

THESE

Présentée à

L'Université de Franche-Comté
UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Franche-Comté
Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé
Ecole Doctorale « Homme, Environnement, Santé »

Par

Monsieur Stéphane MAILLARD

Né le 05 Août 1980 à Versailles (Yvelines)

Les apports de différentes séquences d'ADN polymorphes à l'étude de l'épidémiologie moléculaire et de la taxonomie du parasite *Echinococcus granulosus* sensu lato

Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie, UMR 6249 CNRS/UFC Chrono-Environnement
Centre collaborateur OMS pour la prévention et le traitement des échinococcoses humaines

Patrick GIRAUDOUX (Professeur, Université de Franche-Comté)
Henri DUMON (Professeur, Université de Marseille)
Michel BROSSARD (Professeur, Université de Neuchâtel)
Bruno GOTTSTEIN (Professeur, Université de Berne)
Renaud PIARROUX (Professeur, Université de Marseille)

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont entourées et soutenues durant mes quatre années de thèse. Pour sa réalisation, elle a bénéficié de nombreuses collaborations, tant au niveau scientifique qu'humain.

Mes premiers remerciements vont tout naturellement à mon directeur de thèse, le professeur Renaud Piarroux, ancien directeur du Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie de Besançon, pour m'avoir accepté au sein de son équipe et m'avoir permis de mener à bien ce travail. Ensuite, ma reconnaissance va à l'ensemble du personnel de ce laboratoire, à ceux des laboratoires bisontins de Bactériologie, de Biologie Cellulaire et Moléculaire, de Biologie Environnementale, sans oublier celui de l'Institut bernois de Parasitologie. Je remercie également l'Ecole Doctorale « Homme, Environnement, Santé » de Besançon ainsi que l'Ecole Pasteurienne d'Infectiologie de Paris pour tous les enseignements enrichissants auxquels j'ai pu assister. Enfin, je suis très sensible à l'honneur que me font les membres du jury en acceptant d'évaluer cette thèse.

A titre plus personnel, je remercie tout d'abord mes prédécesseurs, Jean-Mathieu Bart et Jenny Knapp, pour leur soutien et leurs conseils avisés. Parce qu'ils ont également beaucoup apporté à ce travail, je remercie aussi Bruno Gottstein, Patrick Giraudoux, Fabrice Poncet, Shumei Ma, Ivana Radonjic-Colovic, Mohammed Cherif Benchikhi-Elfegoun, Karen Haag, Vedat Sürekli, Loïs Rose et Julie Durel. Je remercie ensuite chaleureusement l'ensemble de mes collègues des Hauts-de-Chazal, pour tous ces bons moments partagés : Anne-Cécile Normand, Hamidou Kane, Mallory Vacheyrou, Didier Bonpangue, Bertrand Sudre, Martine Piarroux, Sandrine Roussel, Bénédicte Rognon, Stéphanie Morot-Bizot, Patrick Plésiat, Katy Jeannot, Catherine Llanes, Farid El Guarch, Didier Hocquet, Cédric Muller et Sophie Guenard.

Je souhaite également témoigner toute ma gratitude envers des personnes qui se sont toujours montrées présentes : mes parents. Ils m'ont permis de m'engager dans cette voie et m'ont assisté du mieux qu'ils pouvaient, tout au long de mes nombreuses années d'étude. Merci pour tout. Je dédicace ce travail à l'ensemble de ma famille.

J'adresse ensuite un énorme merci à Eric Labat, pour sa grande patience, son soutien et ses encouragements providentiels.

Enfin, je terminerai en saluant l'ensemble de mes amis et en les remerciant tout simplement pour leur présence.

Merci à tous,
Stéphane

SOMMAIRE

| | |
|---------------------------|----|
| SOMMAIRE | 4 |
| FIGURES | 8 |
| TABLEAUX | 10 |
| ENCADRES | 10 |
| PUBLICATIONS | 11 |
| ABREVIATIONS | 12 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| INTRODUCTION | 14 |
|---------------------------|-----------|

| | |
|---|----|
| 1. PRESENTATION GENERALE | 15 |
| 2. LE GENRE <i>ECHINOCOCCUS</i> | 19 |
| 2.1. Présentation | 19 |
| 2.2. Morphologie | 19 |
| 2.3. Cycle parasitaire | 23 |
| 3. LES ESPECES DU GENRE <i>ECHINOCOCCUS</i> | 25 |
| 3.1. <i>Echinococcus granulosus</i> sensu lato | 25 |
| 3.1.1. <i>Morphologie</i> | 25 |
| 3.1.2. <i>Cycle parasitaire</i> | 25 |
| 3.2. <i>Echinococcus multilocularis</i> | 28 |
| 3.2.1. <i>Morphologie</i> | 28 |
| 3.2.2. <i>Cycle parasitaire</i> | 29 |
| 3.3. <i>Echinococcus oligarthrus</i> | 30 |
| 3.3.1. <i>Morphologie</i> | 30 |
| 3.3.2. <i>Cycle parasitaire</i> | 30 |
| 3.4. <i>Echinococcus vogeli</i> | 30 |
| 3.4.1. <i>Morphologie</i> | 30 |
| 3.4.2. <i>Cycle parasitaire</i> | 30 |
| 3.5. <i>Echinococcus shiquicus</i> | 31 |
| 3.5.1. <i>Morphologie</i> | 31 |
| 3.5.2. <i>Cycle parasitaire</i> | 31 |
| 4. LES ECHINOCOCCOSES | 33 |
| 4.1. Echinococcose kystique | 33 |
| 4.1.1. <i>Description</i> | 33 |
| 4.1.2. <i>Distribution géographique</i> | 35 |
| 4.1.3. <i>Relations entre l'homme et les différents hôtes</i> | 35 |
| 4.1.4. <i>Impact socioéconomique</i> | 39 |
| 4.2. Echinococcose alvéolaire | 40 |

| | |
|---|----|
| 4.2.1. <i>Description</i> | 40 |
| 4.2.2. <i>Distribution géographique</i> | 40 |
| 4.3. Echinococcose polykystique / néotropicale | 41 |
| 4.3.1. <i>Description</i> | 41 |
| 4.3.2. <i>Distribution géographique</i> | 41 |
| 5. ETUDE DE LA VARIABILITE GENETIQUE D'E. GRANULOSUS SENSU LATO | 42 |
| 5.1. Introduction | 42 |
| 5.2. Les deux sources d'information génétique | 42 |
| 5.2.1. <i>Le génome mitochondrial</i> | 42 |
| 5.2.2. <i>Le génome nucléaire</i> | 45 |
| 5.3. Analyse du polymorphisme génétique | 46 |
| 5.3.1. <i>L'amplification de séquences d'ADN (PCR)</i> | 46 |
| 5.3.2. <i>Le séquençage</i> | 47 |
| 5.3.3. <i>L'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD)</i> | 48 |
| 5.3.4. <i>Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP)</i> | 48 |
| 5.3.5. <i>Polymorphisme de conformation des simples brins (SSCP)</i> | 49 |
| 5.3.6. <i>Analyse de séquences microsatellites</i> | 49 |
| 5.3.7. <i>Homoplasie et conséquences sur les analyses génétiques</i> | 51 |
| 6. VARIABILITE GENETIQUE D'E. GRANULOSUS SENSU LATO ET TAXONOMIE | 52 |
| 6.1. Pourquoi l'étudier ? | 52 |
| 6.2. Des souches | 53 |
| 6.3. ... aux espèces | 59 |
| 6.4. Reproduction | 59 |
| 7. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS | 60 |

| | |
|--|-----------|
| I- ETUDE DU FOYER NORD-AFRICAIN | 62 |
|--|-----------|

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCTION | 63 |
| 2. DESCRIPTION DE L'ETUDE | 64 |
| 3. PUBLICATION | 64 |
| Publication 1 : Maillard, S., M. C. Benchikh-Elfegoun, J. Knapp, J. M. Bart, P. Koskei, B. Gottstein and R. Piarroux (2007). "Taxonomic position and geographical distribution of the common sheep G1 and camel G6 strains of <i>Echinococcus granulosus</i> in three African countries." <i>Parasitol Res</i> 100(3): 495-503. | 64 |
| 4. DISCUSSION | 75 |

| | |
|---|-----------|
| II- ETUDE DU FOYER CHINOIS | 78 |
|---|-----------|

| | |
|------------------------------|----|
| 1. INTRODUCTION | 79 |
|------------------------------|----|

| | |
|---|----|
| 2. DESCRIPTION DE L'ETUDE | 79 |
| 3. PUBLICATION | 81 |
| Publication 2 : <i>Ma, S. M., S. Maillard, H. L. Zhao, X. Huang, H. Wang, P. L. Geng, J. M. Bart and R. Piarroux (2008). "Assessment of Echinococcus granulosus polymorphism in Qinghai province, People's Republic of China." Parasitol Res 102(6): 1201-6.</i> | 81 |
| 4. DISCUSSION | 88 |

| | |
|--|-----------|
| III- EVALUATION DE 4 MICROSATELLITES SIMPLE-LOCUS | 93 |
|--|-----------|

| | |
|--|-----|
| 1. INTRODUCTION | 94 |
| 2. DESCRIPTION DE L'ETUDE | 95 |
| 3. MATERIELS ET METHODES | 95 |
| 4. RESULTATS | 99 |
| 5. DISCUSSION | 102 |

| | |
|---|------------|
| IV- EVALUATION DU MICROSATELLITE MULTILOCUS EMSB | 104 |
|---|------------|

| | |
|---|-----|
| 1. INTRODUCTION | 105 |
| 2. DESCRIPTION DE L'ETUDE | 109 |
| 3. PUBLICATION | 109 |
| Publication 3 : <i>Maillard, S., B. Gottstein, K.L. Haag, S. Ma, I. Colovic, M.C. Benchikh-Elfegoun, J. Knapp, and R. Piarroux (2009). "The EmsB tandemly repeated multilocus microsatellite: a new tool to investigate genetic diversity of Echinococcus granulosus sensu lato." J Clin Microbiol 47(11): p. 3608-16.</i> | 109 |
| 4. DISCUSSION | 119 |

| | |
|--|------------|
| V- DOUBLE INFECTION EXPERIMENTALE D'UN CHIEN PAR G1 ET G6 | 124 |
|--|------------|

| | |
|---|-----|
| 1. INTRODUCTION | 125 |
| 2. DESCRIPTION DE L'ETUDE | 125 |
| 3. PUBLICATION | 125 |
| Publication 4 : <i>Maillard, S., M.C. Benchikh-Elfegoun, K. Kohil, B. Gottstein and R. Piarroux. "Failure to observe cross-fertilization between Echinococcus granulosus sensu</i> | |

| | |
|--|-----|
| stricto <i>G1</i> and <i>E. canadensis G6</i> after an experimental double-infection of the definitive host." <u>Soumis à Vet Par.</u> | 125 |
| 4. DISCUSSION | 137 |

| | |
|--------------------------------|------------|
| <i>DISCUSSION</i> | 139 |
|--------------------------------|------------|

| | |
|--|-----|
| 1. SYNTHÈSE | 140 |
| 2. ÉTUDE DE LA TAXONOMIE D'<i>E. GRANULOSUS</i> SENSU LATO | 142 |
| 3. ÉTUDE DE L'ÉPIDÉMIOLOGIE MOLECULAIRE D'<i>E. GRANULOSUS</i> SENSU LATO | 144 |
| 4. CONCLUSION | 147 |

| | |
|-----------------------------|------------|
| <i>ANNEXES</i> | 150 |
|-----------------------------|------------|

| | |
|----------------------------|-----|
| 1. REFERENCES | 151 |
| 2. LEXIQUE | 159 |

FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1. Les visages historiques de l'échinococcose..... | 17 |
| Figure 2. Cas humain d'échinococcose kystique. | 18 |
| Figure 3. Stades adultes des différents échinocoques. | 22 |
| Figure 4. Filtre de rencontre et filtre de compatibilité. | 24 |
| Figure 5. Différents stades de développement d' <i>E. granulosus</i> sensu lato..... | 26 |
| Figure 6. Cycle parasitaire d' <i>E. granulosus</i> sensu lato. | 26 |
| Figure 7. Spectre d'hôte d' <i>E. granulosus</i> sensu lato. | 27 |
| Figure 8. Stade larvaire d' <i>E. multilocularis</i> | 28 |
| Figure 9. Cycle parasitaire d' <i>E. multilocularis</i> | 29 |
| Figure 10. Spectre d'hôte d' <i>E. multilocularis</i> | 32 |
| Figure 11. Spectre d'hôte d' <i>E. oligarthrus</i> | 32 |
| Figure 12. Spectre d'hôte d' <i>E. vogeli</i> | 32 |
| Figure 13. Spectre d'hôte d' <i>E. shiquicus</i> | 32 |
| Figure 14. Distribution géographique des échinococcoses. | 34 |
| Figure 15. Distribution géographique de l'échinococcose kystique. | 36 |
| Figure 16. Viscères d'animaux mis à la disposition des chiens. | 37 |
| Figure 17. Population de chiens errants près d'Adana en Turquie. | 38 |
| Figure 18. Carte génétique du génome mitochondrial d' <i>E. granulosus</i> sensu lato..... | 44 |
| Figure 19. Similarité des génomes mitochondriaux de 10 taxons <i>Echinococcus spp.</i> | 44 |
| Figure 20. Distribution géographique des souches ovine commune G1, ovine de Tasmanie G2 et du buffle G3..... | 56 |
| Figure 21. Distribution géographique de la souche équine G4. | 56 |
| Figure 22. Distribution géographique de la souche bovine G5. | 57 |
| Figure 23. Distribution géographique des souches cameline G6 et porcines G7/G9..... | 57 |
| Figure 24. Distribution géographique des souches de cervidés G8 et G10..... | 58 |
| Figure 25. Position phylogénétique des 10 souches d' <i>E. granulosus</i> sensu lato. | 58 |
| Figure 26. Les variants <i>E. granulosus</i> sensu lato en Afrique du Nord (2005)..... | 65 |
| Figure 27. Foyer nord-africain : zone d'étude. | 65 |
| Figure 28. Divisions administratives de la République Populaire de Chine. | 80 |

| | |
|--|-----|
| Figure 29. Distribution géographique d' <i>E. granulosus</i> sensu lato et d' <i>E. multilocularis</i> en République Populaire de Chine..... | 80 |
| Figure 30. Foyer chinois : zone d'étude..... | 81 |
| Figure 31. Yourtes tibétaines..... | 91 |
| Figure 32. Structure du microsatellite multilocus EmsB. | 107 |
| Figure 33. Séquences du microsatellite EmsB obtenues à partir du clonage d'un échantillon <i>E. multilocularis</i> collecté en suisse (CH1) et d'un échantillon <i>E. granulosus</i> sensu stricto G1 collecté en Algérie (539). | 108 |
| Figure 34. Comparaison des séquences mitochondriales et des profils EmsB obtenus à partir des échantillons brésiliens 172, 354 et 395. | 122 |

TABLEAUX

| | |
|--|-----|
| Tableau 1. Caractéristiques générales des échinocoques..... | 22 |
| Tableau 2. Caractéristiques générales des différentes souches de l'espèce <i>E. granulosus</i> sensu lato..... | 55 |
| Tableau 3. Caractéristiques des échantillons utilisés pour l'évaluation des microsatellites EmsJ, EmsK, NAK1 et Egmsca1..... | 96 |
| Tableau 4. Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification par PCR des microsatellites EmsJ, EmsK, NAK1 et Egmsca1..... | 97 |
| Tableau 5. Résultats des analyses menées avec les microsatellites simples EmsJ, EmsK, NAK1 et Egmsca1..... | 101 |
| Tableau 6. Synthèse des résultats obtenus avec les 10 séquences d'ADN polymorphes testées au cours de cette thèse..... | 148 |

ENCADRES

| | |
|--|-----|
| Encadré 1. Zoonoses..... | 20 |
| Encadré 2. Classification taxonomique des échinocoques..... | 21 |
| Encadré 3. Principales ethnies chinoises..... | 90 |
| Encadré 4. D'un microsatellite simple à un microsatellite complexe..... | 106 |
| Encadré 5. Double infection d'un chien par les souches ovine G1 et cameline G6 du parasite <i>E. granulosus</i> sensu lato..... | 126 |

PUBLICATIONS

- Publication 1 :** Maillard, S., M. C. Benchikh-Elfegoun, J. Knapp, J. M. Bart, P. Koskei, B. Gottstein and R. Piarroux (2007). "Taxonomic position and geographical distribution of the common sheep G1 and camel G6 strains of *Echinococcus granulosus* in three African countries." *Parasitol Res* **100**(3): 495-503. 64
- Publication 2 :** Ma, S. M., S. Maillard, H. L. Zhao, X. Huang, H. Wang, P. L. Geng, J. M. Bart and R. Piarroux (2008). "Assessment of *Echinococcus granulosus* polymorphism in Qinghai province, People's Republic of China." *Parasitol Res* **102**(6): 1201-6. 81
- Publication 3 :** Maillard, S., B. Gottstein, K.L. Haag, S. Ma, I. Colovic, M.C. Benchikh-Elfegoun, J. Knapp, and R. Piarroux (2009). "The EmsB tandemly repeated multilocus microsatellite: a new tool to investigate genetic diversity of *Echinococcus granulosus sensu lato*." *J Clin Microbiol* **47**(11): p. 3608-16. 109
- Publication 4 :** Maillard, S., M.C. Benchikh-Elfegoun, K. Kohil, B. Gottstein and R. Piarroux. "Failure to observe cross-fertilization between *Echinococcus granulosus sensu stricto* G1 and *E. canadensis* G6 after an experimental double-infection of the definitive host." *Soumis à Vet Par*. 125

ABREVIATIONS

| | |
|--------------------|--|
| °C | Degré Celsius |
| μ-unité | Micro-unité (10 ⁻⁶) |
| ACT | Actine |
| ADN | Acide DéoxyriboNucléique |
| Ag | Antigène |
| ARN | Acide RiboNucléique |
| ATP | Adénosine TriPhosphate |
| AVCI | Années de Vie Corrigées de l'Incapacité (<i>DALY</i> en anglais) |
| COX | Cytochrome c Oxydase |
| c-unité | Centi-unité (10 ⁻²) |
| ddNTP | DiDesoxyNucléotide TriPhosphate |
| dNTP | DesoxyNucléotide TriPhosphate |
| Dollar U.S. | Dollar américain |
| E. | Genre <i>Echinococcus</i> |
| G1 à G10 | Souches définies dans le groupe <i>Echinococcus granulosus</i> sensu lato |
| Hbx | <i>Homeobox</i> (zone régulatrice impliquée dans le développement du parasite) |
| HD | Hôte Définitif |
| HI | Hôte Intermédiaire |
| ITS | Internal Transcribed Spacer (région inter-génique de l'ADN ribosomal) |
| J.-C. | Jésus-Christ |
| Kb | Kilo-pb (1000 paires de base nucléotidique) |
| K-unité | Kilo-unité (10 ⁺³) |
| L | Litre |
| m | Mètre |
| M | Molaire (mol/L) |
| M.A. | Million d'année |
| MDH | Malate DesHydrogénase |
| min | Minute |
| m-unité | Milli-unité (10 ⁻³) |
| n | Formule chromosomique ou ploïdie (n=haploïdie, 2n=diploïdie...) |
| NADH | Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogéné |
| NCR | Région Non Codante de l'ADN |
| NTP | Nucléotide TriPhosphate |
| OMS | Organisation Mondiale de la Santé (<i>WHO</i> en anglais) |
| pb | Paire de base nucléotidique |
| PCR | <i>Poly Chain Reaction</i> (Réaction d'amplification en chaîne) |
| p-unité | Pico-unité (10 ⁻¹²) |
| RAPD | Amplification aléatoire d'ADN polymorphe |
| RFLP | Polymorphisme de longueur de fragments de restriction |
| s | Seconde |
| sp. | Espèce (non précisée) |
| spp. | Ensemble d'espèces (non précisées) |
| SSCP | Polymorphisme de conformation des simples brins |
| U | Unité enzymatique |
| V | Volt |

INTRODUCTION

1. PRESENTATION GENERALE

L'Echinococcose fait partie des pathologies humaines connues depuis l'antiquité (**Figure 1**). Hippocrate (4e siècle avant J.-C.), le père fondateur de la médecine, fut le premier à décrire la survenue de kystes dans la cavité abdominale de certains de ses patients. Lorsque ces « tumeurs » étaient remplies de liquide, ces derniers mourraient systématiquement. Plus tard, Galen (2e siècle avant J.-C.) nota une grande similarité entre ces kystes humains et ceux trouvés chez des animaux de bétail. Cependant, ce ne fut qu'au XVIIe siècle que ces kystes furent reconnus comme des organismes vivants à part entière et indépendants des tissus qui les entouraient (par Redi, Hartmann et Tyson). Par la suite, Johann Wepfer (1620-1695) relia les différentes formes de ce parasite (stade adulte/stade larvaire) avec les différentes espèces d'animaux qui les hébergeaient (hôtes) et parvint ainsi à retracer son cycle de développement.

En 1786, August Batsch (1761-1802) nomma ce parasite *Echinococcus granulosus*. En 1863, Karl Leuckart (1822-1898) et Karl Diesing (1800-1867) décrivirent deux autres échinocoques : *E. multilocularis* et *E. oligarthrus*. Ensuite, en l'espace de quelques années, pas moins de 16 espèces et 13 sous-espèces furent rapportées dans la littérature [1] mais leur pertinence était souvent controversée. Après de nombreuses discussions, un consensus fut finalement adopté : le rang d'espèce ne fut attribué qu'à *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* et à *E. vogeli*, un nouveau variant identifié en 1972 par Rausch et Bernstein. A cette époque, le genre *Echinococcus* (Rudolphi 1801) comptait donc quatre espèces et cela demeura ainsi, pendant près de 20 ans.

En effet, au début des années 1990, les premières études phylogénétiques menées sur le parasite démontrèrent que l'espèce *E. granulosus* était en fait un groupe hétérogène et paraphylétique (*E. granulosus* sensu lato). Dès lors, la classification taxonomique de ce groupe et de ses différents variants n'a eu de cesse d'évoluer. Par ailleurs, en 2005, une toute nouvelle forme fut identifiée chez des renards et des petits lagomorphes dans le district chinois de Shiqu. Portée directement au rang d'espèce, cette forme fut nommée *E. shiquicus* [2]. A l'heure actuelle, neuf espèces distinctes sont communément reconnues au sein du genre *Echinococcus* : *E. granulosus* sensu stricto, *E. equinus*, *E. ortleppi*, *E. canadensis*, *E. felidis*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus*, *E. vogeli* et *E. shiquicus*.

Les échinococcoses sont parmi les plus importantes maladies parasitaires helminthiques. La forme la plus répandue est l'échinococcose kystique (**Figure 2**). Causée par *E. granulosus*, elle totaliserait environ 95% des cas d'échinococcose dans le monde, avec environ 200 000 nouveaux cas humains chaque année. Il est d'ailleurs probable que cette estimation soit même en dessous de la réalité car de nombreux cas restent non diagnostiqués et même lorsqu'ils le sont, ils ne sont pas toujours recensés [3].

*Définir des campagnes de lutte adaptées contre l'échinococcose kystique nécessite de connaître au mieux le parasite *E. granulosus* sensu lato, ses différents variants, leurs statuts, leurs relations, leurs interactions, les modalités de leur circulation ainsi que les hôtes essentiels à leur développement. Les outils de typage moléculaire permettent aujourd'hui d'explorer ces différents points.*

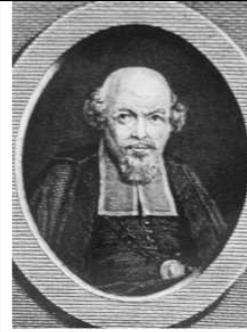
| | | | | | |
|---|---|--|---|---|---|
|  |  |  |  |  |  |
| <p>Hippocrate Médecin grec 460 - 370 avant J.-C.</p> | <p>August Batsch Naturaliste allemand 1761 - 1802</p> | <p>Johann Wepfer Pathologiste et pharmacologiste suisse 1620 - 1695</p> | <p>Karl Rudolphi Zoologiste allemand 1771 - 1831</p> | <p>Karl Leuckart Zoologiste allemand 1822 - 1898</p> | <p>Karl Diesing zoologiste autrichien 1800 - 1867</p> |

Figure 1. Les visages historiques de l'échinococcose.

