, O.J., Charbonnel, N., Fréville, H., Heuertz, M. (2003) Microsatellite Allele Sizes: A Simple Test to Assess Their Significance on Genetic Differentiation. *Genetics*, 163, 1467-1482.

Hemami, M.R., Dolman, P.M. (2005) The disappearance of muntjac (*Muntiacus reevesi*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) pett groups in a pine forest of lowland England. *Eur. J. Wildl. Res.*, 51, 19-24.

Henry, C., Poulle, M.L., Roeder, J.-J. (2005) Effect of sex and female reproductive status on seasonal home range size and stability in rural red foxes (*Vulpes vulpes*). *Ecoscience*, 12, 2002-2009.

Henttonen, H., Fuglei, E., Gower, C.N., Gower, C.N., Haukisalmi, V., Ims, R.A., Niemimaa, J., Yoccoz, N.G. (2001) *Echinococcus multilocularis* on Svalbard: introduction of an

intermediate host has enabled the local life-cycle. *Parasitology*, 123, 547-552.

Hess, G.R., Randolph, S.E., Arneberg, P., Chemini, C., Furlanello, C., Harwood, J., Roberts, M.G., Swinton, J. (2002) Spatial aspects of disease dynamics. In: Hudson, P.J., Rizzoli, A., Grenfell, B.T., Heesterbeek, H., Dobson, A.P. (Eds.): *The ecology of wildlife diseases*. Oxford University Press, Oxford.

Hobbs, N.T. (2003) Challenges and opportunities in integrating ecological knowledges across scales. *Forest Ecol. Manage.*, 181, 223-238.

Hofer, S., Gloor, S., Muller, U., Mathis, A., Hegglin, D., Deplazes, P. (2000) High prevalence of *Echinococcus multilocularis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) and voles (*Arvicola terrestris*) in the city of Zurich, Switzerland. *Parasitology*, 120, 135-142.

Igadhoud, Y., Broderick, D., Korrida, A. (2003) Faeces as a source of DNA for molecular studies in a threatened population of great bustards. *Conserv. Genet.*, 4, 789-792.

Ishikawa, H., Ohga, Y., Doi, R. (2003) A model for the transmission of *Echinococcus multilocularis* in Hokkaido, Japan. *Parasitol. Res.*, 91, 444-451.

Ito, A., Romig, T., Takahashi, K. (2003) Perspective on control options for *Echinococcus multilocularis* with particular reference to Japan. *Parasitology*, 127, 5159-5172.

Jenkins, D.J., Romig, T., Thompson, R.C.A. (2005) Emergence, re-emergence of *Echinococcus spp.* - a global update. *Int. J. Parasitol.*, 35, 1205-1219.

Keeling, M.J. (2005) Models of foot-and-mouth disease. *Proc. R. Soc. B*, 272, 1195-1202.

Kephart, J.O., White, S.R. (1991) Directed-Graph Epidemiological Models of Computer Viruses. *Proceedings of the 1991 IEEE Computer Society Symposium on Research in Security and Privacy*, Oakland, California, May 20-22, 1991, pp. 343-359.

Kern, P., Ammon, A., Kron, M., Sinn, G., Sander, S., Petersen, L.R., Gaus, W., Kern, P. (2004) Risk factors for alveolar echinococcosis in humans. *Emerg. Inf. Dis.*, 10, 2088-2093.

Kern, P., Bardonnnet, K., Renner, E., Auer, H., Pawlowski, Z., Ammann, R.W., Vuitton, D.A., Kern, P., and the European Echinococcosis Registry (2003) European Echinococcosis Registry: human alveolar echinococcosis, Europe, 1982-2000. *Emerg. Infect. Dis.*, 9, 343-349.

Koella, J.C., Antia, R. (2003) Epidemiological models for the spread of anti-malarial resistance. *Malaria J.*, 2: 3.

Laurenson, K., Sillero-Zubiri, C., Thompson, H., Shiferaw, F., Thirgood, S., Malcolm, J. (1998) Disease as a threat to endangered species: ethiopian wolves, domestic dogs and canine pathogens. *Animal Conserv.*, 1, 273-280.

Lidicker, W.Z. (2000) A food web/landscape interaction model for *Microtine* density cycles. *Oikos*, 91, 432-445.