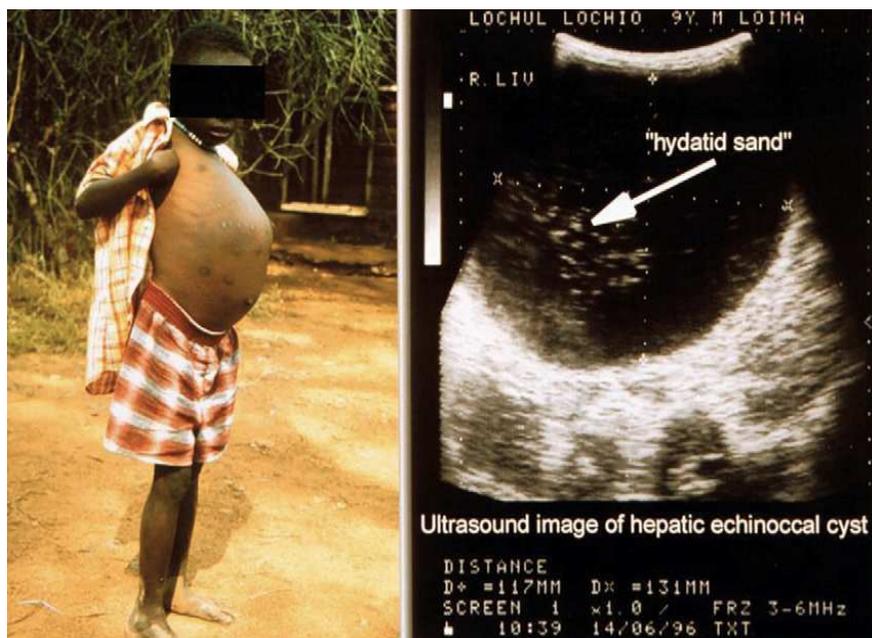


Figure 2. Cas humain d'échinococcose kystique.
Garçon présentant une distension abdominale due à la présence d'un kyste hydatique (imagerie ultrason) [4].

2. LE GENRE *ECHINOCOCCUS*

2.1. Présentation

L'échinococcose est une zoonose (**Encadré 1**) causée par les parasites du genre *Echinococcus*. Il s'agit de petits vers de la sous-classe des *Eucestoda* et de la famille des *Taeniidae* (**Encadré 2**). Avant la révision récente de la classification des échinocoques, quatre espèces étaient reconnues : *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* et *E. vogeli* (**Tableau 1**). Leur cycle biologique implique toujours deux hôtes mammifères : un hôte définitif (HD) carnivore qui héberge la forme adulte sexuée du parasite et un hôte intermédiaire (HI) qui en héberge la forme asexuée, le métacestode. Suite à une contamination accidentelle, le développement de ce métacestode chez l'homme peut occasionner une symptomatologie, qui diffère suivant l'espèce en cause. Néanmoins, hormis quelques rares exceptions où les viscères humains peuvent être ingérés par un nouvel HD susceptible, l'homme représente le plus souvent une impasse parasitaire car le cycle s'arrête alors.

2.2. Morphologie

Les échinocoques sont les plus petits vers de la famille des *Taeniidae* (quelques millimètres). La partie antérieure du vers (scolex) présente un système de fixation qui permet l'accrochage à la muqueuse intestinale de l'HD. Il est constitué de quatre ventouses musculaires et de deux rangées de crochets. Le corps (strobile) comprend entre deux et six segments reproductifs hermaphrodites (proglottis) (**Figure 3**). Les œufs produits par fécondation des gamètes sont ovoïdes et morphologiquement identiques à ceux des autres ténias. Chacun d'eux mesure entre 30 et 40 μm de diamètre et renferme un embryon sphérique portant six crochets. Chez un HI susceptible, cet embryon hexacanthé peut former un métacestode, une vésicule remplie de liquide et délimitée par deux couches. La plus externe est acellulaire et entraîne la production par les tissus de l'hôte d'une enveloppe fibreuse (adventice) qui isole le parasite. La plus interne, la couche germinative, est nucléée et peut former des adultes juvéniles (protoscolex) par bourgeonnement. Leur libération et leur maturation en adulte ne pourront survenir qu'après ingestion par un nouvel HD susceptible.

Les zoonoses sont des maladies qui se transmettent des animaux vertébrés à l'homme et inversement. Elles sont causées par de multiples agents infectieux (bactéries, virus, parasites ou prions). Les interactions entre l'agent, ses hôtes et l'environnement jouent un rôle primordial dans la dynamique des zoonoses.

Elles affectent la santé des personnes contaminées mais peuvent également, dans certains cas comme l'échinococcose kystique, toucher leurs moyens de subsistance (cheptels). Elles sévissent généralement dans des zones rurales, relativement pauvres et possédant de faibles moyens sanitaires. Lorsqu'elle est engagée, la stratégie de lutte la plus fréquemment utilisée consiste à endiguer la prolifération de l'agent infectieux au sein du réservoir animal. Toutefois, dans de nombreux pays endémiques, certaines pratiques liées à l'élevage, le commerce et l'abattage d'animaux tendent au contraire à la favoriser. De plus, chez l'homme, les zoonoses sont souvent sous diagnostiquées, en particulier dans ces milieux ruraux. Il est donc difficile d'estimer l'importance réelle de ces maladies et le risque qu'elles représentent, à la fois pour l'homme et les animaux d'élevage.

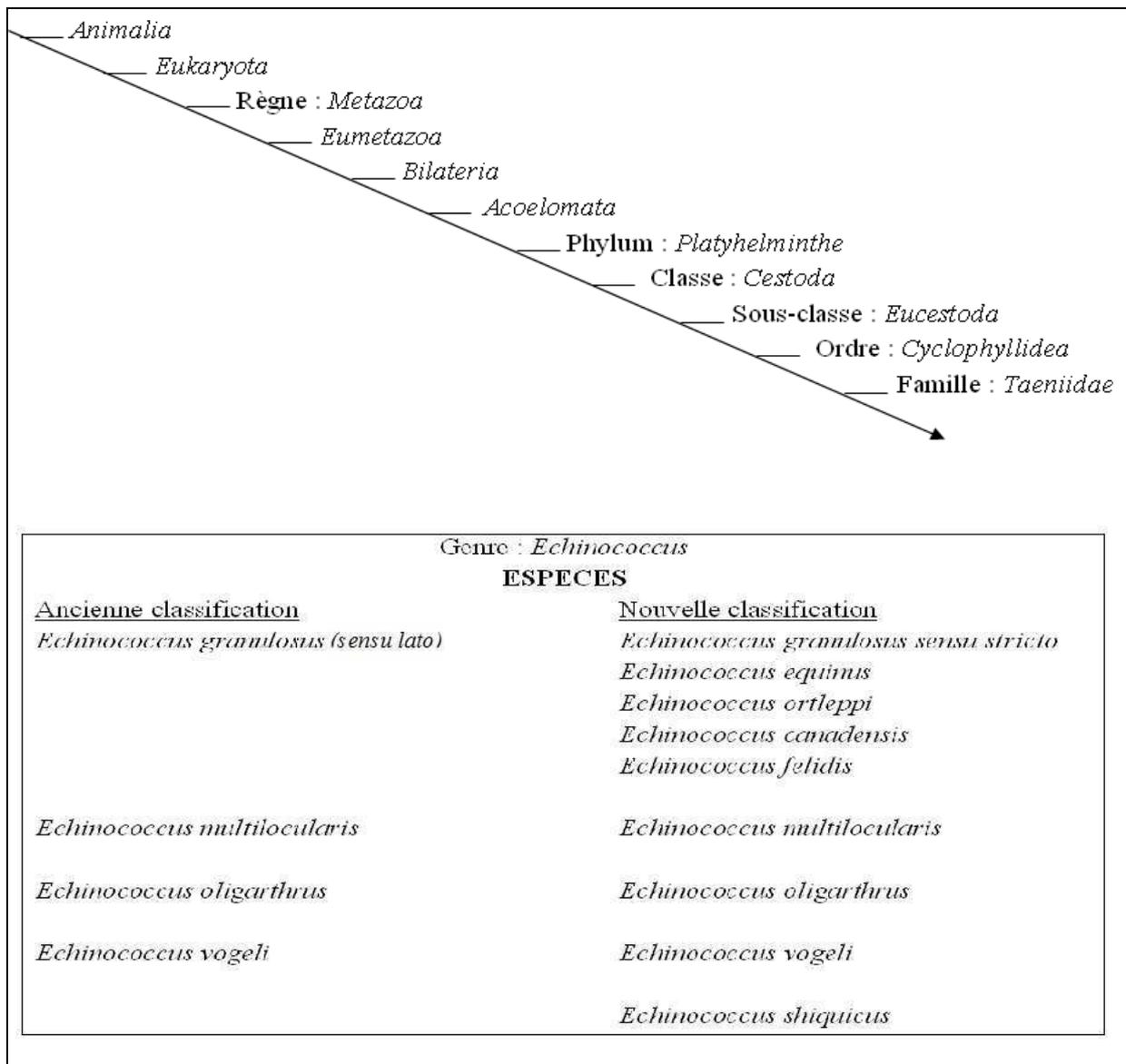
Les principaux acteurs des zoonoses :

Pour un agent infectieux, l'écosystème indispensable à sa survie (réservoir) comprend l'ensemble des hôtes qui l'hébergent mais aussi l'environnement extérieur en cas de stades libres dans son développement. Concernant ces hôtes, il en existe différentes catégories :

- Les hôtes primaires qui permettent le développement et la transmission de l'agent infectieux :
 - Les hôtes définitifs qui hébergent le stade adulte/sexué.
 - Les hôtes intermédiaires qui hébergent le stade larvaire/asexué. Ils peuvent être passifs ou actifs (vecteurs).
- Les hôtes secondaires ou accidentels peuvent permettre le développement de l'agent infectieux. Toutefois, ils ne permettent pas sa transmission.

La contamination humaine est conditionnée par de nombreux facteurs pouvant être liés à l'agent infectieux lui-même, à son spectre d'hôte, à l'environnement, au comportement humain ou au contexte socio-économique et sanitaire des zones touchées.

Encadré 1. Zoonoses.



Encadré 2. Classification taxonomique des échinocoques.

| | <i>Echinococcus granulosus sensu lato</i> (Batsch, 1786) | <i>Echinococcus multilocularis</i> (Leuckart, 1863) | <i>Echinococcus oligarthrus</i> (Diesing, 1863) | <i>Echinococcus vogeli</i> (Rausch et Bernstein, 1972) |
|----------------------------------|---|--|--|---|
| Distribution géographique | Cosmopolite | Eurasie central et du nord, Amérique du nord | Amérique centrale et du sud | Amérique centrale et du sud |
| Hôtes définitifs | Chien Canidés | Renards Canidés et félidés | Félidés sauvages | Chien des buissons (<i>Speothos venaticus</i>) |
| Hôtes intermédiaires | Ongulés. Primates. Marsupiaux. <i>HOMME</i> | Rongeurs. Insectivores. Lagomorphes. <i>HOMME</i> | Rongeurs. <i>HOMME</i> | Rongeurs. <i>HOMME</i> |
| Métacestode | Uniloculaire (Kystique) | Multivésiculaire (Alvéolaire) | Polykystique | Polykystique |

Tableau 1. Caractéristiques générales des échinocoques.

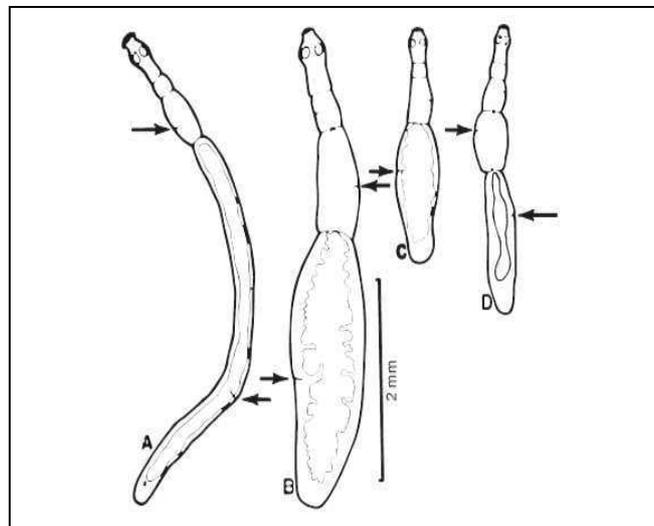


Figure 3. Stades adultes des différents échinocoques.
Echinococcus vogeli (A), *E. granulosus* sensu lato (B), *E. oligarthrus* (C) et
E. multilocularis (D)

2.3. Cycle parasitaire

Les échinocoques ont besoin de deux hôtes mammifères pour assurer leur cycle de développement. Toutefois, le bon déroulement de ce cycle ne peut se faire que dans certaines conditions impliquant à la fois ces hôtes et le parasite lui-même. Celles-ci peuvent être représentées schématiquement sous forme de deux grands filtres principaux, le filtre de rencontre et le filtre de compatibilité (**Figure 4**) [6]. Lorsque les conditions sont remplies, ces filtres sont considérés comme ouverts.

Le premier filtre principal détermine la possibilité de contact entre les hôtes et le parasite. Il se compose de deux filtres secondaires : le filtre de biocœnose (les hôtes et le parasite habitent le même écosystème - *cohabiter*) et le filtre éthologique (leurs comportements respectifs permettent leur contact - *rencontrer*).

Le second filtre principal détermine la possibilité de vie commune et durable entre les hôtes et le parasite. Il se divise lui aussi en deux filtres secondaires : le filtre d'exigence (le parasite trouve chez ses hôtes la réponse à ses besoins - *accepter*) et le filtre immunitaire (les hôtes ne peuvent pas détruire le parasite - *être accepté*).

Le stade adulte du parasite est fixé à la muqueuse intestinale de l'HD. Après fécondation, les œufs produits sont relâchés dans la lumière de l'intestin puis expulsés dans l'environnement avec les fèces de l'hôte. Ces œufs sont très résistants : ils peuvent y survivre entre plusieurs mois et un an. Lorsque l'un d'eux est ingéré par un HI susceptible, ses différentes enveloppes sont peu à peu digérées, entraînant ainsi la libération de l'embryon hexacanthé. Grâce aux six crochets présents à sa surface, cet embryon peut perforer la muqueuse intestinale et entrer dans la circulation sanguine. Entraîné par le flux, il est le plus souvent stoppé au niveau du foie ou des poumons, où il poursuit son développement en métacestode. Après un temps plus ou moins variable selon les espèces, ce stade larvaire peut produire des milliers de protoscolex. Par la suite, le cycle ne peut se poursuivre qu'en cas d'ingestion par un nouvel HD susceptible. La digestion du métacestode provoque la libération des protoscolex qu'il contient mais aussi, la dévagination de leur scolex exposant ainsi leurs ventouses et leurs crochets. Entraînés passivement par le tractus digestif, ils s'accrochent progressivement le long de la muqueuse intestinale. Environ cinq semaines sont nécessaires à leur maturation sexuelle. Une fois atteinte, le cycle peut recommencer à nouveau.

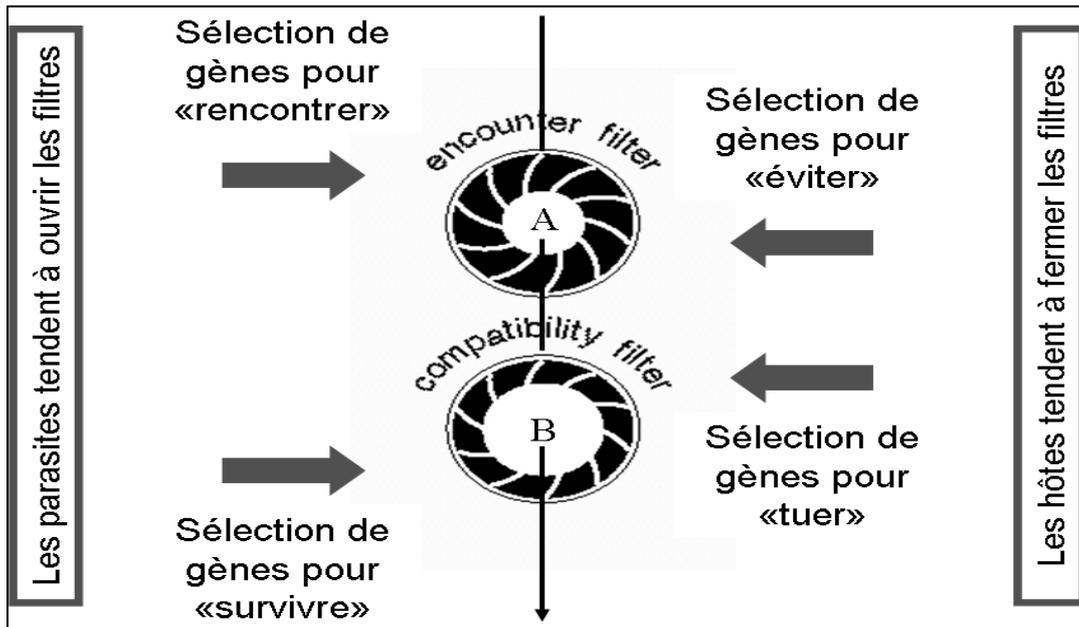


Figure 4. Filtre de rencontre et filtre de compatibilité.

[6]

3. LES ESPECES DU GENRE *ECHINOCOCCUS*

3.1. *Echinococcus granulosus* sensu lato

3.1.1. Morphologie

- Le stade adulte mesure moins de 7 mm et comprend généralement trois ou quatre segments (**Figure 3** et **Figure 5**).
- Le métacestode d'*E. granulosus* sensu lato est généralement uniloculaire (**Figure 5**). Le kyste croît par élargissement concentrique, causant ainsi la compression progressive des tissus périphériques de l'hôte, jusqu'à devenir symptomatique.

3.1.2. Cycle parasitaire

Comme tous les échinocoques, *E. granulosus* sensu lato arbore un cycle biologique nécessitant deux hôtes (**Figure 6**). Le spectre de ces hôtes est particulièrement important (**Figure 7**). Les cycles possibles peuvent être domestiques, lorsqu'ils impliquent le chien (HD) et des ongulés de cheptels (HI) ou sauvages, lorsqu'ils impliquent des carnivores (HD) et des ongulés (HI) sauvages. Toutefois, il n'est pas rare que plusieurs cycles coexistent en sympatrie [7-10]. Les cycles domestiques présentent un risque majeur pour l'homme. En effet, ils tendent à multiplier les rencontres entre le parasite et l'homme et augmentent ainsi les risques de transmission. Toutefois, les cycles sauvages renferment également un risque non négligeable car ils offrent un autre réservoir au parasite, souvent plus distant de l'homme mais dont l'importance ne peut être évaluée avec exactitude. D'après la littérature, la forme ancestrale d'*E. granulosus* sensu lato proviendrait d'un cycle sauvage [5]. Avec l'expansion de l'homme dans le monde, le recours fréquent à l'élevage comme moyen de subsistance et le développement du commerce de cheptels, des cycles domestiques se seraient peu à peu établis au contact de cycles sauvages et auraient progressivement pris de l'ampleur pour devenir les cycles dominants actuels.

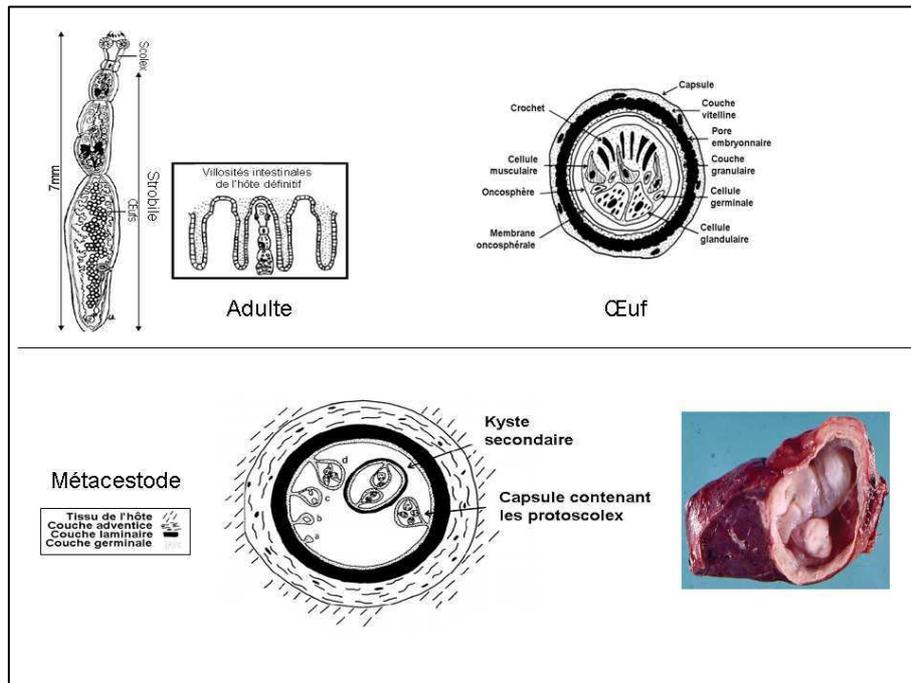


Figure 5. Différents stades de développement d'*E. granulosus* sensu lato. [5, 11]

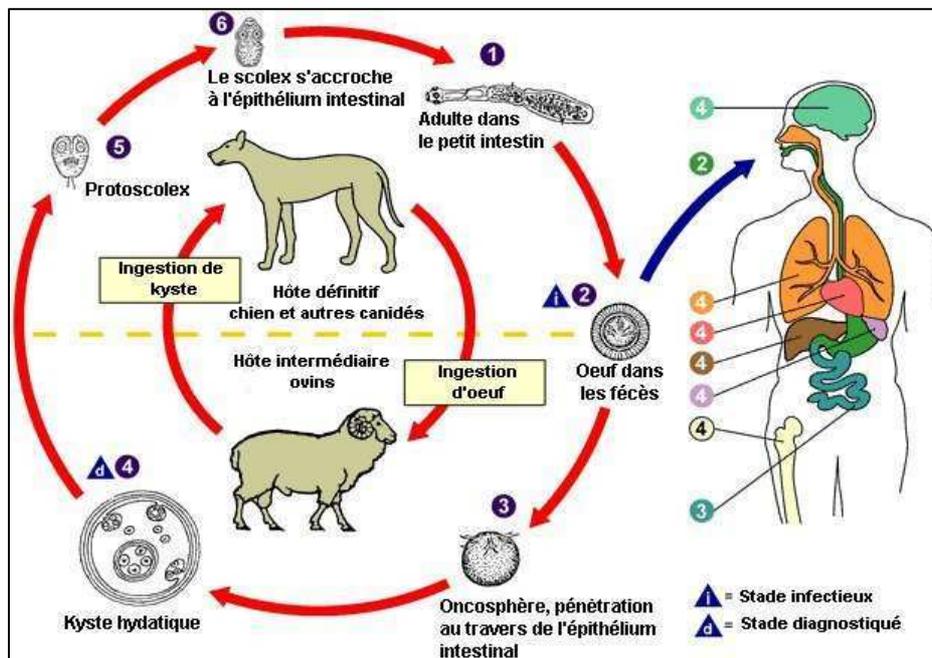


Figure 6. Cycle parasitaire d'*E. granulosus* sensu lato. [12]

| Hôte définitif | | Hôte intermédiaire | | |
|---|---|--|---|---------------------------|
|  | <i>Canis lupus familiaris</i> Chien domestique |     | <i>Bovinae</i> Bovinés | <i>Bovidae</i> Bovidés |
|  | <i>Lycaon pictus</i> Lycaon |   | <i>Caprinae</i> Caprinés | |
|  | <i>Canis mesomelas</i> Chacal à chabraque |   | <i>Equinae</i> Equinés | |
|  | <i>Canis aureus</i> Chacal doré |  | <i>Antilopinae</i> Antilopinés | |
|  | <i>Crocuta crocuta</i> Hyène tachetée |    | <i>Suidae</i> Suidés | |
|  | <i>Canis lupus</i> Loup |   | <i>Camelidae</i> Camélidés | |
|  | <i>Panthera leo</i> Lion |  | <i>Cervidae</i> Cervidés | |
| | |  | <i>Macropodidae</i> Macropodidés | |
| | |  | <i>Giraffidae</i> Giraffidés | |
| | |  | <i>Hippopotamidae</i> Hippopotamidés | |

Figure 7. Spectre d'hôte d'*E. granulosus* sensu lato.
[5]

3.2. *Echinococcus multilocularis*

3.2.1. Morphologie

- Le stade adulte d'*E. multilocularis* mesure moins de 5 mm et possède généralement quatre ou cinq segments (**Figure 3**).
- Le stade larvaire a une structure complexe très différente de celle d'*E. granulosus* sensu lato (**Figure 8**). Il se compose de multiples vésicules remplies de liquide et entourées de tissu conjonctif plus ou moins dense. Ce réseau d'alvéoles présente une croissance infiltrante qui occasionne progressivement des dysfonctionnements hépatiques. A la différence du métacestode d'*E. granulosus* sensu lato, celui d'*E. multilocularis* se développe très rapidement, probablement une adaptation aux vies courtes de certains hôtes rongeurs [13]. Au contraire, cette croissance est particulièrement lente chez l'homme. En conséquence, les premiers symptômes peuvent n'apparaître que très longtemps après contamination (jusqu'à plusieurs décennies).