- Losson, B., Mignon, B., Brochier, B., Bauduin, B., Pastoret, P.P. (1997) Infestation du renard roux (*Vulpes vulpes*) par *Echinococcus multilocularis* dans la province de Luxembourg (Belgique): résultats de l'enquête effectuée entre 1993 et 1995. *Ann. Méd. Vét.*, 141, 149-153.
- Losson, B., Kervyn, T., Detry, J., Pastoret, P.P., Mignon, B., Brochier, B. (2003) Prevalence of *Echinococcus multilocularis* in the red fox (*Vulpes vulpes*) in southern Belgium. *Vet. Parasitol.*, 117, 23-28.
- Macpherson, C.N.L. (2005) Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. *Int. J. Parasitol.*, 35, 1319-1331.
- Martínek, K., Kolářová, L., Červený, J. (2001) *Echinococcus multilocularis* in carnivores from the Klatovy district of the Czech Republic. *J. Helminth.*, 75, 61-66.
- May, R.M., Anderson, R.M. (1979) Population biology of infectious diseases : Part II. *Nature*, 280, 455-461.
- Maynard-Smith, J., Smith, N.H., O'Rourke, M., Spratt, B.G. (1993) How clonal are bacteria ? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 4384-4388.
- Miterpaková, M., Dubinský, P., Reiterová, K., Machková, N., Várady, M., Šnábel, V. (2003) Spatial and temporal analysis of the *Echinococcus multilocularis* occurrence in the Slovak Republic. *Helminthologia*, 40, 217-226.
- Naugle, D.E., Aldridge, C.L., Walker, B.T., Cornish, T. E., Moynahan, B.J., Holloran, M.J., Brown, K., Johnson, G.D., Schmidtman, E.T., Mayer, R.T., Kato, C.Y., Matchett, M. R., Christiansen, T.J., Cook, W. E., Creekmore, T., Falise, R.D., Rinkes, E.T., Boyce, M.S. (2004) West Nile virus: pending crisis for greater sage-grouse. *Ecol. Letters*, 7 (8), 704-713.
- Nchanji, A.C., Plumtre, A.J. (2001) Seasonality in elephant dung decay and implications for censuring and population monitoring in southwestern Cameroon. *Afric. J. Ecol.*, 39, 24-32.
- Patz, J.A., Graczyk, T.K., Geller, N., Vittor, A.Y. (2000). Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int. J. Parasitol.*, 30, 1395-1405.
- Patz, J.A., Daszak, P., Tabor, G.M., Aguirre, A.A., Pearl, M., Epstein, J., Wolfe, N.D., Kilpatrick, A.M., Foutopoulos, J., Molyneux, D., Bradley, D.J., Members Of The Working Group on Land Use (2004) Unhealthy landscapes: policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. *Environ. Health Perspect.*, 112, 1092-1098.
- Pawłowski, Z.S., Eckert, J., Vuitton, D.A., Ammann, R.W., Kern, P., Craig, P.S., Dar, K.F., De Rosa, F., Filice, C., Gottstein, B., Grimm, F., Macpherson, C.N.L., Sato, N., Todorov, T., Uchino, J., Von Sinner, W., Wen, H. (2001) Echinococcosis in humans: clinical aspects, diagnostic and treatment. In: Eckert, J., Gemmell, M.A., Meslin, F.X., Pawłowski, Z.S. (Eds.), *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A public health problem of global concern*. OIE/WHO, Paris, pp.20-71.
- Piarroux, M., Bresson-Hadni, S., Capek, I., Knapp, J., Watelet, J., Dumortier, J., Abergel, A., Minello, A., Gérard, A., Beytout, J., Piarroux, R., Kantelop, B., Delabrousse, E., Vaillant, V.,

Vuitton, D.A. pour le réseau FrancEchino (2006) Surveillance de l'échinococcose alvéolaire en France: bilan de cinq années d'enregistrement, 2001-2005. *BEH*, n°27-28.

Poulle, M.L. (1987) Contribution à l'étude du mode de fréquentation des milieux par le renard roux (*Vulpes vulpes*) en fonction de la disponibilité de ces milieux en campagnols des champs (*Microtus arvalis*). Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies, Université Louis Pasteur, Strasbourg, 48pp.