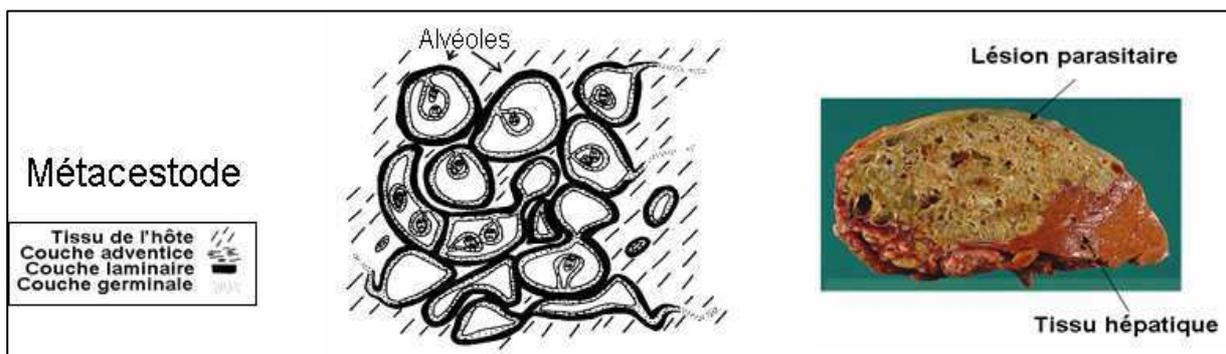


Figure 8. Stade larvaire d'*E. multilocularis*.

[5, 11]

3.2.2. Cycle parasitaire

Le cycle le plus répandu est sauvage : il implique les renards des genres *Vulpes* et *Alopex* comme HD et des rongeurs, notamment de la famille des *Arvicolidae*, comme HI (Figure 9 et Figure 10). Les chiens et les chats sont également susceptibles [14]. Des doubles contaminations, à la fois par *E. multilocularis* et *E. granulosus* sensu lato, ont été observées chez le chien [15].

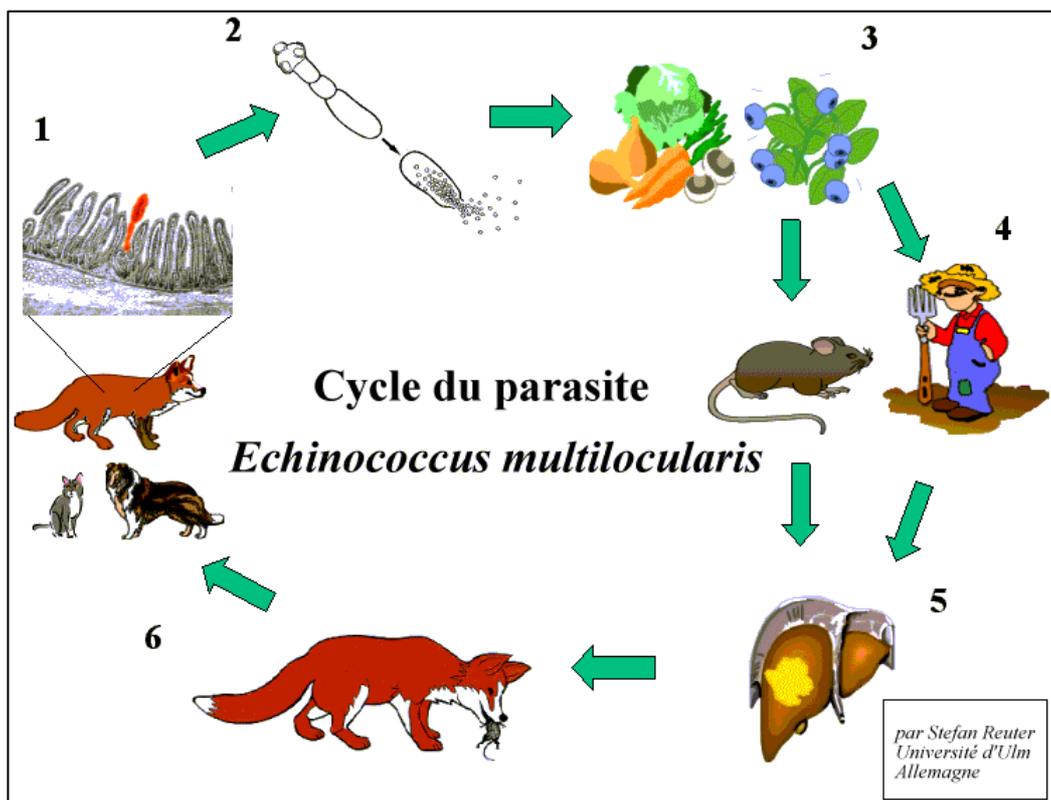


Figure 9. Cycle parasitaire d'*E. multilocularis*.

[16]

3.3. *Echinococcus oligarthrus*

3.3.1. Morphologie

- Le stade adulte d'*E. oligarthrus* mesure moins de 3 mm et possède généralement trois segments (**Figure 3**).
- Le stade larvaire est polykystique. En effet, contrairement au métacestode d'*E. granulosus* sensu lato qui ne présente généralement qu'une seule chambre kystique, celui d'*E. oligarthrus* présente une tendance à leur multiplication.

3.3.2. Cycle parasitaire

L'espèce *E. oligarthrus* est surtout maintenue dans un cycle sauvage impliquant des félidés comme HD et des rongeurs comme HI (**Figure 11**). Toutefois, les chats présentent également une susceptibilité pour ce parasite. L'établissement d'un cycle domestique serait donc possible.

3.4. *Echinococcus vogeli*

3.4.1. Morphologie

- Le stade adulte mesure moins de 6 mm et se compose de trois segments (**Figure 3**).
- Le stade larvaire est similaire à celui d'*E. oligarthrus* (polykystique).

3.4.2. Cycle parasitaire

Comme pour *E. oligarthrus*, l'espèce *E. vogeli* est principalement maintenue dans un cycle sauvage (**Figure 12**). Toutefois, les chiens présentent également une susceptibilité pour ce parasite. L'établissement d'un cycle domestique serait donc possible.

3.5. *Echinococcus shiquicus*

3.5.1. Morphologie

Très peu d'information sont disponibles à l'heure actuelle concernant cette espèce en raison de sa découverte récente [2, 17].

- Le stade adulte ressemble morphologiquement à celui d'*E. multilocularis* mais il présente toutefois quelques différences : les crochets sont plus petits, les segments et les œufs moins nombreux.
- Similaire à celui d'*E. granulosus* sensu lato, le métacestode d'*E. shiquicus* ne comporte souvent qu'une seule chambre kystique.

3.5.2. Cycle parasitaire

A ce jour, cette espèce n'a été observée que sur le plateau Tibétain, chez des renards tibétains *Vulpes ferrilata* (HD) et des lagomorphes pikas *Ochotona curzoniae* (HI) (**Figure 13**).

| | | |
|---|---|---|
|  |  |  |
| <i>Vulpes spp.</i> | <i>Alopex spp.</i> | <i>Arvicolidae</i> |

Figure 10. Spectre d'hôte d'*E. multilocularis*

| | | | | | |
|--|---|---|--|---|---|
|  |  |  |  |  |  |
| <i>Felis concolor</i> | <i>Felis pardalis</i> | <i>Felis jaguarondi</i> | <i>Felis geoffroyi</i> | <i>Dasyprocta spp.</i> | <i>Cuniculus paca</i> |

Figure 11. Spectre d'hôte d'*E. oligarthrus*.

| | | |
|---|---|---|
|  |  |  |
| <i>Speothos venaticus</i> | <i>Cuniculus paca</i> | <i>Proechimys spp.</i> |

Figure 12. Spectre d'hôte d'*E. vogeli*.

| | |
|---|--|
|  |  |
| <i>Vulpes ferrilata</i> | <i>Ochotona curzoniae</i> |

Figure 13. Spectre d'hôte d'*E. shiquicus*.

Hôte Définitif

Hôte Intermédiaire

4. LES ECHINOCOCCOSES

Les échinococcoses sont des maladies provoquées par la présence et le développement du stade larvaire des différentes espèces du genre *Echinococcus*. Trois formes sont reconnues chez l'homme : la forme kystique causée par *E. granulosus* sensu lato, la forme alvéolaire causée par *E. multilocularis* et la forme polykystique causée à la fois par *E. oligarthrus* et par *E. vogeli* (**Figure 14**). De sévérité variable, ces maladies peuvent parfois entraîner la mort si elles ne sont pas diagnostiquées à temps ou si la prise en charge du patient est inadaptée. Les formes kystiques et alvéolaires sont actuellement les plus répandues.

4.1. Echinococcose kystique

4.1.1. Description

L'échinococcose kystique est causée par le stade larvaire d'*E. granulosus* sensu lato. L'homme se contamine en ingérant des œufs de ce parasite. Le métacestode se développe à vitesse variable, le plus souvent au niveau du foie ou des poumons. Sa présence peut rester asymptomatique durant de nombreuses années. En effet, les tissus parasitaires étant cloisonnés dans un adventice fibreux, ils n'entraînent généralement pas de réactions immunologiques majeures. Cependant, en grossissant, le kyste peut commencer à exercer une pression suffisante sur les tissus périphériques de l'hôte pour occasionner des événements pathogènes. De plus, une symptomatologie aiguë peut survenir lorsque le kyste se rompt spontanément ou suite à un traumatisme. Le kyste peut produire des protoscolex environ dix mois après contamination. Il peut également dégénérer ou se calcifier.

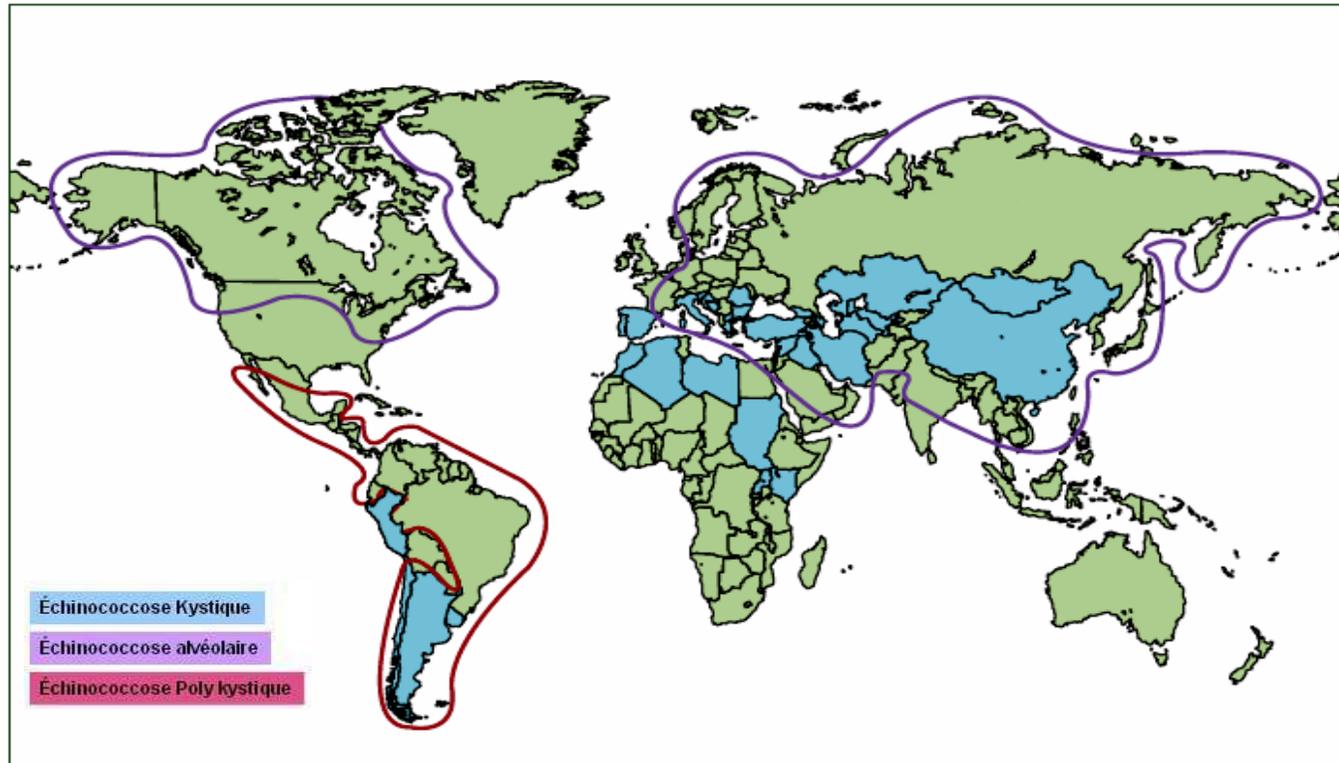


Figure 14. Distribution géographique des échinococcoses.
[18]

4.1.2. Distribution géographique

E. granulosus sensu lato est présent sur tous les continents et particulièrement dans certaines régions où elle circule de manière constante et importante : l'Amérique du Sud, le littoral Méditerranéen, le centre et le sud de la Fédération Russe, l'Asie Centrale, la République Populaire de Chine, l'Australie et plusieurs régions d'Afrique (**Figure 15**). Les prévalences humaine et animale de l'échinococcose kystique y sont donc très importantes. Les Etats-Unis et le Mexique sont au contraire très peu touchés. La plupart des cas sont d'ailleurs diagnostiqués chez des immigrés provenant de pays endémiques et ne sont donc pas autochtones. Dans certaines zones isolées, notamment dans les régions arctiques et subarctiques [10], les cycles sauvages du parasite peuvent également occasionner quelques cas sporadiques.

Actuellement, *E. granulosus* sensu lato réapparaîtrait dans plusieurs foyers qui avaient pourtant été considérés sous contrôle à plusieurs reprises [5].

4.1.3. Relations entre l'homme et les différents hôtes

Le pastoralisme permet de satisfaire les besoins alimentaires, économiques et culturels des populations de nombreux pays. Les groupes pastoraux sont souvent nomades. Généralement saisonniers, leurs déplacements se font principalement pour répondre aux besoins de leurs cheptels. Lorsque la nourriture se fait rare ou pendant ces déplacements, les grands groupes peuvent parfois se disperser en unités plus petites. Au contraire, les périodes fertiles sont l'occasion de grands rassemblements. Selon les pays, la taille et la composition du cheptel peuvent être considérés comme une source de richesse et un indicateur de statut social. Pour une population souhaitant s'établir dans un environnement difficile, le pastoralisme représente le plus souvent l'unique mode de vie possible. Dans les groupes pastoraux, le contact étroit entre l'homme, le chien et le cheptel ainsi que certaines pratiques peuvent favoriser la continuité du cycle biologique d'*E. granulosus* sensu lato, sa diffusion et sa transmission à l'homme.

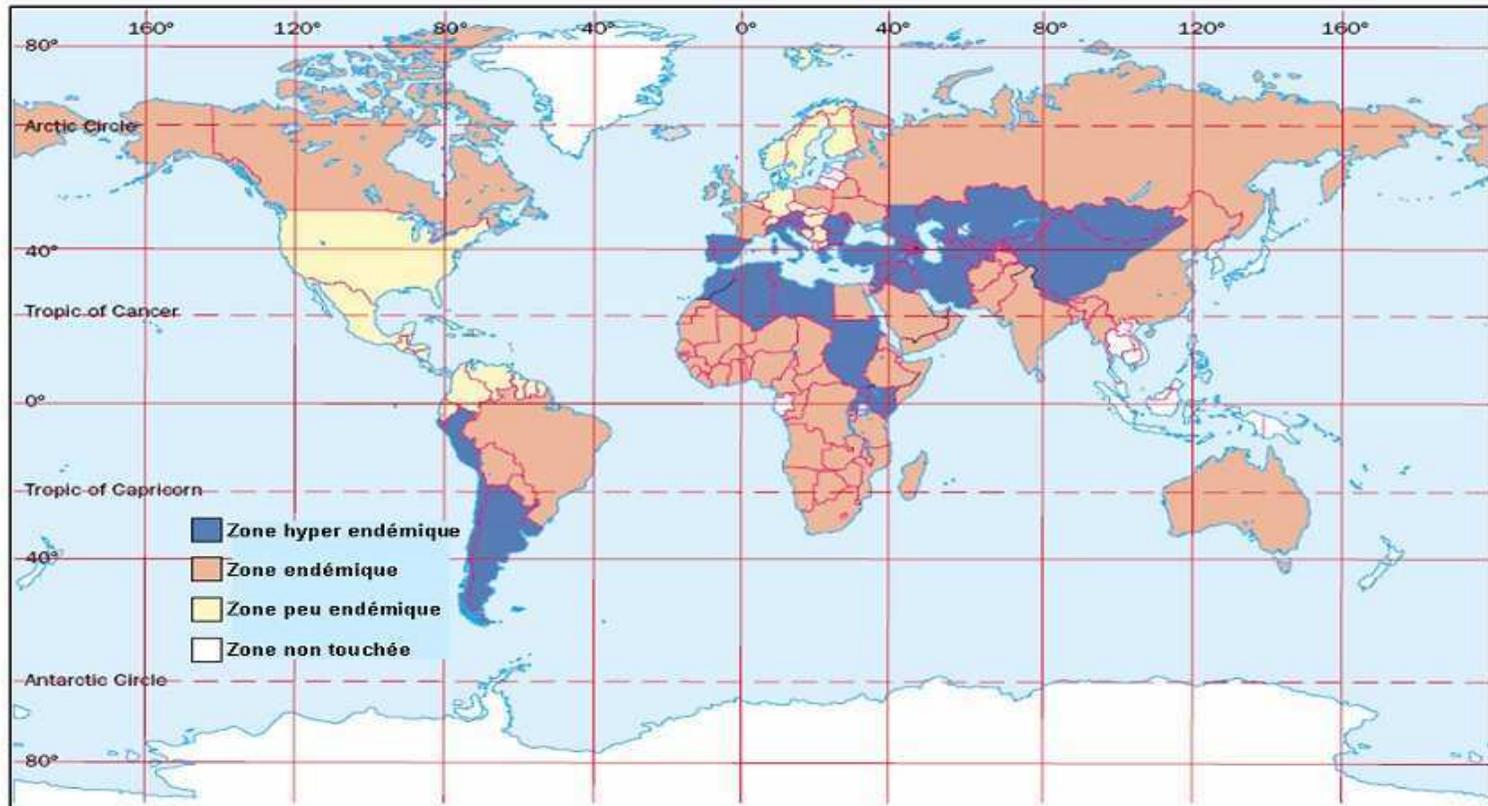


Figure 15. Distribution géographique de l'échinococcose kystique.
[19]

La relation qu'entretient l'homme avec le chien peut fortement changer suivant les pays et les cultures (**Figure 16** et **Figure 17**). Dans un premier cas, les chiens sont tolérés et parfois appréciés. Ils peuvent être domestiqués, nourris, logés et peuvent aussi bénéficier d'une surveillance vétérinaire. Leur population est plus ou moins contrôlée. Dans un second cas, les chiens sont au contraire considérés comme impurs et sont souvent rejetés. Ils subsistent en recherchant leur nourriture à l'intérieur des villes (dans les poubelles, les décharges ou à proximité d'abattoirs) et sont sujets à d'importantes pullulations périodiques. Afin d'endiguer ce problème, les services vétérinaires des zones touchées organisent souvent des campagnes de régulation (capture, castration, euthanasie). Enfin, dans un troisième cas très fréquent, les deux situations précédentes coexistent. Les chiens domestiques côtoient les chiens errants, pullulant et peu surveillés sur le plan sanitaire. Les œufs du parasite présents dans les fèces, sur le pelage ou la langue des chiens errants contaminés peuvent alors se retrouver aisément sur le pelage ou la langue des chiens domestiques, proches de l'homme. C'est ainsi que ce troisième cas accentue grandement les risques de transmission du parasite à l'homme.

La surveillance et le contrôle des populations de chiens et la sensibilisation au risque de la population humaine font souvent partie intégrante de la plupart des programmes mis en place pour lutter contre l'échinococcose kystique.



Figure 16. Viscères d'animaux mis à la disposition des chiens.

[4]



Figure 17. Population de chiens errants près d'Adana en Turquie.

A Adana, les services vétérinaires capturent fréquemment des chiens errants en ville et les conduisent à l'extérieur. Ils leur donnent alors de la nourriture pour éviter leur retour et se servent de cette nourriture pour administrer des traitements divers, notamment contre la rage et les parasites intestinaux. (Photographies prises par V. Surekli)

4.1.4. Impact socioéconomique

Dans les zones touchées, l'échinococcose kystique est souvent considérée comme un véritable problème de santé publique. Elle peut également affecter leur économie. Chaque patient pris en charge par les services de santé coûte en moyenne plusieurs milliers de dollars U.S. [20]. A cela s'ajoutent les pertes liées au commerce des cheptels mais aussi de leur production. Un animal perdant généralement du poids lorsqu'il est malade, sa valeur marchande s'en trouve tout autant amoindrie. De plus, la présence de viscères parasités entraîne généralement une diminution du prix de la carcasse de 4,4% en moyenne [21]. La production de lait et de toison peut également diminuer suite à une contamination [22]. Une étude menée en Tunisie a estimé que dans ce pays, l'ensemble des dépenses et des pertes liées à l'échinococcose kystique était compris entre 10 et 19 millions de dollars U.S. par an [22]. Dans la région pourtant peu peuplée du plateau tibétain, le poids global de cette maladie s'élève déjà à 218 676 dollars U.S. par an (189 850-247 871 dollars U.S.). Cette estimation a été faite en ne considérant que les élevages de moutons, de chèvres et de yaks. En tenant compte de l'ensemble des cheptels, ce poids global pourrait se chiffrer à presque 1 000 000 dollars U.S. par an [23].

Les Années de Vie Corrigées de l'Incapacité (AVCI) constituent un indicateur socioéconomique permettant également d'apprécier l'impact global d'une maladie. Il est calculé comme la somme des années de vie potentielles perdues en raison d'une mortalité prématurée et des années de vie productives perdues en raison d'incapacités. A l'échelle mondiale, l'AVCI de l'échinococcose kystique a été estimé à un million [3]. Pour comparaison, d'après l'Organisation Mondiale de la Santé, celui du paludisme lui serait 43 fois supérieur.