Poulle, M.L., Artois, M., Roeder, J.J. (1994) Dynamics of spatial relationships among members of a fox group (*Vulpes vulpes* Linneaus). *J. Zool. Lond.*, 233, 93-106.

Rachowicz, L.J., Hero, J.M., Alford, R.A., Taylor, J., Morgan, J.A.T., Vredenburg, V.T., Collins, J.P., Briggs, C.J. (2005) The novel and emerging pathogen hypotheses: competing explanations for the origin of emerging infectious diseases of wildlife. *Conserv. Biol.*, 19 (5), 1441-1448.

Randolph, S.E. (2001) The shifting landscape of tick-borne zoonoses : tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 356, 1045-1056.

Raoul, F. (2001) *Ecologie de la transmission d'Echinococcus multilocularis chez le renard dans l'Est de la France: dépendance au paysage et à la relation proie-prédateur ?* Thèse de l'Université de Franche-Comté, 164pp.

Raoul, F., Nonaka, N., Piarroux, R., Vuitton, D.A., Giraudoux, P. (2001) Assessment of the epidemiological status of *Echinococcus multilocularis* in foxes in France using ELISA coprotests on fox faeces collected in the field. *Int. J. Parasitol.*, 31, 1579-1588.

Raoul, F., Michelat, D., Ordinaire, M., Decote, Y., Aubert, M., Delattre, P., Deplazes, P., Giraudoux, P. (2003) *Echinococcus multilocularis*: secondary poisoning of fox population during a vole outbreak reduces environmental contamination in a high endemicity area. *Int. J. Parasitol.*, 33, 945-954.

Raoul, F., Quéré, J.P., Rieffel, D., Bernard, N., Takahashi, K., Scheifler, R., Wang, Q., Qiu, J., Yang, W., Craig, P.S., Ito, A., Giraudoux P. (2006) Distribution of small mammals in a pastoral landscape of the Tibetan plateaus (Western Sichuan, China) and relationship with grazing practices. *Mammalia*, in press.

Rausch, R.L. (1995) Life-cycle patterns and geographic distribution of *Echinococcus* species. In: Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J. (Eds.), *Echinococcus and hydatid disease*. CAB International, Wallingford, pp.88-134.

Reiterová, K., Dziemian, E., Miterpáková, M., Antolová, D., Kotodziej-Sobocinska, M., Machnicka, B., Dubinsky, P. (2006) Occurrence of *Echinococcus multilocularis* in red foxes from the Carpathian regions of Slovakia and Poland. *Acta Parasitol.*, 51, 107-110.

Richards, D.T., Harris, S., Lewis, J.W. (1995) Epidemiological studies on intestinal helminth parasites of rural and urban red foxes (*Vulpes vulpes*) in the United Kingdom. *Vet. Parasitol.*, 59, 39-51.

- Rivera, I.N.G., Chun, J., Huq, A., Sack, R.B., Colwell, R.R. (2001) Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 2421-2429.
- Roberts, M.G., Aubert, M.F.A. (1995) A model for the control of *Echinococcus multilocularis* in France. *Vet. Parasitol.*, 56, 67-74.
- Roberts, M.G., Lawson, J.R., Gemmel, M.A. (1986) Population dynamics in echinococcosis and cysticercosis: mathematical model of the life-cycle of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 92, 621-641.
- Roberts, M.G., Lawson, J.R., Gemmel, M.A. (1987) Population dynamics in echinococcosis and cysticercosis: mathematical model of the life-cycles of *Taenia hydatigena* and *T.ovis*. *Parasitology*, 94, 181-197.
- Romig, T., Bilger, B., Dinkel, A., Merli, M., MacKenstedt, U. (1999a) *Echinococcus multilocularis* in animal hosts: a new data from western Europe. *Helminthologia*, 36, 185-191.
- Romig, T., Kratzer, W., Kimmig, P., Frosch, M., Gaus, W., Flegel, W.A., Gottstein, B., Lucius, R., Beckh, K., Kern, P. (1999b) An epidemiologic survey of human alveolar echinococcosis in southwestern Germany. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61, 566-573.
- Romig, T., Thoma, D., Weible, A.K. (2006) *Echinococcus multilocularis* - a zoonosis of anthropogenic environments? *J. Helminth.*, 80, 207-212.
- Saitoh, T., Takahashi, K. (1998) The role of vole populations in prevalence of the parasite (*Echinococcus multilocularis*) in foxes. *Res. Popul. Ecol.*, 40, 97-105.
- Sanchez, D.M., Krausman, P.R., Livingston, T.R., Gipson, P.S. (2004) Persistence of carnivore scat in the Sonoran Desert. *Wildl. Soc. Bull.*, 32, 366-372.
- Savey, M., Dufour, B. (2004) Diversité des zoonoses : définitions et conséquences pour la surveillance et la lutte. *Epidémiol. et santé anim.*, 46, 1-16.
- Skorping, A. (1982) *Elaphostrongylus rangiferi*: influence of temperature, substrate, and larval age on the infection rate in the intermediate snail host, *Arianta arbustorum*. *Exp. Parasitol.*, 54, 222-228.
- Smith, G.C., Gangadharan, B., Taylor, Z., Laurenson, M.K., Bradshaw, H., Hide, G., Hughes, J.M., Dinkel, A., Romig, T., Craig, P.S. (2003) Prevalence of zoonotic important parasites in the red fox (*Vulpes vulpes*) in Great Britain. *Vet. Parasitol.*, 118, 133-142.
- Smith, G.C., Harris, S. (1991) Rabies in urban foxes (*Vulpes vulpes*) in Britain: the use of a spatial stochastic simulation model to examine the pattern of spread and evaluate the efficacy of different control regimes. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 334, 459-479.
- Smith, G.C., Wilkinson, D. (2003) Modeling control of rabies outbreaks in red fox populations to evaluate culling, vaccination, and vaccination combined with fertility control. *J. Wildl. Dis.*, 39, 278-286.
- Spitz, F. (1977) Le campagnol des champs (*Microtus arvalis* (Pallas)) en Europe. *Bull. OEPP*,

7, 165-175.

Sréter, T., Széll, Z., Egyed, Z., Varga, I. (2003) *Echinococcus multilocularis*: an emerging pathogen in Hungary and central eastern Europe? *Emerg. Infect. Dis.*, 9, 384-386.

Sréter, T., Széll, Z., Sréter-Lancz, Z., Varga, I. (2004) *Echinococcus multilocularis* in Hungary. *Emerg. Infect. Dis.*, 10, 1344-1346.

Staubach, C., Thulke, H.H., Tackmann, K., Hugh-Jones, M., Conraths, F.J. (2001) Geographic information system-aided analysis of factors associated with the spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* infections of foxes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65, 943-948.

Su, C., Evans, D., Cole, R.H., Kissinger, J.C., Ajioka, J.W., Sibley, L.D. (2003) Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science*, 299, 414-416.

Taylor, L.H., Latham, S.M., Woolhouse, E.J. (2001) Risk factors for human disease emergence. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 356, 983-989.

Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M. (2000) *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.*, 30,1217-1258.

Thoma, B., Thiry, E. (2003) Qu'est-ce qu'une maladie émergente? *Epidémiol. et santé anim.*, 44, 1-11.

Thompson, R.C.A. (1995) Biology and systematics of *Echinococcus*. In: Eckert, J., Gemmell, M.A., Meslin, F.X., Pawloski, Z.S. (Eds.), *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A public health problem of global concern*. OIE/WHO, Paris, pp.1-50.

Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Ayala, F. (1990) A clonal theory of parasitic protozoa: The population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 2414-2418.

Torgerson, P.R. (2003) The use of mathematical models to simulate control options for echinococcosis. *Acta Trop.*, 85, 211-221.

Vallat, B. (2004) Zoonoses et agents pathogènes émergents importants pour la santé publique. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 23 (2), 423-427.

Van Der Giessen, J.W.B., Rombout, Y.B., Franchimont, J.H., Limper, L.P., Homan, W.L., (1999) Detection of *Echinococcus multilocularis* in foxes in The Netherlands. *Vet. Parasitol.*, 82, 49-57.

Van Der Giessen, J.B.W., Rombout, Y., Teunis, P. (2004) Base line prevalence and spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* in a newly recognized endemic area in the Netherlands. *Vet. Parasitol.*, 119, 27-35.

Veit, P., Bilger, B., Schad, V., Shafer, J., Frank, W., Lucius, R. (1995) Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasitology*, 110, 79-86.