4.2. Echinococcose alvéolaire

4.2.1. Description

L'échinococcose alvéolaire est causée par le stade larvaire d'*E. multilocularis*. L'homme peut se contaminer en ingérant des œufs de ce parasite. Dans quasiment tous les cas, le métaceste se développe au niveau du foie [5]. Les symptômes sont très similaires à ceux causés par une tumeur maligne évoluant lentement. Cette ressemblance est due à la croissance infiltrante et destructrice du métaceste alvéolaire. Les lésions parasitaires peuvent varier de petits foyers de quelques millimètres à de larges aires de diffusion de 15 à 20cm de diamètre. Elles s'étendent de proche en proche, peuvent toucher les organes adjacents et parfois même, des organes plus distants. L'échinococcose alvéolaire peut demeurer asymptomatique durant de nombreuses années (généralement entre 5 et 15 ans). La mortalité est particulièrement importante en absence de diagnostic et de prise en charge médicale adaptée [24].

4.2.2. Distribution géographique

L'espèce *E. multilocularis* circule dans l'hémisphère nord, notamment en Europe centrale, dans une majeure partie de l'Eurasie du nord et centrale, en Asie de l'Est et dans certaines régions d'Amérique du Nord. (**Figure 14**) [5]. En Europe, elle serait présente dans des régions d'au moins 14 pays [11, 25]. Entre 1982 et 2000, 564 cas d'échinococcose alvéolaire y ont été recensés : 260 en France, 132 en Allemagne, 118 en Suisse et 54 en Autriche [26]. Entre 10 et 15 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année en France, principalement dans les régions de l'Est et le Massif central [27]. En raison de l'évolution lente de la maladie, les diagnostics souvent tardifs rendent difficile la détermination exacte de la période et de la source de contamination.

En Europe, les renards entrent de plus en plus dans les villes, sans doute en raison de l'accroissement actuel des populations vulpines. L'étude épidémiologique de ces renards indique l'urbanisation du cycle sauvage d'*E. multilocularis* : selon les foyers et les zones, entre 1 et 60% de ces renards sont porteurs du parasite [14, 25]. Ce phénomène pourrait

représenter un risque accru de contamination humaine par *E. multilocularis* et nécessiter des stratégies de lutte spécifiquement adaptées à cet environnement.

4.3. Echinococcose polykystique / néotropicale

4.3.1. Description

L'échinococcose polykystique est causée par les stades larvaires d'*E. oligarthrus* et *E. vogeli*. Le premier cas fut rapporté en 1903. La forme polykystique due à *E. vogeli* est généralement viscérale et le foie est l'organe le plus fréquemment touché. Le métacestode de cette espèce se caractérise par une croissance invasive et agressive. La forme polykystique due à *E. oligarthrus* peut également être viscérale mais elle touche plus souvent les muscles et la peau. Ces parasites sont tous les deux responsables de l'échinococcose polykystique mais ils diffèrent en termes d'épidémiologie, de manifestations cliniques et de morphologies des stades de développement. Actuellement, cette échinococcose reste encore relativement rare.

4.3.2. Distribution géographique

Les espèces *E. oligarthrus* et *E. vogeli* circulent en Amérique centrale et en Amérique du Sud. A ce jour, environ 200 cas d'échinococcose polykystique ont été recensés. La plupart ont été observés du Brésil à la Colombie mais cette maladie n'est endémique que du Nicaragua au Chili [28]. De plus, jusqu'à présent, elle n'a été rencontrée que dans des zones rurales.

5. ETUDE DE LA VARIABILITE GENETIQUE D'*E. GRANULOSUS* SENSU LATO

5.1. Introduction

Avant le développement des techniques et des outils de typage moléculaire, le polymorphisme des échinocoques étaient principalement évalué à partir de critères variés tels que la morphologie générale, la taille et la forme des crochets, la distribution géographique ou le spectre d'hôte [29-31]. Toutefois, une taxonomie basée uniquement sur de tels critères doit être considérée avec prudence. En effet, d'ordre phénotypique, ils peuvent être soumis à des influences plus ou moins variables, liées au biotope (les hôtes et l'environnement extérieur) et aux exigences du cycle biologique [32, 33].

Par la suite, les méthodes de typage de souches basées sur l'étude des isoenzymes ont permis d'identifier les souches sur des critères davantage liés à l'expression directe des gènes [34]. Leur variabilité est généralement analysée par migration électrophorétique sur un gel de polyacrylamide. Néanmoins, cette technique requiert une grande pureté des échantillons et s'avère moins fiable que l'analyse des séquences génétiques, en raison des influences extérieures tout de même présentes (expression modulable), mais aussi de la redondance du code génétique qui génère une perte d'information (mutations silencieuses).

Enfin, depuis quelques décennies, l'essor de la biologie moléculaire et particulièrement de la technique d'amplification de l'ADN (PCR) a permis de porter l'étude du polymorphisme du parasite à un tout autre niveau, celui du génome.

5.2. Les deux sources d'information génétique

5.2.1. Le génome mitochondrial

La mitochondrie a été décrite en 1857 par Kölliker (1817-1905). Cet organite semi-autonome joue un rôle primordial dans le métabolisme cellulaire. Selon la théorie endosymbiotique, il descendrait d'une protéo-eubactérie libre (symbiote), qui aurait progressivement fusionné avec une archéobactérie (hôte) [35, 36]. La protéo-eubactérie aurait

également transféré la majeure partie de son matériel génétique au sein du noyau de l'archéobactérie créant ainsi, au fil de l'évolution, des relations étroites entre le génome mitochondrial et le génome nucléaire.

Les échinocoques présentent un génome mitochondrial circulaire et haploïde (**Figure 18**). Comptant environ 13 500pb, il se compose de 12 gènes codants, de 2 séquences d'ARN ribosomal et de régions non codantes, petites et peu nombreuses (**Figure 19**) [37]. Sa réplication étant clonale, il ne subit pas ou peu de recombinaisons génétiques. La principale source de polymorphisme réside donc dans la survenue et le maintien de mutations ponctuelles en son sein. Ces dernières sont des erreurs commises par l'ADN polymérase durant la réplication du génome. En raison d'un système mitochondrial de correction moins efficace que celui du noyau, de nombreuses mutations plus ou moins délétères s'y accumulent de manière irréversible. Ce principe, appelé « Muller's ratchet », pourrait être à l'origine du taux de mutations plus élevé du génome mitochondrial [35].

Ce polymorphisme important nous permet de définir d'excellents marqueurs de typage moléculaire à l'intérieur des unités codantes (gènes) de ce génome. Ces derniers peuvent être utilisés pour identifier un individu, définir des populations, retracer leur histoire génétique et construire des phylogénies taxonomiques [38]. Deux d'entre eux sont couramment utilisés comme référence : le gène codant pour la sous unité 1 de la cytochrome c oxydase (*cox1*) et le gène codant pour la sous unité 1 de la NADH deshydrogénase (*nad1*) [39-42]. Ces deux protéines sont impliquées dans la respiration cellulaire.

Les espèces du genre *Echinococcus* montrent une variabilité intraspécifique très variable. Par exemple, contrairement à *E. multilocularis* [43], *E. granulosus* sensu lato présente une très grande hétérogénéité, si bien que plusieurs souches ont pu être définies [39, 40]. Les génomes de la plupart de ces variants ont récemment été déterminés dans leur totalité (**Figure 19**) [44, 45].

5.2.2. Le génome nucléaire

Dans les cellules eucaryotes, la majeure partie de l'information génétique est localisée dans le noyau. Le génome nucléaire est discontinu : les gènes qui le composent sont formés par intermittence de parties codantes (les exons) et de parties non codantes (les introns). Les échinocoques sont des organismes exclusivement diploïdes (2n). Ils possèdent huit paires de chromosomes (2n=16) [47].

Chez les eucaryotes, 90% du génome nucléaire est non codant et constitué de séquences classées en trois types selon leur nombre de copie et leur distribution dans le génome. Par exemple, les séquences dites satellites sont répétées de nombreuses fois. Elles sont soit localisées au niveau des régions centrométriques ou subcentrométrique des chromosomes, soit dispersées. Dans ce second cas, elles sont divisées en deux catégories : les minisatellites (séquences de 100 à 20 000 nucléotides présentant un motif répété de quelques dizaines de nucléotide) et les microsatellites (séquences plus petites présentant un motif répété de deux à cinq nucléotides). Au cours de cette recherche, nous nous sommes exclusivement intéressés aux séquences microsatellites. Le génome nucléaire présente également des éléments génétiques mobiles qui peuvent se déplacer d'une séquence à une autre.

Qu'elles soient microsatellites ou non, les séquences qui constituent le génome nucléaire sont sujettes aux mutations et aux recombinaisons génétiques. Ces événements modifient l'enchaînement des nucléotides de ces séquences mais à un autre niveau, peuvent en modifier la structure et la conformation spatiale. Dans le cas particulier d'un microsatellite, le nombre de ses copies dans le génome et le nombre de répétition du motif à l'intérieur de chacune d'elles peuvent varier. Il en résulte que l'étude du polymorphisme nucléaire peut se faire suivant différentes approches.

Dans le cas de séquences non microsatellites, *ITS-1*, *ITS-2*, *AgB*, *ActII*, *Hbx* et *Mdh* sont parmi les marqueurs les plus communément utilisés.

- *ITS-1* et *ITS-2* sont deux espaceurs transcrits internes (*Internal Transcribed Spacer*) [48-52]. L'ADN ribosomal montre une structure étendue et complexe. Il est composé typiquement d'un grand nombre d'unités de répétition séparées par un espaceur intergénique. Une unité de

répétition contient une copie du gène codant pour chaque ARN ribosomique constituant les ribosomes, séparée l'une de l'autre par un espaceur transcrit interne.

- L'antigène B (AgB) est l'antigène majeur d'*E. granulosus* sensu lato. Cette lipoprotéine est codée par une famille qui comprendrait pas moins de 7 gènes [53]. Quatre de ces gènes ont déjà été caractérisés : *AgB1* à *AgB4* [54-57]. Cet antigène joue un rôle sans doute central dans les interactions tissulaires entre le parasite et l'hôte.
- L'actine intervient dans les mouvements cellulaires. Les gènes de cette protéine et de ses éléments de régulation transcriptionnelle s'expriment différemment suivant les besoins des stades de développement parasitaire et les conditions environnementales. *EgActI* et *EgActII* sont des régions régulatrices *cis* pour deux de ces gènes [58].
- Un gène possédant une homéoboîte en amont code généralement pour un facteur de transcription destiné à activer en cascade d'autres gènes. Une recherche de ce type de gène a été menée chez *E. granulosus* sensu lato et cinq homéoboîtes ont été caractérisées : *Hbx1* à *Hbx5* [59].
- La malate deshydrogénase est une protéine enzymatique présente sous forme de diverses isoenzymes (structure différente mais fonction identique) dans des compartiments cellulaires différents. Elle intervient dans la physiologie cellulaire. Le gène *Mdh1* code pour une forme cytoplasmique de l'enzyme [60-64] tandis que le gène *Mdh2* code pour une forme mitochondriale.

5.3. Analyse du polymorphisme génétique

5.3.1. L'amplification de séquences d'ADN (PCR)

Première étape à de nombreuses analyses génétiques, l'amplification de séquences d'ADN par *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) permet de dupliquer de manière exponentielle la séquence à étudier (technique imaginée par K. Mullis en 1985 - Prix Nobel en 1993). Le principal avantage de la PCR est qu'elle permet de travailler à partir de très faibles quantités de matériel génétique. Pour sa réalisation, il est nécessaire d'utiliser une ADN polymérase pouvant résister à de fortes températures (jusqu'à 92°C). Identifiée et isolée à partir de la

bactérie des sources chaudes *Thermophilus aquaticus*, la Taq polymérase répond à ce critère. La réaction nécessite également des amorces venant s'hybrider sur la matrice spécifiquement de part et d'autre de la séquence à amplifier, afin d'en assurer l'élongation par la polymérase. En présence de nucléotides triphosphates (dNTP) et dans les conditions optimales d'activité (72°C), l'enzyme est capable de reproduire cette séquence. La PCR repose sur une succession de cycles découpés en 3 étapes : la séparation des doubles brins d'ADN (dénaturation), la fixation des amorces sur les brins libérés (hybridation) et à partir de ces amorces et du brin matrice, la duplication de la séquence par complémentarité (élongation). Dans les conditions optimales, au bout de x cycles, cette séquence sera amplifiée 2^{x-1} fois. Autre particularité, cette technique peut également permettre de marquer les fragments produits, si au moins l'une des amorces utilisées est porteuse d'une molécule fluorescente.

5.3.2. Le séquençage

Les mutations et les recombinaisons génétiques occasionnent un polymorphisme au niveau de l'enchaînement nucléotidique des séquences d'ADN. Le séquençage est une technique qui permet de déterminer cet enchaînement et ainsi, de déceler toute modification. Généralement, la séquence d'intérêt est au préalable amplifiée par une PCR classique et ce sont les fragments produits par cette réaction qui sont utilisés pour le séquençage. Cette étape permet d'obtenir un meilleur rendement et de meilleurs résultats.

Le séquençage est ensuite réalisé, le plus souvent par la méthode de Sanger. Celle-ci présente de grandes similitudes avec une amplification par PCR. Après dénaturation des brins d'ADN, la réaction est initiée par l'hybridation d'une amorce sur le brin matrice. A partir de là, l'élongation de cette amorce s'effectue grâce à une polymérase spécifique, la séquenase. Durant cette étape, les quatre désoxynucléosides (dNTP) présents dans le milieu réactionnel sont incorporés au brin synthétisé. Toutefois, ce milieu contient également quatre didésoxynucléosides (ddNTP), en quantité plus faible. Une fois incorporés, ces ddNTP empêchent la poursuite de l'élongation et entraînent donc la production de fragments de taille variable. Le ratio de concentration de dNTP/ddNTP est tel que chaque position nucléotidique est représentée par un fragment de taille correspondante. Comme les quatre ddNTP sont marqués par des fluorochromes différents, il est possible d'identifier le dernier nucléotide

incorporé. Grâce à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide, les fragments sont séparés suivant leur taille et leur fluorescence est évaluée. La séquence d'intérêt sera ensuite reconstituée puis comparée avec les divers génotypes répertoriés dans les bases de données existantes.

5.3.3. L'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD)

L'amplification aléatoire d'ADN polymorphe consiste en une réaction PCR dans laquelle l'expérimentateur utilise des amorces définies arbitrairement et ne choisit donc pas au préalable la séquence qui sera amplifiée. Les fragments produits sont ensuite séparés suivant leur taille grâce à une électrophorèse sur gel d'agarose. Celle-ci produit un profil spécifique, pouvant varier d'un individu à un autre. La RAPD peut être précédée d'une PCR classique afin de délimiter une zone d'étude et pour un meilleur rendement et suivie du séquençage des fragments obtenus. L'intérêt majeur de la RAPD est qu'elle ne nécessite pas de connaître en détail le brin matrice. La technique permet donc de caractériser des échantillons pour lesquels peu d'informations sont disponibles. Une des limites de cette technique est qu'elle ne produit des résultats exploitables que si le matériel génétique de départ n'est pas endommagé. Les conditions pour obtenir une bonne reproductibilité sont également très exigeantes. L'amplification possible de l'ADN de l'hôte, la multiplicité des bandes obtenues et la comparaison très délicate entre laboratoire sont autant d'inconvénients qui expliquent le recours fréquent à des techniques plus accessibles et plus fiables.

La technique RAPD permet de distinguer plusieurs souches au sein de l'espèce *E. granulosus* (sensu lato) [65, 66].

5.3.4. Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP)

Pour une enzyme de restriction, la distance entre deux sites de coupure peut varier d'un individu à un autre (du fait de mutations ou de recombinaisons). Lorsque les produits d'une restriction sont séparés suivant leur taille par électrophorèse, le profil de migration obtenu peut donc montrer un polymorphisme spécifique. Néanmoins, le peu de sites de

restriction caractérisés et la difficile comparaison des résultats entre laboratoire sont les limites majeures de cette technique. La RFLP peut aussi être précédée d'une amplification par PCR classique afin de délimiter une zone d'étude et pour un meilleur rendement et suivie du séquençage des fragments obtenus.

La technique RFLP permet de distinguer plusieurs souches au sein de l'espèce *E. granulosus* (sensu lato) [51, 67].

5.3.5. Polymorphisme de conformation des simples brins (SSCP)

L'étude du polymorphisme de conformation de simples brins consiste en une séparation électrophorétique de fragments d'ADN dénaturés. Cela permet de différencier sur la base d'une seule mutation, des séquences de plus de 500 nucléotides. Comme précédemment, la SSCP peut aussi être précédée d'une amplification par PCR classique afin de délimiter une zone d'étude et pour un meilleur rendement et suivie du séquençage des fragments obtenus.

Cette technique a été utilisée dans plusieurs travaux menés sur l'espèce *E. granulosus* (sensu lato) et a parfois mis en évidence des profils hybrides entre plusieurs souches du parasite [52, 68-71].

5.3.6. Analyse de séquences microsatellites

Les microsatellites sont de petits fragments d'ADN présents dans le génome nucléaire. Ils ont la particularité de présenter un motif de un à six nucléotides, répété en tandem un certain nombre de fois. Ce nombre est à la base du polymorphisme de taille souvent important des microsatellites.

La technique d'analyse de fragments permet l'étude de ce polymorphisme. La séquence cible est amplifiée par PCR à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques s'hybridant dans les régions flanquantes très conservées du microsatellite [72]. L'une des deux amorces est marquée par un fluorochrome spécifique. Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse en présence d'un marqueur de poids moléculaire, permettant de déterminer la taille des fragments séparés. Une lecture colorimétrique détecte les signaux de fluorescence

émis par l'amorce incorporée au fragment durant la PCR. La position des signaux de fluorescence est calibrée à partir du marqueur de poids moléculaire, permettant ainsi de déterminer la taille en paire de bases des fragments amplifiés.

Dans la littérature, seules deux études rapportent l'identification ou l'utilisation de microsatellites sur des échantillons *E. granulosus* sensu lato. Ces microsatellites sont au nombre de quatre : *EgSca1*, *EgSca2*, *EgSga1* et *U1 snRNA*. La localisation précise dans le génome et la fonction des trois premiers ne sont pas encore connues [73]. *U1 snRNA* est un gène qui code pour un snRNA, un petit ARN nucléaire d'une centaine de nucléotides. Celui-ci est toujours fixé à une protéine et joue un rôle dans la maturation des ARN pré-messagers et dans le transport des ARN messagers vers le cytoplasme. Une étude chez *E. multilocularis* a montré que le gène *U1 snRNA* était répété en tandem plus de 50 fois dans le génome nucléaire. Chaque copie est longue de 1300 pb et se compose d'une région codante de 156 pb ainsi que d'espaces présentant des motifs répétés de trois à cinq pb [74]. Concernant *E. granulosus* sensu lato, *U1 snRNA* a déjà été employé afin d'évaluer le polymorphisme de quatre souches du parasite [75].

Plusieurs autres microsatellites ont servi à l'étude du polymorphisme génétique d'*E. multilocularis* et pourraient présenter un intérêt pour celle d'*E. granulosus* sensu lato.

Les microsatellites simples EMms1 (nommé aussi NAK1) et EMms2 sont constitués de motifs répétés de trois nucléotides [76]. Cette étude, portant sur 104 échantillons prélevés sur 13 renards japonais (huit vers par renard), a permis l'identification de quatre allèles pour EMms1 et deux allèles pour EMms2. Des profils identiques ont été obtenus chez des renards différents mais un même renard pouvait montrer des profils différents (contaminations multiples). Des profils mixtes ont également été rapportés, ce qui suggère des recombinaisons génétiques entre différents variants du parasite.

Récemment, la réalisation d'une banque d'ADN génomique à partir d'échantillons *E. granulosus* a permis l'identification de trois microsatellites : EmsJ, EmsK et EmsB [77, 78].

EmsB est un microsatellite multilocus. En effet, il se compose de plusieurs unités disposées en tandem et dont chacune comporte un motif répété composé de (CA) et de (GA) [77]. En analyse de fragment PCR, ce microsatellite produit un profil électrophorétique composé de plusieurs pics. Son polymorphisme est double : le nombre d'unités le composant peut varier tout comme le nombre de répétition du motif au sein de chacune d'elles. Malgré sa

complexité, EmsB montre les caractéristiques nécessaires à tout outil de typage : sensibilité, spécificité, reproductibilité, répétabilité, stabilité dans le temps et pouvoir discriminant. Grâce à ce pouvoir discriminant, EmsB a en effet permis d'isoler des échantillons *E. multilocularis*, à différentes échelles géographiques [78-82].

Les microsatellites EmsK et EmsJ sont simple-locus. Par conséquent, en analyse de fragment PCR, ils produisent des profils composés d'un seul pic. Dans le cas de ces séquences, un profil présentant un seul pic est considéré comme homozygote tandis qu'un profil présentant deux pics est considéré comme hétérozygote. Plusieurs allèles ont été identifiés en étudiant diverses populations *E. multilocularis* [78, 81, 82].

Récemment, les microsatellites EmsB, EmsK et EmsJ ont pu être trouvées dans la séquence complète du génome nucléaire d'*E. multilocularis* (proposée par l'Institut Sanger). Cela a permis de confirmer la multiplicité et la disposition en tandem des locus EmsB, ainsi que l'unicité des locus EmsK et EmsJ.

5.3.7. Homoplasie et conséquences sur les analyses génétiques

Le concept d'homoplasie s'applique lorsque la présence d'un même caractère chez deux espèces différentes n'est pas due au partage d'une espèce ancestrale commune mais à la survenue d'événements de convergence, de parallélisme ou de réversion. Ce phénomène a récemment attiré l'attention des généticiens des populations car il peut conduire à une perte d'information, notamment en typage génétique. Cette question s'est particulièrement posée dans le cas des microsatellites. En effet, dans différents profils d'électrophorèse, le même pic peut être le résultat de combinaisons nucléotidiques différentes au niveau des répétitions du motif. Toutefois, Estoup *et al.* ont démontré que cette homoplasie ne représentait pas un problème significatif pour la plupart des analyses de génétique moléculaire car, généralement, l'importante variabilité des microsatellites parvient à compenser cette perte d'information [83].

6. VARIABILITE GENETIQUE D'*E. GRANULOSUS* SENSU LATO ET TAXONOMIE

6.1. Pourquoi l'étudier ?

Bien qu'étant l'unité de base de la diversité biologique, la notion d'espèce n'est pas unique. En effet, pas moins de 24 concepts différents auraient été énoncés à ce jour [84]. Le plus connu est doute celui exposé par Mayr en 1963 qui affirme qu'une espèce doit regrouper des individus interféconds entre eux et ne pouvant se reproduire avec des individus desquels ils sont isolés. Par conséquent, lorsqu'une nouvelle espèce est décrite, pour démontrer sa conformité à la définition de Mayr, il faudrait s'assurer de l'isolement reproductif de cette espèce vis-à-vis d'autres espèces très proches.

Etant donné que les parasites du genre *Echinococcus* se reproduisent principalement par autofécondation [62], ce concept d'espèce devient difficilement démontrable. Voilà pourquoi, depuis des décennies, en fonction des critères choisis et des techniques d'analyse, la taxonomie des échinocoques n'a eu de cesse de changer. De la fin des années 1960 au début du siècle, le rang d'espèce n'avait été attribué qu'à quatre ensembles de variant : *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. vogeli* et *E. oligarthrus*. Depuis, bien que les études moléculaires aient globalement confirmé cette discrimination, elles ont mis en évidence une importante variabilité intraspécifique chez *E. granulosus* et remis en cause la monophylie de ce groupe (*E. granulosus* sensu lato) [85].

Evaluer et caractériser cette variabilité génétique est important, non seulement en taxonomie mais également en épidémiologie. En effet, en plus de leur simple identification, une meilleure connaissance des variants circulant dans un foyer donné peut permettre de (i) mieux définir les populations animales potentiellement touchées (en fonction du spectre d'hôte), (ii) déterminer la source probable de leur contamination et (iii) estimer le risque de transmission à l'homme. Cela peut aboutir à un meilleur ciblage des actions de lutte contre l'échinococcose kystique comme par exemple, diriger les efforts de prévention, de surveillance et de contrôle sur les ovins et les bovins afin de lutter spécifiquement contre la pérennisation et la propagation de la souche ovine [86].