- Vervaeke, M., Dorny, P., Vercammen, F., Geerts, S., Brandt, J., Van Den Berge, K., Verhagen, R. (2003) *Echinococcus multilocularis* (Cestoda, Taeniidae) in Red foxes (*Vulpes vulpes*) in northern Belgium. *Vet. Parasitol.*, 115, 257-263.
- Viel, J.F., Giraudoux, P., Abrial, V., Bresson-Hadni, S. (1999) Water vole (*Arvicola terrestris* scherman) density as risk factor for human alveolar echinococcosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61, 559-565.
- Vijayanand, P., Wilkins, E., Woodhead, M. (2004) Severe acute respiratory syndrome (SARS): a review. *Clinical Med.*, 4, 152-160.
- Vuitton, D.A., Zhou, H., Bresson-Hadni, S., Wang, Q., Piarroux, R., Raoul, F., Giraudoux, P. (2003) Epidemiology of alveolar echinococcosis with particular reference to China and Europe. *Parasitology*, 127, S87-S107.
- Wang, T.P., Shrivastava, J., Johansen, M.V., Zhang, S.Q., Wang, F.F., Webster, J.P. (2006a) Does multiple hosts mean multiple parasites? Population genetic structure of *Schistosoma japonicum* between definitive host species. *Int. J. Parasitol.*, 36(12), 1317-1325.
- Wang, Q., Vuitton, D.A., Xiao, Y., Raoul, F., Schantz, P., Budke C., Yang, W., Craig, P.S., Giraudoux, P. (2006b) Socio-economic and ecological correlates of alveolar echinococcosis emergence in Tibetan pastoralist communities. *Emerging Infectious Diseases*, in press.
- Weber, J.M., Aubry, S. (1993) Predation by foxes, *Vulpes vulpes*, on the fossorial form of the water vole, *Arvicola terrestris* scherman, in western Switzerland. *J. Zool. Lond.*, 229, 553-559.
- White, P.C.L., Harris, S. (1995) Bovine tuberculosis in badger (*Meles meles*) populations in southwest England: the use of a spatial stochastic simulation model to understand the dynamics of the disease. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 349, 391-413.
- WHO (2000) *World health report – 2000*. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- Williams, B., Warren, J., 2003. Effects of spatial distribution on the decomposition of sheep faeces in different vegetation types. *Agric., Ecosyst. Environ.*, 103, 237-243.
- Williams, J.A., Esch, G.W. (1991) Infra- and component community dynamics in the pulmonate snail, *Helisoma anceps*, with special emphasis on the hemiurid trematode, *Halipegus occidualis*. *J. Parasitol.*, 77, 246-253.
- Williams, B., Warren, J. (2003) Effects of spatial distribution on the decomposition of sheep faeces in different vegetation types. *Agric., Ecosyst. Environ.*, 103, 237-243.
- Wilson, G.J., Frantz, A.C., Pope, L.C., Roper, T.J., Burke, T.A., Cheeseman, C.L., Delahay, R.J. (2003) Estimation of badger abundance using faecal DNA typing. *J. Applied Ecol.*, 40, 658-666.
- Wilson, K., Bjørnstad, O.N., Dobson, A.P., Merler, S., Pogliayen, G., Randolph, S.E., Read, A.F., Skorping, A. (2002) Heterogeneities in macroparasite infections: patterns and processes. In: Hudson, P.J., Rizzoli, A., Grenfell, B.T., Heesterbeek, H., Dobson, A.P. (Eds.): *The ecology of wildlife diseases*. Oxford University Press, Oxford.

## Liste des figures

|  |     |
|--|-----|
| Représentation schématique de l'étendue et du grain .....  | 14  |
| Le concept de filtres (d'après Combes, 2001 et Raoul, 2001) .....  | 19  |
| Cycle d' <i>Echinococcus multilocularis</i> .....  | 22  |
| Distribution mondiale d' <i>Echinococcus multilocularis</i> en 1999 (Eckert et al., 2001) .....  | 24  |
| Facteurs influençant la transmission d' <i>Echinococcus multilocularis</i> en Europe de l'Ouest (d'après Giraudoux et al., 2003).....  | 26  |
| Distribution géographique approximative d' <i>E. multilocularis</i> en Europe centrale en 1990 et 1999 (d'après Eckert et al., 2000) .....   | 28  |
| Schématisation des différents niveaux de perception abordés au cours de la thèse .....   | 30  |
| Localisation des différents sites d'étude.....   | 58  |
| Densités relatives de <i>Microtus sp.</i> et <i>A. terrestris</i> estimées par la méthode indiciaire et fréquence relative d'apparition de ces rongeurs dans les fèces et estomacs, en mars, octobre et décembre 2004, et en mars et octobre 2005 .....  | 59  |
| Évolution saisonnière des densités relatives de rongeurs forestiers échantillonnés dans le sud-est des Ardennes d'octobre 2000 à octobre 2005 .....  | 59  |
| Electrophoregrams of EmsB loci, achieved with the automatic sequencer ABI Prism 3100™ .....  | 74  |
| Dendrogram realised with EmsB amplification data, by hierarchical cluster analysis (Euclidian distance, average link clustering method), with R software and pvclust package .....   | 75  |
| Location of foxes infected (white hexagons) and uninfected (black triangles) with <i>Echinococcus multilocularis</i> on the French Ardennes study area and isopleths of predictive prevalence across the study site (hatched lines with values from 0 to 1).....   | 95  |
| Location of 25 foxes, each with 5 to 10 worm genotyped .....   | 96  |
| Predictions of the best models for relative densities of <b>a</b> <i>Microtus sp.</i> (number of positive intervals/100 intervals); <b>b</b> <i>Arvicola terrestris</i> (number of positive intervals/100 intervals); <b>c</b> fox faeces Kilometric Abundance Index (KAI) (number of faeces found/100 intervals). ..... | 123 |
| Influence of faeces and intermediate host relative densities on the estimated meeting risk .....   | 124 |
| Synthèse des questions et résultats de l'étude (HD = hôte définitif (renard), HI = hôtes intermédiaires, <i>E.m.</i> = <i>Echinococcus multilocularis</i> ).....   | 129 |
| Caractéristiques du fonctionnement du cycle d' <i>E. multilocularis</i> dans des zones où plus de 50 % des renards sont porteurs du parasite (la taille des caractères est fonction de l'importance du facteur) .....  | 135 |
| Zonation du département des Ardennes en fonction des principales zones géographiques identifiables .....   | 137 |
| Schéma de l'emboîtement spatial des études régionales et locales .....   | 140 |

## Liste des tableaux

|   |     |
|---|-----|
| Sessions et milieux échantillonnés pour l'estimation des densités de rongeurs forestiers et prairiaux .   | 54  |
| Résultats des comptages aux phares de renards effectués dans le Sud-Est du département des Ardennes de 2002 à 2006. L: longueur totale de transects parcourue .....   | 55  |
| Prévalences d' <i>E. multilocularis</i> chez le renard roux dans le Sud-Est du département des Ardennes, en fonction du sexe, de la classe d'âge, de l'année et de la saison.....                                       | 55  |
| Comparaison des modèles décrivant le portage de <i>E. multilocularis</i> par les renards et les charges parasitaires par renard.....  | 56  |
| Répartition de la charge parasitaire (nombre de vers par individu) parmi les renards porteurs d' <i>E. multilocularis</i> .....   | 56  |
| Nombre d'apparitions des différentes catégories alimentaires dans les estomacs et des fèces de renards  | 57  |
| Primer sequences and characteristics of microsatellite loci in <i>E. multilocularis</i> .....   | 72  |
| Description and characteristics of the red fox panel and parasitic burden .....   | 72  |
| Comparison of results obtained with Applied Biosystems® (ABI) and Beckman Coulter™ apparatus. 73  |     |
| Mutations identified after sequencing of the ATPase 6 dehydrogenase gene (Gb R AB027557) realised on a single (for foxes harbouring one EmsB genotype) or two worms (for foxes harbouring the both EmsB genotypes)..... | 73  |
| Characteristics of the municipalities where foxes were tested for the presence of <i>Echinococcus multilocularis</i> (Em) in their intestines .....   | 97  |
| Model comparisons for modeling the spatial distribution of <i>E. multilocularis</i> prevalence in foxes .....   | 98  |
| Mean percentage ( $\pm$ sd) of forest and grassland in buffer zones of 600 m and 1000 m radius surrounding infected foxes (n = 42) and uninfected foxes (n = 39) .....  | 98  |
| Number of intervals walked and of fox faeces collected, relative rodent densities, and cumulative rainfall and mean temperature the month before transects, according to sampling session.....                          | 121 |
| Comparison of negative binomial models for <b>a</b> <i>Microtus sp.</i> ; <b>b</b> <i>Arvicola terrestris</i> ; <b>c</b> fox faeces.....  | 122 |