6.2. Des souches ...

Dans le cas d'*E. granulosus* sensu lato, une souche regroupe des variants qui diffèrent les uns des autres par au moins un caractère épidémiologiquement significatif ou qui pourrait avoir son importance dans la lutte contre l'échinococcose kystique [87]. Les souches d'*E. granulosus* sensu lato peuvent beaucoup varier en termes de morphologie, de biochimie, de physiologie, de pathogénicité, de développement et d'infectiosité pour l'homme et pour les animaux.

Depuis une vingtaine d'année et l'essor de la biologie moléculaire, la classification d'*E. granulosus* sensu lato s'est peu à peu reconstruite et étoffée à partir d'études génétiques. Onze souches ont été identifiées. Leurs caractéristiques sont présentées en **Tableau 2** et leurs distributions géographiques illustrées dans les **Figure 20 à 24**.

- La souche ovine commune est la plus répandue et la souche la plus fréquemment retrouvée chez l'homme [88]. Elle a été identifiée chez un grand nombre d'hôtes différents, même si les ovins et les bovins restent particulièrement touchés. L'étude génétique a permis l'identification du génotype G1 [39, 40].
- En Tasmanie (état insulaire proche de l'Australie) et en Amérique du Sud, des particularités morphologiques et génétiques ainsi qu'un raccourcissement de la période prépatente ont permis de différencier une autre souche ovine, très proche de la précédente : la souche ovine de Tasmanie [39, 68]. Cette souche a été reconnue, pour la première fois, responsable d'une lésion humaine en 1999 en Argentine [68]. Depuis, cette souche a également été rapportée en Europe [8]. L'étude génétique a permis l'identification du génotype G2, très proche de G1 [39, 40].
- Une autre souche a été observée en Inde. Produisant un grand nombre de kystes fertiles dans les poumons de buffle, elle a été qualifiée de souche du buffle [89]. L'étude génétique a permis l'identification du génotype G3, également très proche de G1 [39, 40]. A ce jour, aucune donnée concernant son infectiosité pour l'homme n'est disponible.
- La souche équine montre une infectiosité plus importante que la souche ovine pour les chevaux mais à l'inverse, une infectiosité moindre pour les hommes. L'étude génétique a permis l'identification du génotype G4 [39, 40]. A ce jour, aucun cas humain dû à cette souche n'a été rapporté.

- La souche bovine présente une morphologie particulière du strobile et un développement rapide de la forme adulte. L'étude génétique a permis l'identification d'un génotype G5 [39, 40]. Le premier cas impliquant directement cette souche a été rapporté en Hollande en 1992 [90].
- La souche cameline est généralement observée chez des camélidés (dromadaire, lama ...). L'étude génétique a permis l'identification d'un génotype G6 [39, 40]. Cette souche a été jugée responsable de cas humains en Mauritanie, en Iran, en Argentine, au Népal et en Afrique de l'Est [68, 91-93].
- La souche porcine a également été impliquée dans des cas humains d'échinococcose kystique en Europe de l'Est [94, 95]. L'étude génétique a permis l'identification d'un génotype G7, très proche de G6 [39, 40]. Ce génotype G7 a été observé à l'identique chez des échantillons mexicains et des échantillons polonais [52]. Bien que la souche porcine présente une circulation restreinte, l'observation précédente suggère une histoire commune entre ces deux foyers.
- En Amérique du Nord et dans le nord de l'Eurasie, la souche des cervidés G8 implique le loup comme HD et les cervidés comme HI [96]. Certains auteurs la considèrent comme ancestrale [97]. Elle peut être infectante pour l'homme [98].
- En caractérisant des isolats humains et porcins collectés en Pologne, Scott *et al.* identifièrent une seconde souche porcine G9, très proche de G7 [99].
- En Finlande, Lavikainen *et al.* ont décrits un second variant circulant chez des cervidés, la souche des cervidés G10 [51]. A ce jour, aucune donnée concernant son infectiosité pour l'homme n'est disponible.
- Enfin, une dernière souche a été identifiée en Afrique. Son cycle biologique, exclusivement sauvage, implique le lion et peut-être les hyènes comme HD et les herbivores sauvages de la savane comme HI. D'abord définie comme une espèce à part entière, elle a ensuite été reclassée comme une souche d'*E. granulosus*. En raison de son isolement géographique et de ses hôtes pour la plupart protégés, cette souche du lion n'a pu être caractérisé que tardivement [100]. A ce jour, aucune donnée concernant son infectiosité pour l'homme n'est disponible.

Ces souches ne sont pas équidistantes les unes des autres au niveau génétique (**Figure 25**). De plus, le statut de souche étant taxonomiquement invalide, une formalisation était donc nécessaire. Cette classification a donc été repensée.

| Désignation | | | Hôtes intermédiaires et accidentels | Hôtes définitifs | Distribution géographique probable (Figure 20 à Figure 24) |
|--------------------------|------------------------|--|---|-------------------------------------|--|
| Ancienne classification | Génotype mitochondrial | Nouvelle classification | | | |
| Souche ovine commune | G1 | <i>Echinococcus granulosus</i> sensu stricto | Caprinés, bovinés, suidés, camélidés, macropodidés, homme | Chien, renard, dingo, chacal, hyène | Cosmopolite |
| Souche ovine de Tasmanie | G2 | | Caprinés, bovinés, homme | Chien, renard ? | Tasmanie, Argentine, Europe |
| Souche du buffle | G3 | | Caprinés, bovinés, homme | Chien, renard ? | Asie, Europe |
| Souche équine | G4 | <i>Echinococcus equinus</i> | Equinés | Chien | Europe, Moyen-Orient, Afrique, Amériques, Nouvelle-Zélande ? |
| Souche bovine | G5 | <i>Echinococcus ortleppi</i> | Bovins, homme | Chien | Europe, Amérique du Sud, Afrique centrale et du Sud, Asie du Sud, Fédération de Russie |
| Souche cameline | G6 | <i>Echinococcus canadensis</i> | Camélidés, caprinés, bovinés, homme | Chien | Moyen-Orient, Afrique, Asie centrale, Amérique du Sud |
| Souche porcine | G7 / G9 | | Suidés, homme | Chien | Europe, Fédération de Russie, Amérique du Sud |
| Souche du cervidé | G8 / G10 | | Cervidés, homme | Loup, chien | Amérique du Nord, Eurasie |
| Souche du lion | - | <i>Echinococcus felidis</i> | Equinés, Antilopins, Bovins, Giraffidés, Hippopotamidés | Lion | Afrique |

Tableau 2. Caractéristiques générales des différentes souches de l'espèce *E. granulosus* sensu lato.

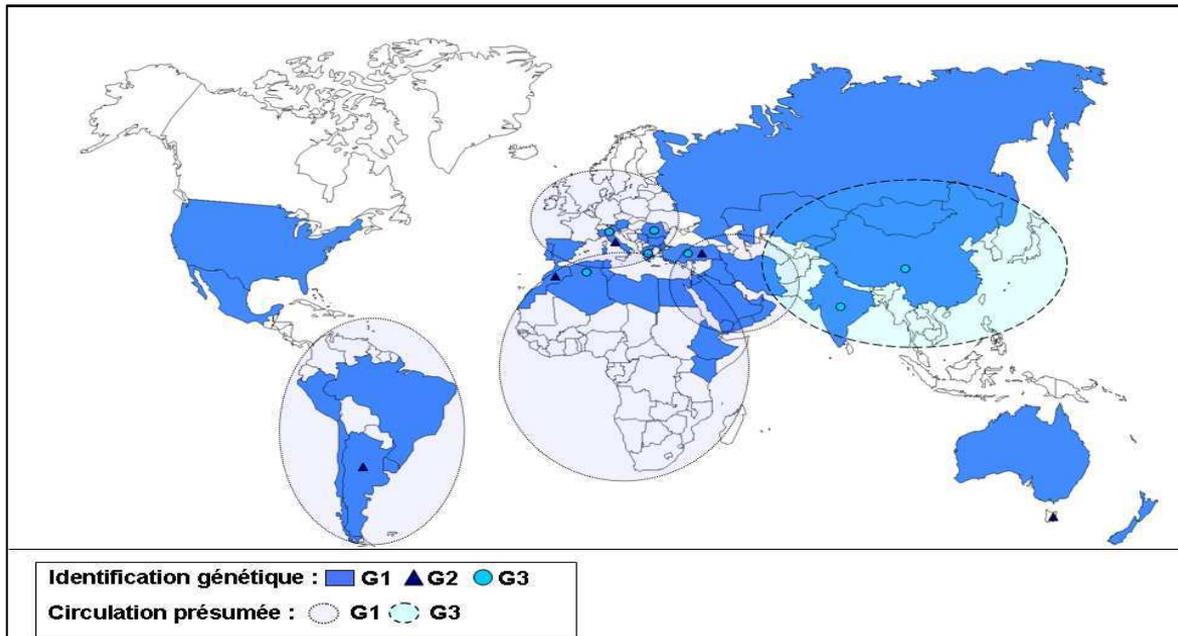


Figure 20. Distribution géographique des souches ovine commune G1, ovine de Tasmanie G2 et du buffle G3.

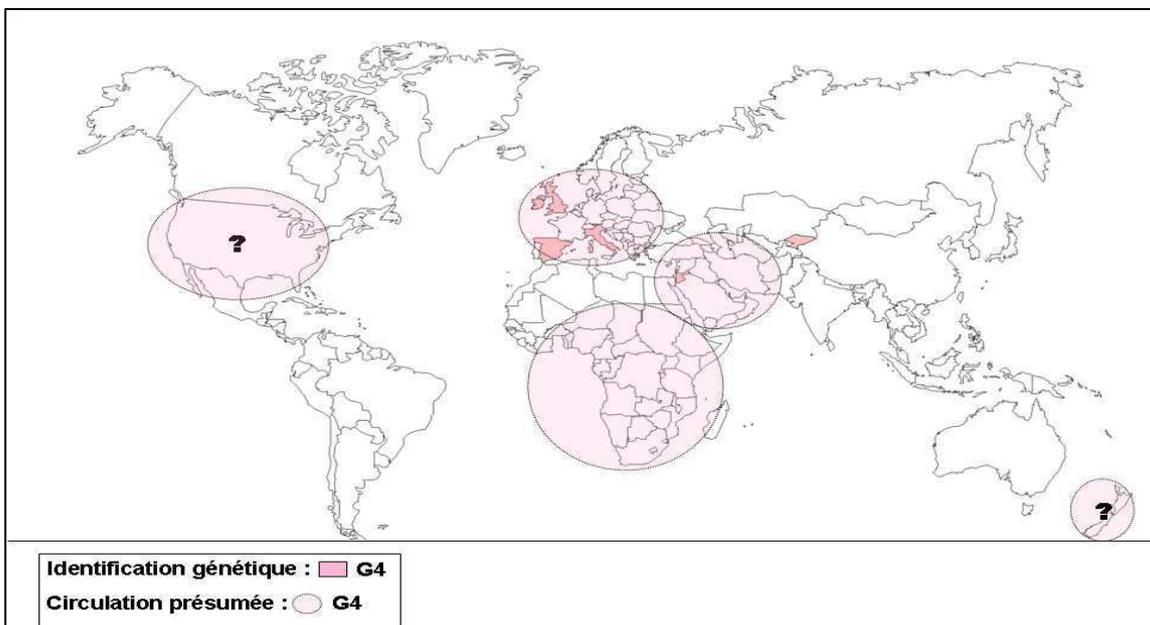


Figure 21. Distribution géographique de la souche équine G4.

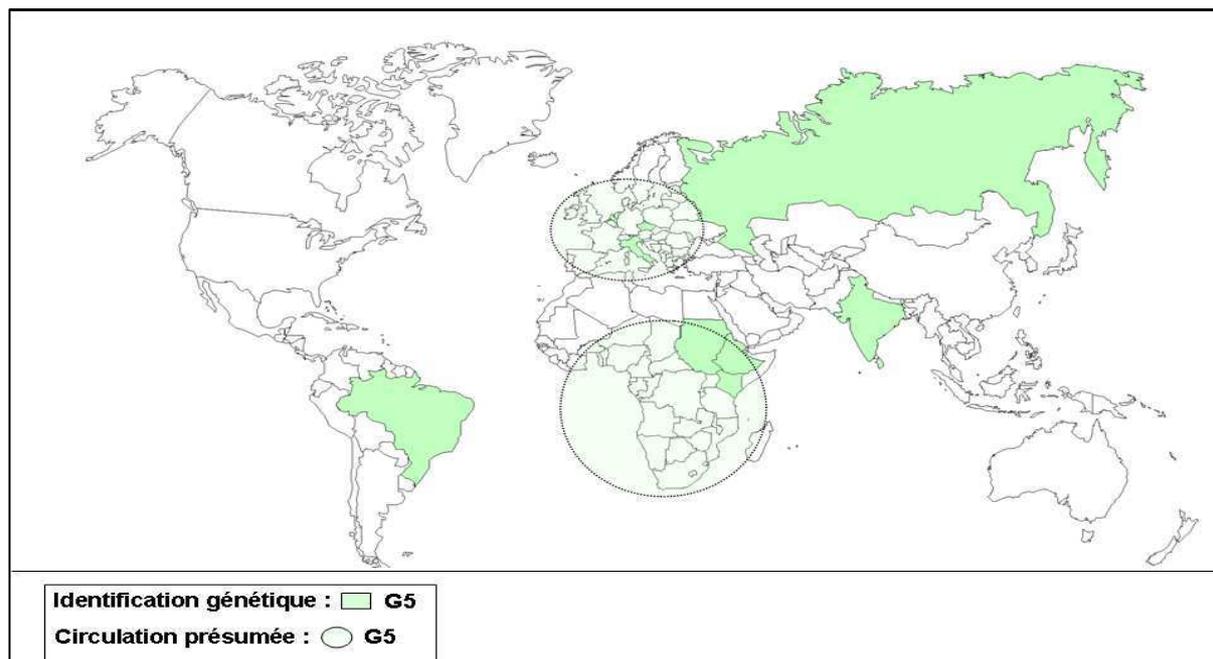


Figure 22. Distribution géographique de la souche bovine G5.

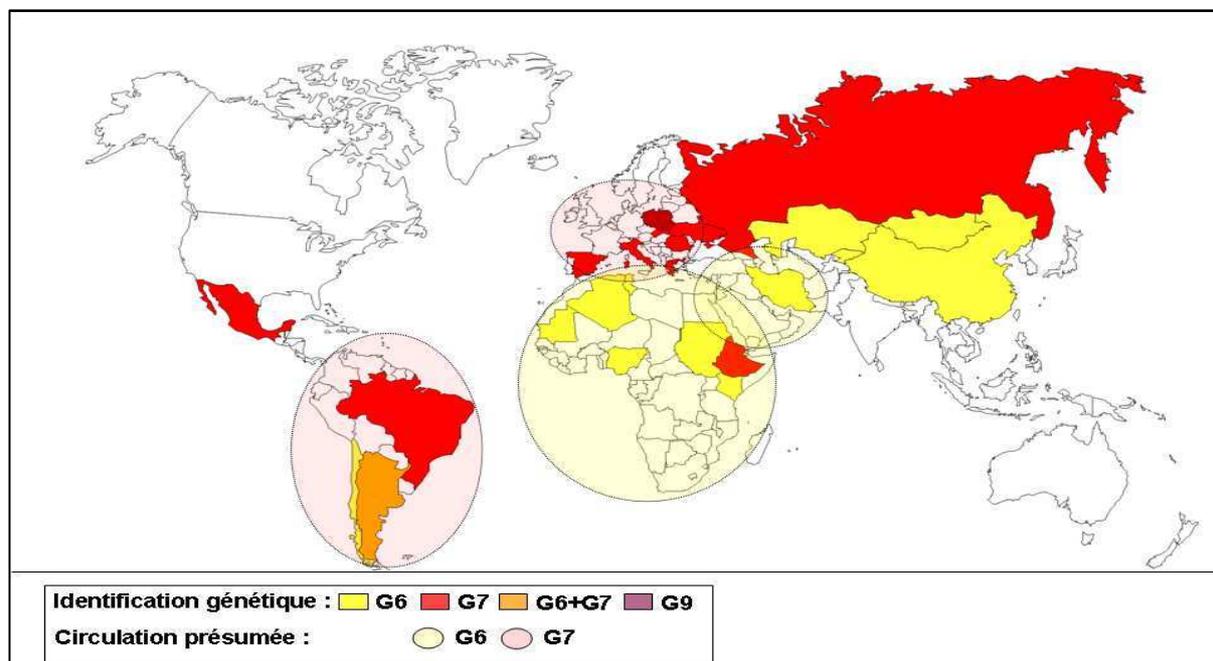


Figure 23. Distribution géographique des souches cameline G6 et porcines G7/G9.

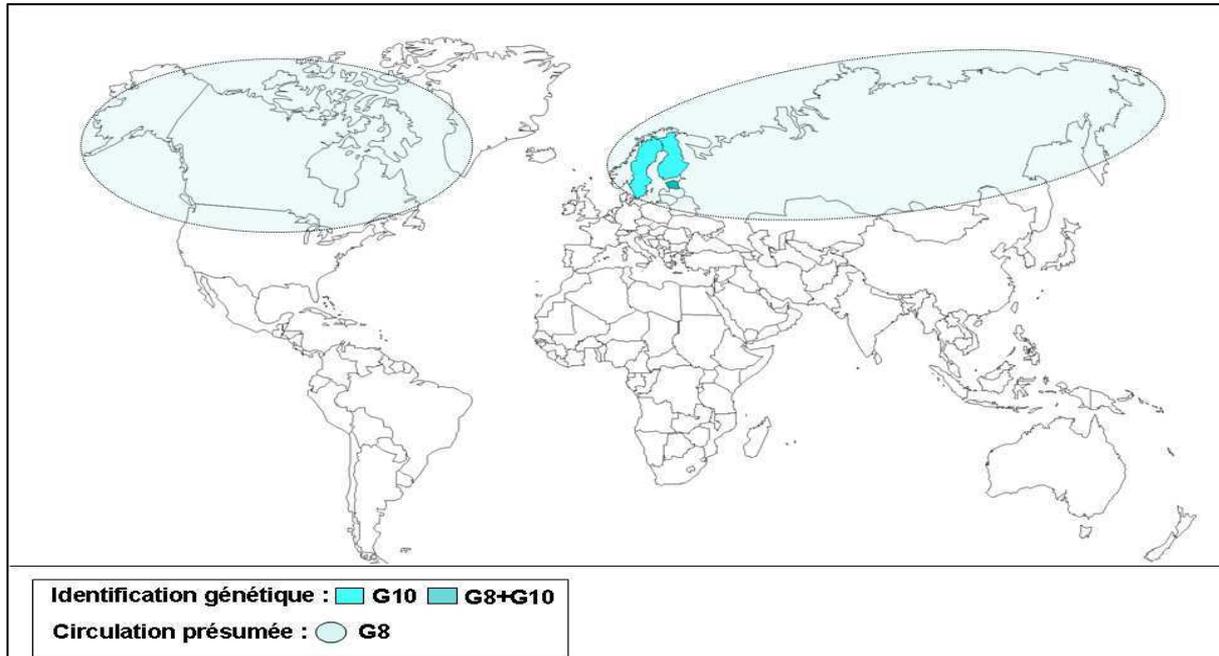


Figure 24. Distribution géographique des souches de cervidés G8 et G10.

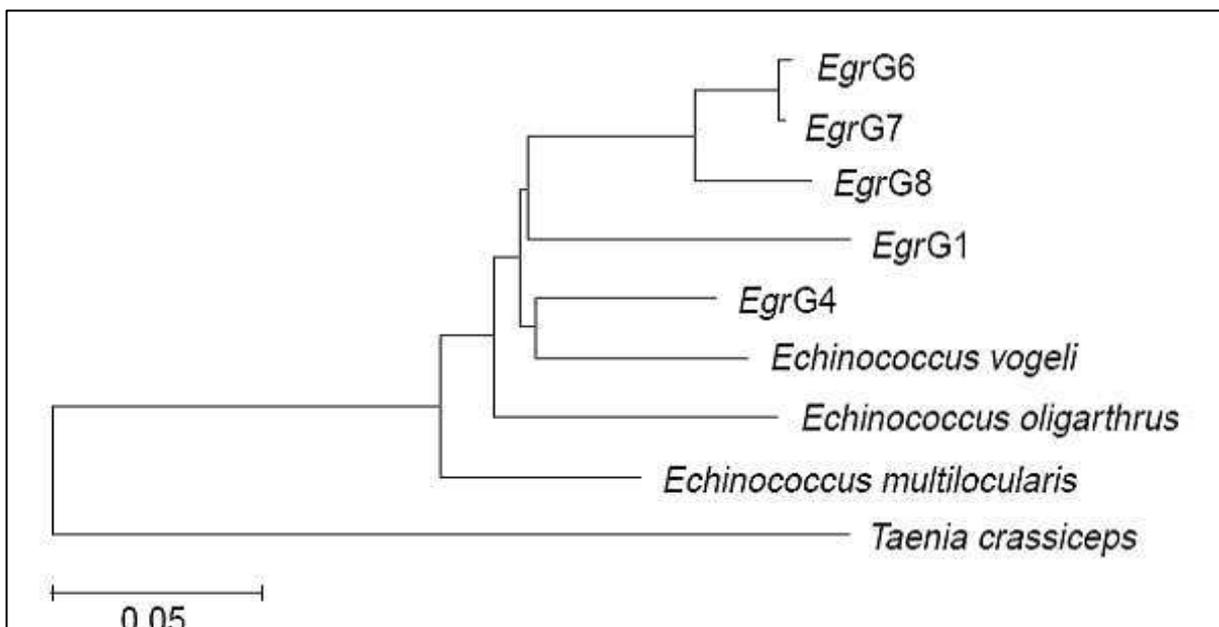


Figure 25. Position phylogénétique des 10 souches d'*E. granulosus* sensu lato. Ce dendrogramme a été tracé d'après les séquences nucléotidiques de trois marqueurs définis dans trois gènes mitochondriaux (*atp6*, *nad1* et *cox1*) [67]

6.3. ... aux espèces

Au fil des études génétiques, il est peu à peu apparu que le groupe *E. granulosus* sensu lato était paraphylétique et que sa variabilité était trop hétérogène pour n'être contenue que dans une espèce unique. Selon certains auteurs, la moindre variation génétique observée, aussi mineure soit elle, peut être corrélée avec une différence épidémiologique et peut donc justifier l'isolement du groupe qui la présente [39]. Néanmoins, plusieurs ensembles de souches se détachaient tellement les uns des autres que le rang d'espèce a finalement été suggéré, puis reconnu.

Les souches ovine G1, ovine de Tasmanie G2 et celle du buffle G3 sont aujourd'hui regroupées en une seule espèce, *E. granulosus* sensu stricto. La souche équine G4 et la souche bovine G5 sont devenues respectivement *E. equinus* et *E. ortleppi*. Le statut des souches G6 à G10 reste encore ambigu. Elles formeraient en effet un groupe suffisamment robuste sur le plan phylogénétique pour être reconnu comme une espèce, *E. canadensis* [66]. Cependant, une étude récente a montré qu'à l'intérieur même de ce groupe, il pouvait y avoir deux sous-ensembles (G6/G7/G9/G10 d'un côté et G8 de l'autre) [101]. Il a été estimé que la divergence entre *E. granulosus* sensu stricto et *E. canadensis* pouvait dater de 0,6 millions d'années ([43]). La souche du lion a été caractérisée très tardivement. Initialement définie comme une espèce en 1937, ce variant avait été ensuite reclassé en tant que souche d'*E. granulosus* sensu lato. Son étude génétique indique que son statut précédent était finalement plus approprié : la souche est redevenue une espèce, *E. felidis* [102].

A l'heure actuelle, la classification des échinocoques compte donc neuf espèces :

E. granulosus sensu stricto, *E. equinus*, *E. ortleppi*, *E. canadensis*, *E. felidis*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus*, *E. vogeli* et *E. shiquicus*.

6.4. Reproduction

De nombreuses études génétiques menées sur *E. granulosus* sensu lato ont cherché et cherchent encore à établir une nomenclature pertinente du parasite. Néanmoins, parmi elles, très peu utilisent des marqueurs nucléaires qui pourtant sont les seuls à pouvoir renseigner sur les recombinaisons génétiques et le niveau d'isollements reproductifs des différents variants.