## RÉSUMÉ

### **Guislain M.-H. – Étude à différentes fenêtres de perception, des facteurs impliqués dans la transmission d'*Echinococcus multilocularis*, parasite responsable d'une maladie émergente : l'échinococcose alvéolaire**

L'échinococcose alvéolaire, qui peut être fatale si le diagnostic est tardif, est une zoonose émergente. Elle est due à un cestode, *Echinococcus multilocularis*, dont le cycle fait intervenir le renard roux, *Vulpes vulpes*, comme hôte définitif et les campagnols prairiaux (*Microtus arvalis* et *Arvicola terrestris*) comme hôtes intermédiaires. Relativement peu de données sont actuellement disponibles sur les facteurs écologiques qui peuvent moduler l'intensité de la transmission du parasite entre ses hôtes aux fenêtres d'observation régionales et locales. Dans ce contexte, nous avons conduit une étude du fonctionnement du cycle d'*Em* à différents niveaux de perception, dans le département français des Ardennes, considéré comme une région de nouvelle endémie. La prévalence vulpine, estimée à 53 % pourrait être expliquée par une densité relativement élevée de renards et une importante consommation de *M. arvalis* de leur part. A une étendue régionale (900 km<sup>2</sup>) et un grain local (1 km<sup>2</sup>), la prévalence vulpine et la distribution des charges parasitaires apparaissent très hétérogènes, avec un gradient croissant nord-sud très marqué. La majorité de la biomasse parasitaire est concentrée sur quelques individus et sur quelques kilomètres carrés. Les caractéristiques du paysage et les densités de rongeurs hôtes intermédiaires semblent influencer les prévalences vulpines. Enfin, à une étendue locale (90 km<sup>2</sup>) et un grain micro-local (1000 m<sup>2</sup>), les lisières semblent particulièrement favorables à la transmission parasitaire, puisque c'est dans ce milieu que coïncident des densités élevées de fèces de renards et de rongeurs et, donc, que les contacts entre œufs et hôtes intermédiaires sont les plus probables.

**Mots-clés :** *Echinococcus multilocularis*, *Vulpes vulpes*, *Microtus*, *Arvicola terrestris*, fèces, Ardennes, micro-habitat, transmission parasitaire

## ABSTRACT

### **Guislain M.-H. – Multiple range study of factors controlling the transmission of an emerging zoonotic agent, *Echinococcus multilocularis***

Alveolar echinococcosis, which can be lethal if diagnosed too late, is an emerging disease. This zoonosis is caused by the cestode *Echinococcus multilocularis*, which sylvatic cycle implies the red fox *Vulpes vulpes*, as definitive host, and the common and water voles *Microtus arvalis* and *Arvicola terrestris* as intermediate hosts. Human can be contaminated by ingestion of parasite eggs laid on vegetables or *via* direct contact with definitive hosts. A few data are currently available on ecological factors modulating parasitic transmission between their different hosts on regional and local perception ranges. We conducted a study on *E. multilocularis* cycle pattern on different perception ranges, in the french departement of the Ardennes, considered as a new endemic area. The prevalence of *E. multilocularis* in fox population reached 53%, which might be explained by a relatively high fox population density and an important consumption of *Microtus sp.* by the red fox. On a regional range (900 km<sup>2</sup>) and with a local grain (1 km<sup>2</sup>), the prevalence in red fox as well as individual worm burden distribution was very heterogeneous, with a strong gradient increasing from north to south. The majority of the parasitic biomass was harboured by a few red foxes within some square kilometres. Landscape characteristics and intermediate host densities seemed to influence *E. multilocularis* prevalence in red foxes. Finally, on a local range (90 km<sup>2</sup>) and with a micro-local grain (1000 m<sup>2</sup>), parasitic transmission seemed to occur more likely in edges, where red fox faeces and rodent densities were high.

**Key-words :** *Echinococcus multilocularis*, *Vulpes vulpes*, *Microtus*, *Arvicola terrestris*, faeces, Ardennes, micro-habitat, parasitic transmission