L'échinocoque est un organisme diploïde hermaphrodite. Au sein du métacestode, les protoscolex sont produits par bourgeonnement de la membrane germinale (multiplication clonale). Au stade adulte, le parasite peut se reproduire par autofécondation ou par reproduction croisée. L'autofécondation reste toutefois prédominante [62]. Cette particularité est importante car même si le stade adulte se trouve isolé au niveau de la muqueuse intestinale de l'HD, il est quand même en mesure de produire des œufs et perpétuer ainsi son cycle biologique. Bien que rare, la reproduction croisée est toutefois nécessaire afin d'apporter au parasite un brassage suffisant pour enrichir son pool génique, lui assurer une évolution et l'acquisition de caractères adaptatifs. Il en résulte que les échinocoques présentent une prédominance d'homozygotes [103].

7. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

Un marqueur moléculaire pertinent en épidémiologie doit permettre la détection et l'identification d'un agent pathogène en vue d'une meilleure localisation et d'une meilleure appréciation de ses modes de circulation. Il doit répondre à un cahier des charges précis composés de six critères : sensibilité, spécificité, répétabilité, stabilité et pouvoir discriminant.

Dans le cadre de ce travail de thèse, l'objectif était de définir, grâce aux outils génétiques disponibles à l'heure actuelle, une approche permettant d'identifier des variants que nous pourrions suivre à différentes échelles géographiques mais aussi de discuter la taxonomie du parasite.

Pour cela, nous avons tout d'abord évalué les apports de différentes séquences polymorphes communément utilisées, par l'étude de deux foyers fortement touchés par l'échinococcose kystique (Afrique du Nord et République Populaire de Chine). Par la suite, nous nous sommes également intéressés à des marqueurs génétiques potentiellement très variables et informatifs, les microsatellites.

***I- ETUDE DU FOYER NORD-
AFRICAIN***

1. INTRODUCTION

Au début de ce travail de recherche, le groupe *E. granulosus* sensu lato comptait 11 souches différentes. Cette différenciation était faite à partir de caractéristiques variées telles que la distribution géographique, le spectre d'hôte ou encore l'infectiosité pour l'homme (**Tableau 2**).

La souche ovine G1 est fortement présente dans le bassin Méditerranéen et particulièrement dans les zones d'élevages semi-arides. La souche cameline est quant à elle, plus spécifique aux zones désertiques. La première est principalement hébergée par des ovins et des bovins tandis que la seconde l'est le plus souvent par des dromadaires. La souche G1 est responsable de la plupart des cas humains d'échinococcose kystique mais la souche G6 peut également être impliquée, comme cela a été rapporté en Mauritanie [91]. La distinction entre ces deux souches est donc très forte et cela explique que leur statut respectif soit actuellement fortement discuté [104]. Il est en effet question de savoir si elles se définissent comme de simples taxons intraspécifiques ou d'avantage, comme de véritables clades distincts et robustes, c'est-à-dire des espèces monophylétiques.

Les taxons sont des entités conceptuelles dont le but est d'individualiser, d'ordonner et de hiérarchiser des entités biologiques voisines à partir de caractères morphologiques, physiologiques, éthologiques, chorologiques et même moléculaires [105]. Le poids donné à chacun d'eux est laissé à l'appréciation des systématiciens. La cladistique initiée par Willi Hennig hiérarchise les caractères comparés. Ne sont en fait regroupés dans un même clade (espèce, genre, famille ...) que les êtres vivants qui partagent des caractères homologues c'est-à-dire attribués à une ascendance commune. Les homologues sont donc considérées comme des innovations évolutives partagées (synapomorphies). Dans le cas d'une définition cladistique des souches, celles-ci doivent se répartir en groupes bien différenciés et ne partager aucun recombinaison génétique (isolement reproductif) lorsqu'elles coexistent dans la même zone géographique (sympatrie).

En Afrique, seules quatre souches avaient été identifiées (**Figure 26**) : les souches ovine G1, équine G4, bovine G5 et cameline G6. Les souches ovine G1 et cameline G6 étaient particulièrement fréquentes dans le nord et l'est de l'Afrique [106]. Elles circulaient toutes les deux en Algérie et coexistaient même dans une zone particulière au dessus de la

bordure saharienne [7, 107]. Le foyer nord africain et plus particulièrement cette zone sympatrique offraient donc un terrain d'étude propice à la discussion du statut des souches ovine G1 et cameline G6.

2. DESCRIPTION DE L'ETUDE

Cette étude repose sur la caractérisation moléculaire de 71 échantillons *E. granulosus* sensu lato provenant de trois pays d'Afrique du Nord, l'Algérie (zone côtière urbanisée et zone pastorale située à la limite du Sahara), la Mauritanie et l'Ethiopie (**Figure 27**) et pour chacun de ces pays, de plusieurs types d'hôtes différents (Ovins, bovins, camelins et patients humains). Quatre cibles de typage ont été utilisées. Deux d'entre elles, *cox1* et *nad1*, sont les cibles mitochondriales communément utilisées pour identifier les différentes souches du parasite. Les deux autres, *actII* et *hbx2*, sont nucléaires et devaient permettre de mettre en évidence les éventuelles recombinaisons génétiques.

3. PUBLICATION

Publication 1 : Maillard, S., M. C. Benchikh-Elfegoun, J. Knapp, J. M. Bart, P. Koskei, B. Gottstein and R. Piarroux (2007). "Taxonomic position and geographical distribution of the common sheep G1 and camel G6 strains of *Echinococcus granulosus* in three African countries." *Parasitol Res* **100**(3): 495-503.

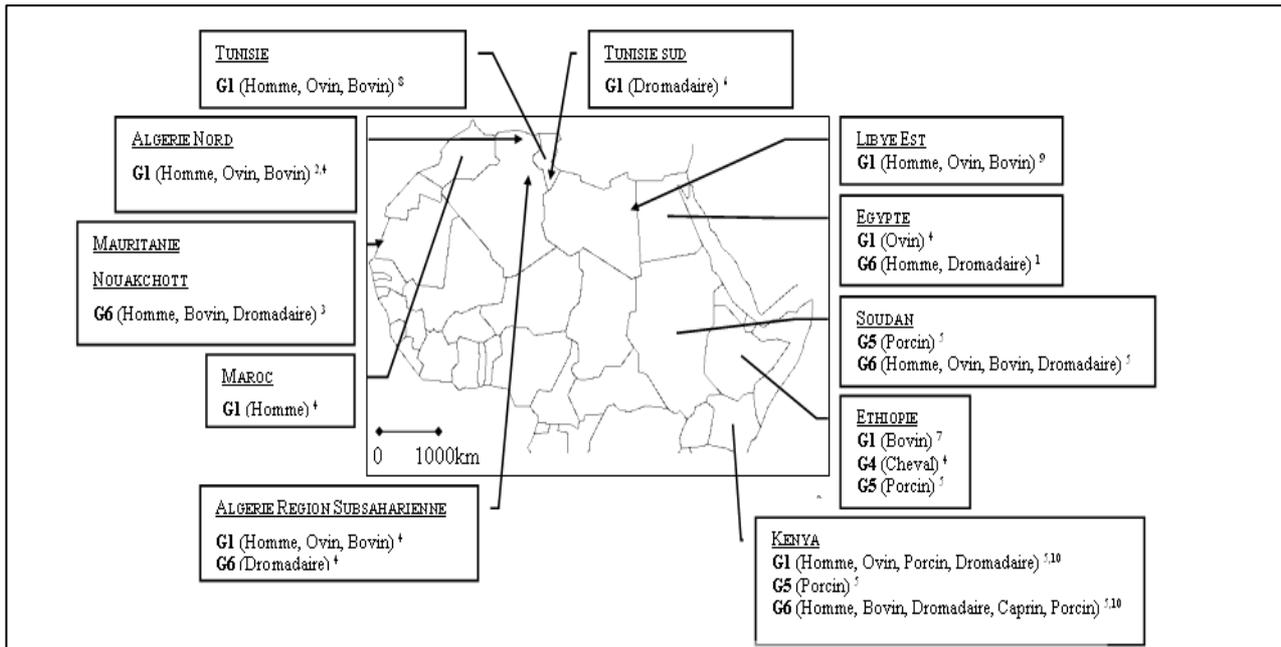


Figure 26. Les variants *E. granulosus* sensu lato en Afrique du Nord (2005).
¹ [108]; ² [91]; ³ [107]; ⁴ [7]; ⁵ [92]; ⁶ [65]; ⁷ [109]; ⁸ [61]; ⁹ [110]; ¹⁰ [111]

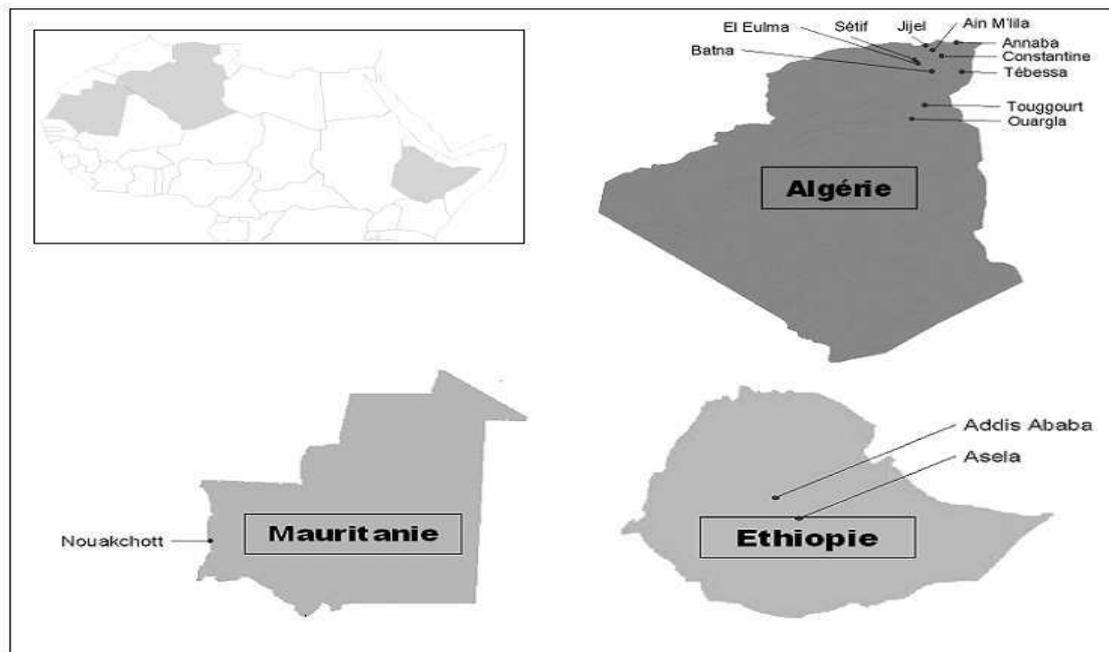


Figure 27. Foyer nord-africain : zone d'étude.

Taxonomic position and geographical distribution of the common sheep G1 and camel G6 strains of *Echinococcus granulosus* in three African countries

S. Maillard · M. C. Benchikh-Elfegoun · J. Knapp · J. M. Bart · P. Koskei · B. Gottstein · R. Piarroux

Received: 12 May 2006 / Accepted: 11 July 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract The taxonomic and phylogenetic status of *Echinococcus granulosus* strains are still controversial and under discussion. In the present study, we investigated the genetic polymorphism of *E. granulosus* isolates originating from three countries of Africa, including a region of Algeria, where the common G1 sheep and the camel G6 strains coexist sympatrically. Seventy-one hydatid cysts were collected from sheep, cattle, camels, and humans. Two mitochondrial markers (*cox1* and *nad1*) were used for strain identification. Two nuclear markers (*act11* and *hbx2*) were used to study the possible occurrence of cross-fertilization. Despite the heterogeneity observed among the G1 isolates, they were all localized within one robust cluster. A second strong cluster was also observed containing all of the G6

isolates. Both strains appeared as two distinct groups, and no cases of interbreeding were found. Thus, the attribution of a species rank can be suggested. We also found the Tasmanian sheep G2 strain for the first time in Africa. Because of the slight variations observed between the common sheep and the Tasmanian sheep strains, further studies should be carried out to elucidate the epidemiological relevance of this genetic discrimination.

Introduction

Cystic echinococcosis (CE), caused by the larval infection with the Cestoda *Echinococcus granulosus*, is a highly endemic zoonosis in the ruminant breeding areas of North Africa. The parasite is mainly transmitted in a synanthropic cycle generally involving dogs (large stray populations) and livestock animals (sheep, cattle, goats, and camels; Thompson and McManus 2001). DNA-based studies have shown that the species *E. granulosus* is composed of heterogeneous groups of genetic variants, defined as “strains” (McManus 2002). In various studies, strains were often characterized after polymerase chain reaction (PCR) amplification by sequencing mitochondrial markers in *cytochrome c oxidase 1* and *nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form; NADH) dehydrogenase 1* genes. Each identified haplotype, ranging from genotypes 1 to 10, was associated with particular host specificity and epidemiological patterns (Bowles and McManus 1993; Bowles et al. 1992; Thompson et al. 1995; Eckert and Thompson 1997). For example, the common sheep G1 strain is widespread and has been mainly identified in Mediterranean and semiarid breeding areas as being carried by sheep and cattle. In contrast, the

S. Maillard · J. Knapp · J. M. Bart · R. Piarroux
SERF (“Santé Environnement Rural-Université de Franche-Comté”),
Parasitology Department, University of Franche-Comté,
Besançon, France

M. C. Benchikh-Elfegoun
Laboratory of Parasitology, Veterinary Department,
University of Mentouri,
Constantine, Algeria

P. Koskei
Faculty of Veterinary Medicine,
Addis Ababa University,
Debre Zeit, Ethiopia

B. Gottstein
Institute of Parasitology, University of Bern,
Bern, Switzerland

S. Maillard (✉)
Laboratoire de Parasitologie, Equipe de recherche SERF,
Faculté de Médecine-Pharmacie,
19 Rue Ambroise Paré,
25000 Besançon, France
e-mail: maillard_steph@yahoo.com

camel G6 strain is often found in desert areas, carried by camels. Most human infections are due to the common sheep strain, whereas only a few cases have been attributed to the camel strain. For some authors, the definition of all the *E. granulosus* strains should be reassessed (Obwallner et al. 2004; Thompson et al. 2005). It has not yet been demonstrated that each strain forms a true clade (i.e. a monophyletic taxon) with a real epidemiological relevance. According to Tassy (1986), a taxon is a group of organisms recognized as a unit at each level of classification. Besides the differences in intermediate host specificity, geographic distribution, and genetic profiles, reproduction processes are also of importance in cladistics (Mayr et al. 1953). Up to now, *E. granulosus* strains have been mainly investigated by sequencing mitochondrial markers. Because of the asexual transmission (matrilineal origin) of the mitochondrial genes and the nonreticulated trait of the mtDNA molecules (Avisé and Walker 1999), this method cannot be used for investigation of heterozygote patterns which evoke cross-fertilization.

In North and East Africa, two strains, the common sheep and camel, are widespread (Sadjadi 2005). The sheep strain, the most infective for humans, has been described in Morocco and northern Algeria (Bart et al. 2004), in Kenya (Wachira et al. 1993; Dinkel et al. 2004), in Sudan (Dinkel et al. 2004), in Tunisia (Tashani et al. 2002; Lahmar et al. 2004; M'Rad et al. 2005), in Egypt (Macpherson and Wachira 1997), and in Libya (Tashani et al. 2002). In these studies, the sheep strain has been found in sheep, cattle, goats, pigs, and more rarely, in camels (some cases in Algeria, Kenya, Libya, and Tunisia). The camel strain has not often been identified in humans living in North Africa except for Egypt (Azab et al. 2004) and Mauritania (Bardonnet et al. 2002), where it has been presumed to play an important role in the transmission of CE to humans. According to the previously cited studies, this strain has been found in Mauritania, Tunisia, Egypt, Sudan, and also in nearby East Africa (Kenya) to be carried by livestock hosts such as camels and sometimes, sheep, cattle, and goats. On the northern border of the Sahara, including Algeria, Tunisia, and Egypt, both strains have been described in coexistence and sharing the same definitive host (i.e., dogs). The hypothesis of a strain concept should be tested by collecting samples in sympatric areas and searching for heterozygote patterns using nuclear DNA markers (Haag et al. 1999; Bartholomei-Santos et al. 2003; Nakao et al. 2003) to prove cross-fertilization.

In the present work, 71 *E. granulosus* samples (metacystode stage) were collected from slaughterhouses and human hospitals from three different countries in North Africa (Algeria, Mauritania, and Ethiopia). They were typed by two mitochondrial DNA markers [*cytochrome c oxidase 1 (cox1)*, and *NADH dehydrogenase 1 (nad1)*

genes] and two nuclear DNA markers [*actin II (actII)* and *homeobox 2 (hbx2)* genes]. Our first objective was to identify the geographical, biological, and genetic variants occurring in the regions. The second objective was to search for heterozygotes in the sympatrically populated "Touggourt-Ouargla" area of Algeria to document the possible occurrence of cross-fertilizing processes.

Materials and methods

Sampling strategy

Echinococcus granulosus whole hydatid cysts were collected from intermediate hosts either at slaughterhouses or in human hospitals in three countries of North Africa: Algeria, Mauritania, and Ethiopia (see characteristics in Table 1). The 46 Algerian samples were collected by local teams: 23 from the North (5 sheep and 13 cattle samples came from slaughterhouses in eight different cities, and 5 human samples came from hospitals in four different cities) and 23 from the more southern "Touggourt-Ouargla" region (ten sheep, three cattle, and ten camel samples). Algeria was of particular interest for this study due to the sympatric coexistence of both common sheep and camel strains in the Touggourt-Ouargla region (Bart et al. 2004). The two zones were also of interest because they contrasted with regard to climate, landscape morphology, human population density (which probably impacts on the dog population density), livestock herd composition and distribution, methods of breeding, and disease control guidelines. The 20 Mauritanian samples came from the Nouakchott region (1 cattle, 17 camel, and 2 human samples). Cattle breeding used to be Mauritania's largest commercial activity; during the last few decades, the livestock has been drastically reduced due to chronic drought and the rapid advance of the desert. These changes have brought many shifts in patterns of herd management (ownership, composition, and movements) and have increased the pressures on the land, also occupied by sedentary farmers. The successive droughts have also caused many changes in the methods used for the breeding of camels (herds traditionally located in the drier north) and for sheep (herds usually located throughout Mauritania). The capital, Nouakchott, was a major refugee center during the severe Saharan droughts of the 1970s and, thus, grew very quickly. The city became a large commercial hub and the center of large livestock migrations. The five Ethiopian samples were collected as part of a study carried out by the Institute of Parasitology of Bern (Switzerland) in the capital Addis Ababa (four sheep samples) and in a nearby city, Asela (one cattle sample). These sites were interesting because they are located in the Ethiopian highlands, where the highest concentration of livestock production can be

Table 1 Characteristics of the Algerian (a), Mauritanian (b), and Ethiopian (c) samples used in this study

| Host | Origin | <i>cox1</i> | <i>nad1</i> | <i>act11</i> | <i>hbx2</i> | Mitochondrial genotypes | Nuclear genotypes |
|-----------|-----------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------------------|-------------------|
| a. | | | | | | | |
| Cattle | Sétif (N) | DQ341564 | DQ341515 | DQ341539 | DQ341554 | m1 | n1 |
| | – | – | – | – | – | – | – |
| | Annaba (N) | – | – | – | – | – | – |
| | Batna (N) | – | – | – | – | – | – |
| | Jijel (N) | – | – | – | – | – | – |
| | Constantine (N) | – | – | – | – | – | – |
| | Ouargla (TOR) | – | – | – | – | – | – |
| | – | – | – | – | – | – | – |
| | – | – | – | – | – | – | – |
| | El Eulma (N) | DQ341570 | – | – | – | m2 | – |
| | Constantine (N) | DQ341571 | DQ341520 | – | – | m3 | – |
| | – | – | – | – | DQ341558 | – | n2 |
| | – | – | DQ341521 | – | – | m4 | – |
| | – | DQ341572 | – | – | – | m5 | – |
| | – | DQ341573 | DQ341522 | – | – | m6 | – |
| – | DQ341573 | – | – | – | m7 | – | |
| Sheep | Constantine (N) | DQ341566 | DQ341517 | DQ341541 | DQ341552 | m1 | n1 |
| | Touggourt (TOR) | – | – | – | – | – | – |
| | Ouargla (TOR) | – | – | – | – | – | – |
| | – | – | – | – | – | – | – |
| | Batna (N) | DQ341574 | DQ341523 | – | – | m8 | – |
| | Sétif (N) | – | DQ341526 | – | – | m9 | – |
| | Aïn M'lila (N) | – | DQ341527 | – | – | m10 | – |
| | – | DQ341577 | DQ341528 | – | – | m11 | – |
| | Ouargla (TOR) | DQ341577 | DQ341528 | – | – | m11 | – |
| | – | DQ341577 | DQ341528 | – | – | m11 | – |
| | Touggourt (TOR) | – | – | DQ341545 | – | – | n3 |
| | – | – | – | DQ341545 | – | – | n3 |
| | Ouargla (TOR) | – | – | – | DQ341559 | – | n4 |
| | – | DQ341579 | – | – | – | m12 | – |
| | – | – | DQ341530 | – | – | m13 | – |
| Dromedary | Touggourt (TOR) | DQ341581 | DQ341531 | DQ341549 | DQ341561 | m14 | n5 |
| | – | – | – | – | – | – | – |
| | – | – | DQ341535 | – | – | m15 | – |
| | Ouargla (TOR) | DQ341535 | – | – | M15 | – | – |
| | – | DQ341535 | – | – | M15 | – | – |
| | Touggourt (TOR) | – | – | DQ341546 | – | m14 | n6 |
| | – | – | – | DQ341547 | – | – | n7 |
| | Ouargla (TOR) | – | DQ341536 | – | – | m16 | – |
| | – | DQ341575 | DQ341524 | DQ341543 | DQ341557 | m8 | n1 |
| | – | DQ341568 | DQ341529 | DQ341543 | DQ341557 | m17 | n1 |
| Human | Constantine (N) | DQ341569 | DQ341519 | DQ341544 | DQ341556 | m1 | n1 |
| | – | – | – | – | – | – | – |
| | Batna (N) | – | – | – | – | – | – |
| | Tébessa (N) | DQ341578 | – | – | – | m18 | – |
| | Jijel (N) | DQ341576 | DQ341525 | – | – | m8 | – |
| b. | | | | | | | |
| Cattle | Nouakchott (M) | DQ341580 | DQ341533 | DQ341548 | DQ341560 | m14 | n5 |
| Dromedary | Nouakchott (M) | DQ341582 | DQ341532 | DQ341550 | DQ341562 | m14 | n5 |
| – | – | – | – | – | – | – | – |
| – | – | – | – | – | – | – | – |
| – | – | – | – | – | – | – | – |
| – | – | – | – | – | – | – | – |
| – | – | – | – | – | – | – | – |

Table 1 (continued)

| Host | Origin | <i>cox1</i> | <i>nad1</i> | <i>actIII</i> | <i>hbx2</i> | Mitochondrial genotypes | Nuclear genotypes |
|--------|-----------------|-------------|-------------|---------------|-------------|-------------------------|-------------------|
| | – | – | – | – | – | – | – |
| | – | – | – | – | – | – | – |
| | – | – | – | – | – | – | – |
| | – | – | – | – | – | – | – |
| | – | – | – | – | – | – | – |
| | – | – | – | – | – | – | – |
| | – | – | – | – | – | – | – |
| | – | – | – | – | – | – | – |
| | – | – | – | – | – | – | – |
| Human | Nouakchott (M) | DQ341583 | DQ341534 | DQ341551 | DQ341563 | m14 | n5 |
| | – | DQ341584 | – | – | – | m19 | – |
| c. | | | | | | | |
| Cattle | Assela (E) | DQ341565 | DQ341516 | DQ341540 | DQ341555 | m1 | n1 |
| Sheep | Addis Ababa (E) | DQ341567 | DQ341518 | DQ341542 | DQ341553 | m1 | n1 |
| | – | DQ341585 | – | – | – | m20 | – |
| | – | – | DQ341537 | – | – | m21 | – |
| | – | – | DQ341538 | – | – | m22 | – |

The parasitic material extracted from them was characterized with two mitochondrial and two nuclear markers (*cox1*, *nad1*, *actIII*, and *hbx2*). The GenBank accession numbers of the sequences from DQ341515 to DQ341585 are indicated (GenBank database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>). Mitochondrial genotypes were defined from the two mitochondrial markers; nuclear genotypes were defined from the two nuclear markers. These genotypes were then used to draw dendograms based on the genetic distances between the sequences.

found. Up until now, only one study of molecular strain identification has been carried out in Mauritania and none in Ethiopia. The study in Mauritania showed that only the camel strain was circulating and, thus, was playing a major role in the transmission to humans (Bardonnet et al. 2002). Despite the lack of studies specific to Ethiopia, studies carried out in nearby East Africa suggest the presence of both common sheep and camel strains in this focus (Wachira et al. 1993; Dinkel et al. 2004).

Molecular and phylogenetic analysis

DNA extraction

The genomic DNA was extracted from hydatid tissue (protoscoleces and/or germinal layer) using a High Pure PCR Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). For the fertile cysts (presence of protoscoleces), we carefully followed the manufacturer's instructions (digestion by proteinase K) except for the sterile ones, where the samples were prepared as follows: (1) enucleated cysts were "frozen–thawed" three times at $-20/37^{\circ}\text{C}$ to separate the germinal layer from the laminated layer, (2) the germinal layer was minced and broken in three consecutive baths of liquid nitrogen, and (3) the samples were incubated with lyzozyme for 1 h at 37°C and then incubated with sodium dodecyl sulfate (SDS), proteinase K, and lysis buffer overnight at 55°C .

DNA sequencing

The total DNA was subsequently used as a template for the amplification of two mitochondrial markers (*cox1*, a 309-bp portion of the gene coding for cytochrome *c* oxidase 1; and *nad1*, a 279-bp sequence of the gene coding for NADH dehydrogenase 1) and two nonrepeated nuclear markers (*actIII*, an intronic 240-bp portion of the gene coding for actin II; and *hbx2*, a mainly intronic 257-bp sequence included in a homeobox gene). The PCR was performed in a 25- μl volume containing 2 μl genomic DNA, 100 μM each deoxynucleoside triphosphate (dNTP; MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), 20 pmol each of primers (Invitrogen Life Technologies, Paislay, Scotland) and 0.5 U DNA Red Taq Polymerase in 2.5 μl reaction buffer $\times 10$ (Sigma, Saint Louis, MO, USA). The characteristics of the four pairs of primers used in the present work, the annealing temperatures they required for PCR, and the time chosen for elongation according to the length of markers are shown in Table 2. The amplification conditions were as follows: an initial step of denaturation (30 s at 94°C) followed by 40 cycles of successive denaturation (30 s at 94°C), hybridization (30 s at the annealing temperature), and elongation (30–75 s at 72°C), and then a final elongation of 5 min at 72°C . The specificity of amplications and the size of products were assessed by electrophoresis in 1.5% (w/v) Tris–acetate/EDTA (TAE) agarose gels. Using 1 μl of ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, OH, USA), 2.5- μl

Table 2 Primer sequences and PCR conditions for the amplification of the nuclear and mitochondrial markers

| Targets | Primers | Length of the amplified fragment (bp) | Annealing temperature (°C) | Elongation time (s) | Reference |
|----------------------|---------|---------------------------------------|----------------------------|---------------------|------------------------|
| Nuclear | | | | | |
| <i>act11</i> | Forward | 5'-gTCTTCCCCTCTATCgTggg-3' | 60 | 75 | Da Silva et al. (1993) |
| | Reverse | 5'-CTAATgAAATTAgtgCTTTgTgCgC-3' | | | |
| <i>hbx2</i> | Forward | 5'-TTCTCCTCTAgCCAaggTCCA-3' | 56 | 45 | Haag et al. (1997) |
| | Reverse | 5'-TATAgCgCCgATTCTggAAC-3' | | | |
| Mitochondrial | | | | | |
| <i>cox1</i> | Forward | 5'-TTTTTTggCCATCCTgAggTTTAT-3' | 60 | 75 | Bart et al. (2006) |
| | Reverse | 5'-TAACgACATAACATAATgAAAAATg-3' | | | |
| <i>nad1</i> | Forward | 5'-AgTCTCgTAaggCCCTAACA-3' | 45 | 30 | |
| | Reverse | 5'-CCCgCTgACCAACTCTCTTTC-3' | | | |

PCR products were then purified for 15 min at 37°C and 15 min at 80°C. For sequencing, 2 µl distilled water, 1 pmol forward or reverse primer, and 2 µl DTCS QuickStart Master Mix (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) were added. The reaction conditions were as follows: 40 cycles of 20 s at 94°C, 20 s at 50°C and 4 min at 60°C. After alcoholic purification, the migration of the fragments was performed in an automatic sequencer (CEQ8000 Genetic Analysis System, Beckman Coulter).

Sequence analysis and phylogenetic reconstruction

The nucleotide sequences were subsequently examined by aligning them with the Bioedit software and its application ClustalW (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Using another Bioedit application, basic local alignment search tool (BLAST), the nucleotide sequences were also compared to those in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), which serve as the references for defining the *E. granulosus* common sheep (G1), Tasmanian sheep (G2), and camel (G6) strains, and *Echinococcus multilocularis* (GenBank references shown in Fig. 1). All these sequences, either obtained or referenced, were then used to draw dendrograms using MEGA software (Molecular Evolutionary Genetics Analysis 3.1, (<http://www.megasoftware.net>)). The neighbor-joining (NJ) method was chosen because its heuristic-clustering algorithm is based on the principle of minimum evolution, that is, the minimum number of changes which can occur between the sequences (Saitou and Nei 1987) and because it takes into account the possible differences in their speeds of occurrence. This method was corrected by the Kimura two-parameter model (Kimura 1980), which includes the equal base frequencies and the differences existing between the rates of transversion (substitution of a purine for a pyrimidine or vice versa) and transition (purine/purine or pyrimidine/pyrimidine substitution). To assess the robustness of the branches, a bootstrap test (Felsenstein 1985) of 1,000 repetitions was performed. Based on the statistical

inference and using our matrix of data, this technique constructed a new set of sequences (lines) 1,000 times in randomly selected nucleotide positions (columns) without replacing them. A dendrogram was drawn for each set with the NJ method. In the analysis of these 1,000 repetitions, the number of trees in which a genetic cluster appeared was associated with its robustness. A clustering of genotypes was considered relevant when its robustness was more than 70%.

Results

Sequence analysis

The sequences obtained by the characterization of the four DNA markers chosen for this study are shown in Table 1. A total of 34 different genotypes were identified in typing *cox1* (11), *nad1* (14), *act11* (5), and *hbx2* (4) markers. All the sequences are available on GenBank, with accession numbers from DQ341515 to DQ341585 (Table 1). The rate of polymorphism indicated by these markers (i.e., their power of discrimination) was higher for the mitochondrial targets than for the nuclear ones (22 different genotypes vs only 7, respectively). The detailed analysis of the 142 nuclear sequencing electrophoregrams did not reveal any patterns suggesting the occurrence of cross-fertilization (as did the G1/G5 SSCP profiles presented by Haag et al. 1999).

Mitochondrial markers

Among the mitochondrial sequences, we identified one set defined by a homology of 99.4 to 100% with G1 and a second one, defined by a homology of 89.1 to 89.4% with G1 and identified as a cluster of G6 sequences. All of the Algerian cattle, sheep, and human samples formed the G1

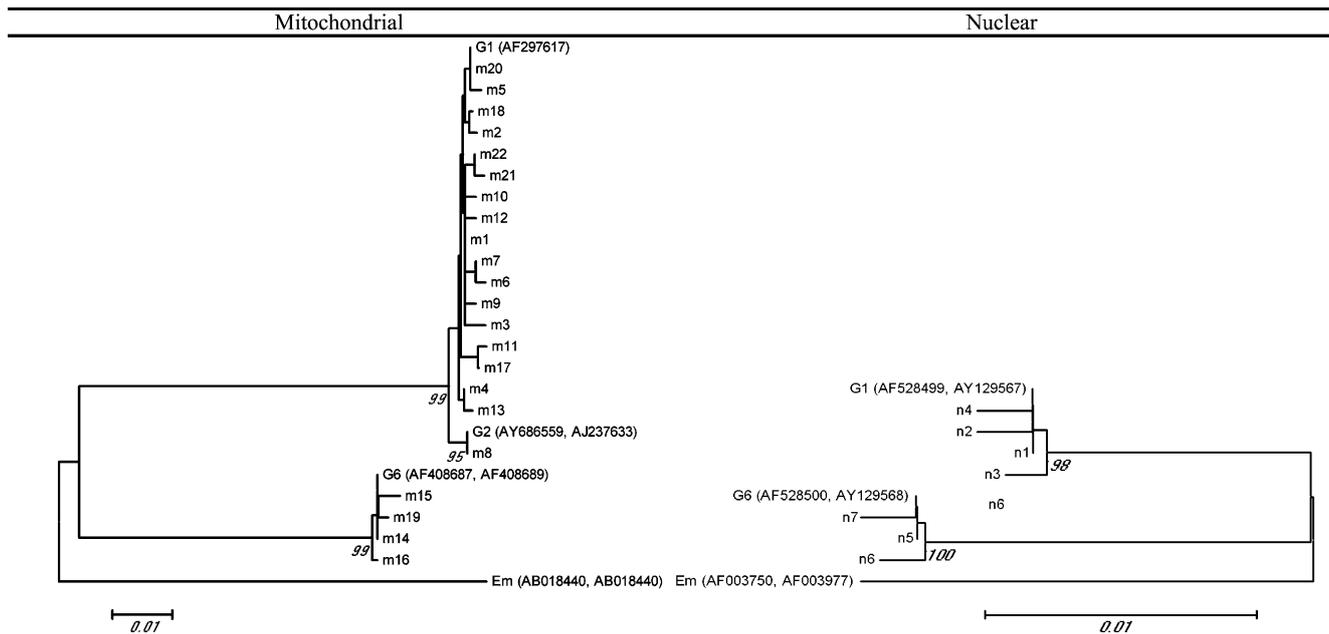


Fig. 1 Comparison of the two dendrograms drawn with the mitochondrial and nuclear genotypes identified in this study. These genotypes were defined by combining the results obtained with the four different typing targets (*cox1*, *nad1*, *actII*, and *hbx2*). The phylogenetic trees

were drawn using the neighbor-joining method and the Kimura two-parameter model of correction (MEGA software v. 3.1, <http://www.megasoftware.net>)

cluster, whereas most of the Algerian camel samples formed the G6 cluster. The coexistence of the common sheep and the camel strains was confirmed in the Touggourt-Ouargla region of Algeria. In addition, this sympatry was underlined by the identification of the common sheep strain in a camel from Ouargla, a host usually infected by the camel strain. The so-called “Tasmanian sheep” G2 strain was also found in our panel. Until now, no study has reported its presence in Africa. The G2 strain was identified in a human and a sheep from northern Algeria and in a camel from Ouargla. When investigating the potential polymorphism of all the 46 sequences identified in Algerian samples, a higher genetic variability was observed in the G1 cluster than in the G6 cluster. The three Algerian samples carrying the Tasmanian sheep strain showed the same G2 nucleotide sequence. The Mauritanian samples showed a high homogeneity because they all had the same G6 sequence; this particular sequence was also identified previously in four of eight Algerian G6 camels. In addition, our study also confirmed the presence of the common sheep G1 strain in Ethiopia: four different G1 sequences were identified in the five Ethiopian samples.

The clustering of sequences observed in Algeria was also observed in the Mauritanian and Ethiopian data. Indeed, despite the high heterogeneity of all the Algerian and Ethiopian G1 sequences found in the present work, they were all clustered in one set. In addition, the G6 cluster

from the Algerian samples was not disturbed when the Mauritanian ones were added. In both genetic discrete units, some microvariants were characterized: we identified seven G1 and one G6 sequences for *cox1*, as well as nine G1 and two G6 sequences for *nad1*. Compared to the genotypes most frequently observed, these differed by 1 to 2 bp, and no one variant was found in more than four hosts.

Nuclear markers

Mitochondrial marker analyses were compared with those of the nuclear markers in which two clusters were also identified. The sequences of the first cluster exhibited a 99.7 to 100% identity with the combination of sequences described as G1 by Bart et al. (2004) from Algerian samples (rGB, AF528499 and AY129567), whereas the second exhibited a 99.3 to 99.5% identity with the same references and was linked with G6 sequences also described in the work just cited (rGB, AF528500 and AY129568). In contrast to the mitochondrial data, discrimination between the Tasmanian sheep and common sheep strains was not possible with the nuclear tools chosen for this study. For the nuclear markers, some microvariants were identified: one G1 and two G6 sequences for *actIII*, and two G1 but no G6 sequences for *hbx2*. Compared with the genotypes most frequently identified, these microvariants differed by only 1 bp and were isolated from not more than two different samples.

Phylogenetic reconstruction

From the mitochondrial and nuclear data, two dendrograms were drawn (Fig. 1), and each of them showed two genetic clusters, also named “discrete typing units” (DTUs) (Tibayrenc 2003), corresponding to the common sheep G1 and camel G6 strains of *E. granulosus*. Both units had high values in the bootstrap tests (from 98 to 100%), thus showing a high robustness. In all of the sequences obtained from our panel of samples, all G1 sequences formed the first DTU, whereas all the other G6 sequences formed the second DTU; this DTU distribution was the same in both mitochondrial and nuclear dendrograms. With regard to the Tasmanian sheep strain, a distinct cluster formed by the G2 sequences had a high robustness (95%), but only in the mitochondrial dendrogram. Furthermore, whereas the divergence observed between the G1 and G6 branches amounted to 0.013 and 0.004 for the mitochondrial and nuclear trees, respectively, the mitochondrial G2 DTU showed a genetic divergence from the G1 DTU equal to 0.003.

Discussion

In the present study, the molecular characterization of 71 *E. granulosus* samples by four DNA markers, selected from the mitochondrial and nuclear genomes of the parasite, led to the identification of 34 distinct genotypes. All of them were clearly clustered in two sets, one formed by all G6 samples and the other by all the G1 and G2 samples. None of these samples exhibited evidence of genetic exchanges between the two sets such as the specific heterozygote profiles previously described by Haag et al. (1999), Bartholomei-Santos et al. (2003), and Nakao et al. (2003). For the first time in Africa, we also showed the presence of genotype 2 attributed to the so-called Tasmanian sheep strain. It was found in sheep, human, and camel samples. Our results help to clarify the status of these strains within *E. granulosus* species. Although the coexistence of the common sheep and camel strains along the Algerian northern border of the Sahara, in agreement with the findings of Bart et al. (2004), and the occurrence of a host spectrum overlap, both strains were clearly distinct, and we found no case evoking a genetic exchange between the two. In the mitochondrial and nuclear dendrograms, the strains were clustered in two discrete units, both showing a high level of robustness. Regarding the intermediate host spectrum, the two clusters generally corresponded to two distinct life cycles, that is, sheep/cattle/human vs camel. Finally, except for all the samples originating from the Touggourt-Ouargla region in Algeria, the two sets also corresponded to two distinct geographical distributions, a desert area (camel

strain) and a more humid area (common sheep and Tasmanian sheep strains).

Thus, the sympatric coexistence of the common sheep and camel strains was confirmed for the Touggourt-Ouargla region of Algeria. Contrary to the evidence for two separate and distinct life cycles, we found two camels infected by the two sheep strains (i.e., one with the common sheep strain and the other one with the Tasmanian sheep strain). The existence of such overlapping increases the possibility of cross-breeding in the same geographical area within the definitive host. With regard to specific genetic aspects, the two strains were independent because (1) the DTUs remained unchanged in the case of these overlapping samples, and (2) according to the nuclear markers, no heterozygote patterns were identified, indicating the absence of cross-fertilizing processes in our panel of 71 samples. However, these preliminary results should now be more profoundly confirmed by sampling a larger panel of appropriate specimens. Research on the interbreeding mode selected by both common sheep and camel strains can provide more information about their real status.

The Tasmanian sheep strain that was identified in Algeria was first characterized in Tasmania from sheep samples (Bowles et al. 1992). This genetic variant of *E. granulosus* has been considered to be geographically isolated in this island state of Australia because until now, no other variants have been described. Genotype 2 was characterized only by the use of the mitochondrial DNA markers *cox1* and *nad1*. Surprisingly, G2 was also discovered in sheep from Argentina (Rosenzvit et al. 1999; Kamenetzky et al. 2002), then in human samples from the same area (Guarnera et al. 2004), and more recently, in sheep and cattle from Romania (Bart et al. 2006). In these studies, the Tasmanian sheep strain was described as cocirculating in sympatry with the common sheep strain. In our mitochondrial dendrogram, the G2 sequence showed a very low genetic divergence from the G1 sequence. The identification of G2 was only made in the present work because of the mitochondrial markers and was not connected with any particular host spectrum or geographical patterns. To date, the Tasmanian sheep strain has been described in Tasmania, Argentina, Romania, and Algeria. Thus, this variant of *E. granulosus*, much like the common sheep strain, appears to be very widespread. The two sheep strains share the same host spectrum, infecting mainly sheep, but both are also able to infect other livestock such as the camel, as described in this study.

The concept of strains is therefore controversial within the species of *E. granulosus*. In our data, the mitochondrial genetic distances observed between G1/G2 and G1/G6 were 0.7 and 11.6%, respectively, whereas an average of 13.5% was reported between G1 and *E. multilocularis*. In a study conducted by McManus (2006), the values obtained

with the same markers for G1/G4 (horse strain) and G1/G5 (cattle strain) were very similar to those observed for G1/G6 in the present work. Separating the horse and cattle strains from *E. granulosus* and assigning them their own species level (i.e., *Echinococcus equinus* and *Echinococcus ortleppi*) is accepted. The common sheep and camel strains appear to be biologically distinct and as genetically different from one another as they are from *E. multilocularis*. The taxonomic status given to all of the *E. granulosus* strains should be progressively reevaluated. It has been recently observed that the two cervid strains, G8 and G10, defined by geographical, morphological, and, more recently, genetic criteria (Lavikainen et al. 2003), seem to form, together with the pig (G7) and the camel (G6) strains, a set presumed to be a species distinct from *E. granulosus* (Thompson et al. 2005). The taxonomic name of *Echinococcus canadensis* has been proposed.

In taxonomic research, the increasing number of phylogenetic studies can be explained by their capacity to solve several of the problems previously encountered with other reference methods such as morphological, behavioral, physiological, or biochemical analyses (Kunz 2002). However, genetic discrimination is not based on the presence or absence of criteria; it involves a gradient of differences and, thus, implicitly involves the choice of a resolution level for the definition of a new relevant rank in taxonomy. In addition, the selection of the markers is important because they do not have the same discriminating characteristics (for example, mitochondrial vs nuclear). To avoid the risk of sub- or overdiscrimination, the definition of all taxonomic ranks should include geographical, epidemiological, and interbreeding patterns to reflect an epidemiological relevance. The improvement of our knowledge of taxonomic links and their evolution is not “merely an academic exercise” (McManus and Bowles 1996): it is primordial in the establishment of control or eradication campaigns against cystic echinococcosis.

Acknowledgement This work was supported by the Swiss National Science Foundation (grant no. 31-63615.00).

References

- Avise JC, Walker D (1999) Species realities and numbers in sexual vertebrates: perspectives from an asexually transmitted genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(3):992–995
- Azab ME, Bishara SA, Helmy H, Oteifa NM, El-Hoseiny LM, Ramzy RM, Ahmed MA (2004) Molecular characterization of Egyptian human and animal *Echinococcus granulosus* isolates by RAPD-PCR technique. *J Egypt Soc Parasitol* 34(1):83–96
- Bardonnet K, Piarroux R, Dia L, Schneegans F, Beurdeley A, Godot V, Vuitton DA (2002) Combined eco-epidemiological and molecular biology approaches to assess *Echinococcus granulosus* transmission to humans in Mauritania: occurrence of the ‘camel’ strain and human cystic echinococcosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96(4):383–386
- Bart JM, Bardonnet K, Benchikh-Elfegoun MC, Dumon H, Dia L, Vuitton DA, Piarroux R (2004) *Echinococcus granulosus* strain typing in North Africa: comparison of eight nuclear and mitochondrial DNA fragments. *Parasitology* 128(Pt 2): 229–234
- Bart JM, Morariu S, Knapp J, Ilie MS, Pitulescu M, Anghel A, Cosoroaba I, Piarroux R (2006) Genetic typing of *Echinococcus granulosus* in Romania. *Parasitol Res* 98(2):130–137
- Bartholomei-Santos ML, Heinzelmann LS, Oliveira RP, Chemale G, Gutierrez AM, Kamenetzky L, Haag KL, Zaha A (2003) Isolation and characterization of microsatellites from the tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 126 (Pt 6):599–605
- Bowles J, McManus DP (1993) Molecular variation in *Echinococcus*. *Acta Trop* 53(3–4):291–305
- Bowles J, Blair D, McManus DP (1992) Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol* 54(2):165–173
- da Silva CM, Ferreira HB, Picon M, Gorfinkiel N, Ehrlich R, Zaha A (1993) Molecular cloning and characterization of actin genes from *Echinococcus granulosus*. *Mol Biochem Parasitol* 60(2):209–219
- Dinkel A, Njoroge EM, Zimmermann A, Walz M, Zeyhle E, Elmahdi IE, Mackenstedt U, Romig T (2004) A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus*-complex, with reference to the epidemiological situation in Eastern Africa. *Int J Parasitol* 34(5):645–653
- Eckert J, Thompson RC (1997) Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans. *Acta Trop* 64(1–2):19–34
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791
- Guarnera EA, Parra A, Kamenetzky L, Garcia G, Gutierrez A (2004) Cystic echinococcosis in Argentina: evolution of metacestode and clinical expression in various *Echinococcus granulosus* strains. *Acta Trop* 92(2):153–159
- Haag KL, Zaha A, Araujo AM, Gottstein B (1997) Reduced genetic variability within coding and non-coding regions of the *Echinococcus multilocularis* genome. *Parasitology* 115 (Pt 5):521–529
- Haag KL, Araujo AM, Gottstein B, Siles-Lucas M, Thompson RC, Zaha A (1999) Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (Cestoda; Taeniidae): selfing or outcrossing? *Parasitology* 118 (Pt 1):63–71
- Kamenetzky L, Gutierrez AM, Canova SG, Haag KL, Guarnera EA, Parra A, Garcia GE, Rosenzvit MC (2002) Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infect Genet Evol* 2(2):129–136
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111–120
- Kunz W (2002) When is a parasite species a species? *Trends Parasitol* 18(3):121–124
- Lahmar S, Debbek H, Zhang LH, McManus DP, Souissi A, Chelly S, Torgerson PR (2004) Transmission dynamics of the *Echinococcus granulosus* sheep-dog strain (G1 genotype) in camels in Tunisia. *Vet Parasitol* 121(1–2):151–156
- Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirvela-Koski V, Meri S (2003) Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 127(Pt 3):207–215
- Macpherson CNL, Wachira TWM (1997) Cystic echinococcosis in Africa south of the Sahara. In: Anderson FL, Ouheli H, Kashani M (eds) *Compendium on cystic echinococcosis in Africa and Middle Eastern countries with special reference to Morocco*. Brigham Young University, Provo, pp 245–277

- Mayr E, Linsley EG, Usinger RL (1953) Methods and principles of systematic zoology. McGraw-Hill, New York
- McManus DP (2002) The molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* and cystic hydatid disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96(Suppl 1):S151–S157
- McManus DP (2006) Molecular discrimination of taeniid cestodes. *Parasitol Int* 55(Suppl):S31–S37
- McManus DP, Bowles J (1996) Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics. *Int J Parasitol* 26(7):687–704
- M'Rad S, Filisetti D, Oudni M, Mekki M, Belguith M, Nouri A, Sayadi T, Lahmar S, Candolfi E, Azaiez R, Mezhoud H, Babba H (2005) Molecular evidence of ovine (G1) and camel (G6) strains of *Echinococcus granulosus* in Tunisia and putative role of cattle in human contamination. *Vet Parasitol* 129(3–4):267–272
- Nakao M, Sako Y, Ito A (2003) Isolation of polymorphic microsatellite loci from the tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Infect Genet Evol* 3(3):159–163
- Obwaller A, Schneider R, Walochnik J, Gollackner B, Deutz A, Janitschke K, Aspöck H, Auer H (2004) *Echinococcus granulosus* strain differentiation based on sequence heterogeneity in mitochondrial genes of cytochrome *c* oxidase-1 and NADH dehydrogenase-1. *Parasitology* 128(Pt 5):569–575
- Rosenzvit MC, Zhang LH, Kamenetzky L, Canova SG, Guamera EA, McManus DP (1999) Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology* 118 (Pt 5):523–530
- Sadjjadi SM (2005) Present situation of echinococcosis in the Middle East and Arabic North Africa. *Parasitol Int* 55(Suppl):S197–S202
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4(4):406–425
- Tashani OA, Zhang LH, Boufana B, Jegi A, McManus DP (2002) Epidemiology and strain characteristics of *Echinococcus granulosus* in the Benghazi area of eastern Libya. *Ann Trop Med Parasitol* 96(4):369–381
- Tassy P (1986) L'ordre et la diversité du vivant: quel statut scientifique pour les classifications biologiques? Fayard/fondation Diderot, France
- Thompson RCA, McManus DP (2001). Aetiology: parasites and life-cycles (Chapter 1). WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. Eckert J, Gemmel MA, Meslin FX, Pawlowski ZS and WHO. World Health Organization/World Organisation for Animal Health, Paris, France
- Thompson RC, Lymbery AJ, Constantine CC (1995) Variation in *Echinococcus*: towards a taxonomic revision of the genus. *Adv Parasitol* 35:145–176
- Thompson RC, Boxell AC, Ralston BJ, Constantine CC, Hobbs RP, Shury T, Olson ME (2005) Molecular and morphological characterization of *Echinococcus* in cervids from North America. *Parasitology* 132(Pt 3):439–447
- Tibayrenc M (2003) Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (discrete typing units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol Dis* 2(1):12
- Wachira TM, Bowles J, Zeyhle E, McManus DP (1993) Molecular examination of the sympatry and distribution of sheep and camel strains of *Echinococcus granulosus* in Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 48(4):473–479

4. DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons caractérisé le polymorphisme génétique de 71 échantillons *E. granulosus* à l'aide de deux marqueurs mitochondriaux et deux marqueurs nucléaires. Cela a conduit à la distinction de 34 génotypes. Les échantillons identifiés précédemment comme porteurs de la souche ovine de Tasmanie G2 sont finalement porteurs de la souche du buffle G3. Au cours de la reconstruction phylogénique, les 34 variants ont été répartis en deux grands groupes, le premier formé par tous les échantillons G1/G3 (souche ovine et souche du buffle - *E. granulosus* sensu stricto) et le deuxième formé par tous les échantillons G6 (souche cameline - *E. canadensis*). Aucun argument en faveur d'échanges génétiques n'a été observé entre ces deux ensembles.

Dans cette étude, la souche du buffle G3 et la souche ovine G1 partagent la même distribution géographique et le même spectre d'hôte. L'identification de G3 n'est d'ailleurs faite que grâce aux marqueurs mitochondriaux. La divergence entre G1 et G3 est donc très faible. La reconnaissance de la souche G3 ne paraît donc pas suffisamment robuste pour que ce variant soit considéré à lui seul comme un véritable clade, même si cette souche a la particularité de générer de nombreux kystes fertiles chez les buffles. D'autres analyses et d'autres critères de comparaison sont nécessaires afin de mieux évaluer la pertinence de cette souche.

Les résultats de cette étude montrent également que malgré leur circulation sympatrique en Algérie et parfois même, la superposition de leur spectre d'hôte, la souche ovine G1 et la souche cameline G6 maintiennent une identité génétique. Au sein des dendrogrammes, ces entités sont séparées avec une grande robustesse. De plus, les deux souches montrent globalement deux spectres d'hôtes différents : la souche ovine implique principalement des ovins et des bovins tandis que la souche cameline implique principalement des dromadaires. Ensuite, exception faite des échantillons collectés dans cette région particulière, les deux souches montrent deux distributions géographiques distinctes (liées également au spectre d'hôte) : la souche cameline est trouvée davantage en zone aride tandis que la souche ovine est le plus souvent trouvée dans des zones plus humides.

En dépit de cette forte distinction, nous avons trouvé dans la zone sympatrique algérienne deux dromadaires porteurs des souches G1/G3. Une telle superposition des

spectres d'hôte en zone sympatrique augmente la possibilité d'échanges génétiques entre les souches G1/G3 et la souche G6. Néanmoins, parmi les échantillons collectés dans cette zone particulière, aucun profil hétérozygote n'a été observé au sein des séquences nucléaires. Cela renforce l'hypothèse d'une absence d'échanges génétiques et donc d'une barrière de reproduction fortement installée. Néanmoins, la possibilité d'échanges génétiques ne peut être formellement exclue par l'étude d'une dizaine d'échantillons prélevés dans la nature. C'est pourquoi, nous avons souhaité poursuivre cette étude par la double contamination expérimentale d'un chien par la souche ovine G1 et la souche cameline G6. Toutefois, analyser la descendance des vers adultes issus de cette contamination nécessitait de trouver au préalable, un outil de typage à la fois fiable, sensible et discriminant.

II- *ETUDE DU FOYER CHINOIS*

1. INTRODUCTION

Les fortes prévalences humaines et animales observées dans certains foyers touchés par l'échinococcose kystique posent la question de relations hôte/parasite particulières qui favoriseraient la contamination humaine. Il a été démontré que des facteurs tels que le comportement humain, les relations proie/prédateur, le spectre d'hôte, la réponse immunitaire de ces hôtes et les caractéristiques du milieu environnant pouvaient influencer sur la circulation des agents infectieux ainsi que sur l'ouverture des filtres de rencontre et de compatibilité [6, 112]. Cependant, le parasite lui-même pourrait également jouer un rôle. En effet, il a déjà été démontré que des variations génétiques pouvaient révéler des différences dans les capacités infectantes et pathogènes des agents infectieux [113]. Dans le cas d'*E. granulosus*, la capacité infectante du parasite pour l'homme semble être effectivement dépendante des différents variants du parasite. De fortes prévalences pourraient donc suggérer la présence d'un génotype particulièrement virulent.

2. DESCRIPTION DE L'ETUDE

Dans le cadre de cette étude, nous avons analysé une population de parasite provenant de la province du Qinghai, localisée au centre du foyer ouest de la Chine (**Figure 28 à 30**). Cette population, composée de 55 échantillons *E. granulosus* collectés à partir de différents hôtes (dont 37 à partir de patients humains), a été caractérisée par trois marqueurs mitochondriaux : *cox1*, *nad1* et *atp6*. Nous avons comparé les variations génétiques observées chez les patients à celles observées chez les animaux, afin de déterminer s'il existait une source de contamination particulièrement fréquente mais également à celles d'autres foyers, afin de voir si ces variations pouvaient être reliées aux prévalences humaines particulièrement fortes dans cette région.



Figure 28. Divisions administratives de la République Populaire de Chine.

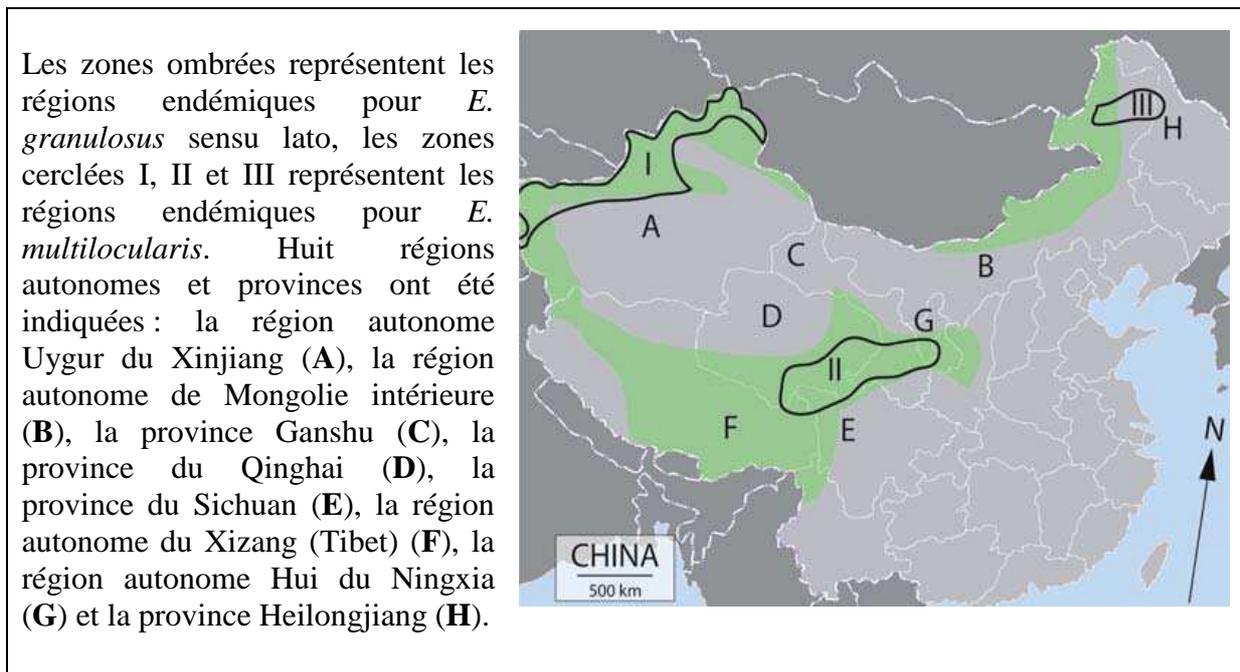


Figure 29. Distribution géographique d'*E. granulosus* sensu lato et d'*E. multilocularis* en République Populaire de Chine.

[15]

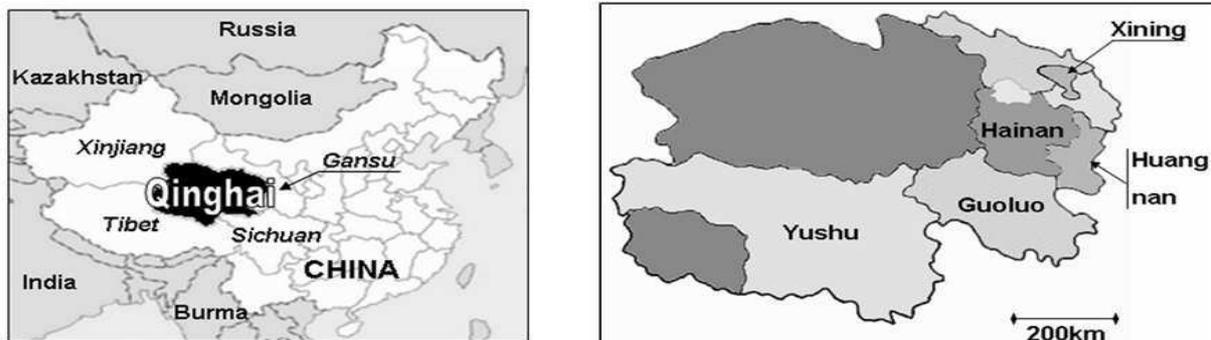


Figure 30. Foyer chinois : zone d'étude.

3. PUBLICATION

Publication 2 : Ma, S. M., S. Maillard, H. L. Zhao, X. Huang, H. Wang, P. L. Geng, J. M. Bart and R. Piarroux (2008). "Assessment of *Echinococcus granulosus* polymorphism in Qinghai province, People's Republic of China." *Parasitol Res* **102**(6): 1201-6.

Assessment of *Echinococcus granulosus* polymorphism in Qinghai Province, People's Republic of China

S. M. Ma · S. Maillard · H. L. Zhao · X. Huang ·
H. Wang · P. L. Geng · J.-M. Bart · R. Piarroux

Received: 28 November 2007 / Accepted: 16 January 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract Cystic echinococcosis (CE) is highly endemic in the Chinese province of Qinghai, located on the Tibetan Plateau. The *Echinococcus granulosus* sheep strain has already been reported in this focus. To improve our understanding of the role the parasite plays in the high prevalence observed in humans, we assessed the genetic polymorphism of 55 *E. granulosus* samples (37 from humans) using three discriminative mitochondrial markers: *coxI*, *nadI* and *atp6*. We obtained a total of 13 distinct genotypes which were all related to the common sheep G1 strain. Six of these genotypes have already been reported in China and other foci around the world. The remaining seven genotypes were new variants of the strain. The parasite population which was studied in the present work did not differ substantially from those observed in other foci of CE. Environmental conditions and human behaviour could explain the high incidence of the parasitic disease, particularly in the Tibetan population in the south of Qinghai, most of whom are livestock farmers.

Introduction

Echinococcus granulosus is the causative agent of cystic echinococcosis (CE). The highest prevalence of the parasite is found in rural areas where people breed livestock, and only a few countries are free of this parasite. To date, ten distinct strains (G1–G10) have been defined genetically according to the sequences obtained after PCR amplification of the mitochondrial markers *coxI* and *nadI* (Bowles et al. 1994; Scott and McManus 1994; Scott et al. 1997; Lavikainen et al. 2003). Of the ten, the common sheep G1 strain is the most widespread and is involved in almost all human cases. The prevalence of CE in humans varies greatly between continents and even in the same continent (Craig et al. 2007). The high prevalence in humans observed in some foci of CE raises the question of host–parasite relationships. It has been demonstrated that these relationships can be influenced by a variety of different factors, e.g. human behaviour, host immune response, host species variety, predator–prey relationship or landscape characteristics (Giraudoux et al. 2003; Eckert and Deplazes 2004). However, the parasite itself could also play a role because infectivity for humans seems to be strain dependent. Extensive research has demonstrated both the great genetic diversity of the parasite and the great variability of the prevalences which exist in the different endemic foci of CE, but no clear connections have been drawn between these two points. Vega et al. have reported the same situation for *Taenia solium* and Cysticercosis, the disease it causes (Vega et al. 2003). Increased knowledge of the genetic structure of a parasite could provide more information about its epidemiology and transmission, since genetic variants may affect infectivity and pathogenicity (Campbell et al. 2006).

S. M. Ma · S. Maillard (✉) · J.-M. Bart · R. Piarroux
Laboratory of Parasitology and Mycology, CNRS UMR 6249
Chrono-Environnement, University of Franche-Comté,
UFR SMP, 19 Rue Ambroise Paré,
25030 Besançon, France
e-mail: maillard_steph@yahoo.com

S. M. Ma · H. L. Zhao · X. Huang · P. L. Geng
Institute of Parasitology, Medical College of Qinghai University,
16 KuLun Street,
Xining City, Qinghai Province 810001, China

H. Wang
Qinghai Institute for Endemic Disease Prevention and Control,
Xining City, Qinghai Province 811602, China

To learn more about its genetic structure, we assessed the population of *E. granulosus* in the highly endemic Chinese province of Qinghai and compared it with those reported in other foci. Qinghai is located in the centre of the western Chinese focus of CE, and it shares borders with Tibet, Sichuan, Gansu and Xinjiang. It is a vast pastoral area and has a population of six million. The considerable burden of CE in Qinghai was demonstrated in a recent epidemiological survey performed in the south of Qinghai (Ma et al. 2006). This study showed the high prevalence of the parasite in dogs (55%) and livestock (54% for sheep and 72% for yaks). However, the most striking result was the burden of the disease in humans: using serologic tests (Dot-ELISA), 14% of those screened were positive, and morbidity was estimated at 7.64% with higher values for females and children (ultrasound and X-ray). Only two molecular biological studies have been carried out in Qinghai. Using RFLP, McManus et al. (1994) genotyped cysts collected from ten humans and 38 yaks. They found a pattern which was the same as the common sheep G1 strain. In the other study, based on the sequencing of mitochondrial marker *atp6*, Yang et al. (2005) showed a slight genetic variability in a panel of 12 cattle and 13 sheep. In the present work, we collected 55 *E. granulosus* samples from different hosts (37 from humans) and assessed the genetic diversity by using three discriminative mitochondrial markers (*cox1*, *nad1* and *atp6*).

Materials and methods

Human samples

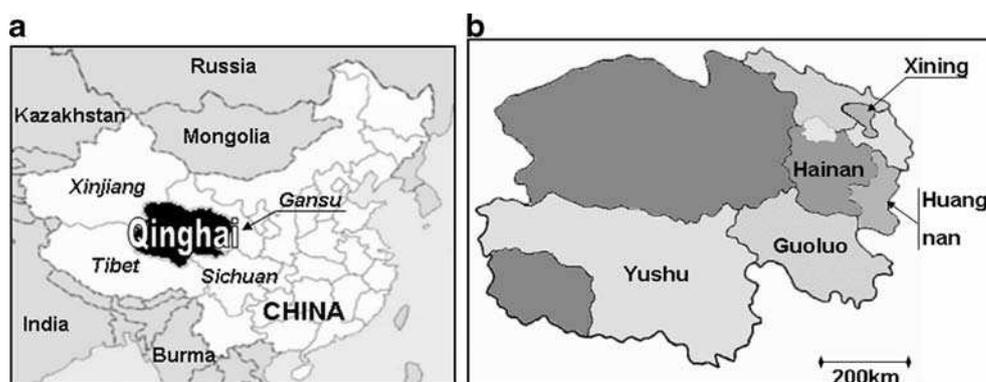
From March 2006 to March 2007, 37 hydatid cysts were collected from patients in five hospitals located in four autonomous prefectures of Qinghai: Yushu, Guoluo, Hainan and the capital, Xining City (Fig. 1). The characteristics of these cysts are shown in Table 1. The cysts were collected aseptically by local medical teams and preserved in 95% ethanol.

Table 1 Main characteristics of the 37 *E. granulosus* hydatid cysts collected from human patients in four different hospitals in Qinghai Province, People's Republic of China

| Origin | Organ | Presence of protoscolex | Age | Sex |
|--------|-------|-------------------------|-----|-----|
| Yushu | Liver | - | 28 | F |
| | Liver | - | 31 | F |
| | Liver | - | 41 | F |
| | Liver | - | 24 | F |
| | Liver | - | 27 | F |
| | Liver | + | 52 | F |
| | Liver | + | 72 | F |
| | Liver | + | 68 | M |
| | Liver | + | 45 | M |
| | Liver | + | 38 | F |
| | Liver | + | 22 | F |
| | Liver | + | 34 | M |
| | Liver | - | 66 | F |
| | Liver | - | 29 | F |
| Guoluo | Lung | - | 65 | M |
| | Liver | - | 30 | F |
| | Liver | + | 47 | M |
| | Liver | - | 49 | M |
| | Liver | - | 25 | F |
| | Liver | - | 52 | M |
| | Liver | - | 31 | M |
| | Liver | - | 44 | F |
| | Liver | - | 42 | M |
| | Liver | - | 42 | M |
| Hainan | Liver | - | 15 | F |
| | Liver | - | 33 | F |
| | Liver | - | 24 | F |
| | Liver | - | 18 | M |
| | Liver | - | 39 | M |
| | Liver | - | 48 | F |
| | Liver | - | 23 | F |
| | Liver | - | 64 | F |
| Xining | Liver | - | 36 | F |
| | Liver | - | 74 | M |
| | Liver | - | 43 | F |
| Xining | Liver | - | 67 | M |
| | Liver | - | 49 | F |

All patients were Tibetan herdspeople.

Fig. 1 Map of Qinghai Province, China (a) and of the five regions where the 55 *E. granulosus* isolates of this study were collected (b)



Animal samples

Fourteen hydatid cysts were obtained from slaughterhouses located in Yushu (one sheep and four cattle), Guoluo (one sheep and five cattle), Hainan (two sheep) and Huangnan (one sheep). The cysts were collected aseptically by local veterinary teams and preserved in 95% ethanol. Four stray dogs were captured in Yushu (one) and Guoluo (three), and then humanely killed with ketamin glycol. At necropsy, the pyloric and ileocecal ends of the small intestine were ligated. The small intestine was subsequently excised, opened lengthwise and carefully examined. Adult worms were collected one by one, rinsed in water and individually stored in 95% ethanol for further molecular analysis.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from the hydatid cysts and adult worms using the High Pure PCR Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Sterile cyst samples were prepared in the following way: cysts underwent three cycles of “freezing–thawing” at -20°C to separate the germinal layer from the laminated layer. The germinal layers were minced and subsequently broken up by three consecutive liquid nitrogen baths. The same procedure was applied to the adult worms to destroy the eggs (Cabrera et al. 2002). Then, fertile, non-fertile cysts and adult worms were all incubated with lysozyme at 37°C for 1h. SDS, proteinase K and lysis buffer were added, and the samples were incubated overnight at 55°C . The manufacturer’s recommendations were carefully followed for the last part of the DNA extraction.

Sequencing

Three targets were amplified by PCR: *coxI*, a portion of the gene coding for cytochrome *c* oxydase I; *nadI*, a portion of the gene coding for NADH dehydrogenase I; and *atp6*, a portion of the gene coding for ATP synthase subunit 6. The characteristics of the primers are described in Table 2. The reaction was performed in a 23- μl volume containing 2 μl genomic DNA, 100 μM each of dNTP (dNTP set, MBI

Fermentas, Vilnius, Lithuania), 20pmol each of primers (Invitrogen Life Technologies, Paislay, Scotland) and 0.5nit DNA Red Taq Polymerase in 2- μl reaction buffer 10 \times (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Amplification protocol was as follows: an initial step of denaturation (30s at 94°C) followed by 34–40cycles of successive denaturation (30–60s at 95°C), hybridisation (30–60 at annealing temperature), elongation (30–60s at 72°C) and then a final elongation of 5 min at 72°C . Negative controls were performed using sterile water instead of DNA, and positive controls were performed using known DNA samples characterised in Maillard et al. (2007). The presence of amplicons and their size were assessed by electrophoresis in 1.5% (*w/v*) Tris–acetate/EDTA agarose gels. Using 1 μl of ExoSAPIT (USB Corporation, Cleveland, OH, USA), 2.5- μl PCR products were then purified for 15 min at 37°C , and 15 min at 80°C . For sequencing, 2 μl distilled water, 1pmol forward or reverse primer and 2 μl DTCS Quick Start Master Mix (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) were added. The reaction conditions were as follows: 40 cycles of 20s at 94°C , 20s at 50°C and 1 min at 60°C . After purification by ethanol precipitation, electrophoresis of the fragments was carried out in an automatic sequencer (CEQ 8000 Genetic Analysis System, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). The mitochondrial sequences were subsequently aligned with Bioedit software and its application, ClustalW (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Using another Bioedit application, BLAST, the nucleotide sequences were compared to those in GenBank, the NIH genetic sequence database including all publicly available DNA sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Benson et al. 2007), which serves as the reference for defining the *E. granulosus* sheep strain (reference GenBank: AF297617) and *E. multilocularis* (outgroup, rGB: AB018440). All these sequences, obtained and referenced, were then used to draw a dendrogram using the MEGA software (Molecular Evolutionary Genetics Analysis 3.1, <http://www.megasoftware.net>; Fig. 2). The neighbour-joining method (Saitou and Nei 1987) was chosen and corrected by the ‘Kimura 2-parameter’ model (Kimura 1980). To assess the robustness of the branches, a bootstrap test (Felsenstein 1985) of 1,000 repetitions was

Table 2 Primer sequences and PCR conditions for the amplification of the three mitochondrial markers *coxI*, *nadI* and *atp6*

| Mitochondrial marker | Primers | Sequences | Annealing temperature ($^{\circ}\text{C}$) | Elongation time (s) | Reference |
|----------------------|---------|--------------------------------|--|---------------------|-------------------|
| <i>coxI</i> | EgCOI 1 | 5'-TTTTTTggCCATCCTgAggTTTAT-3' | 60 | 60 | Bart et al. 2006a |
| | EgCOI 2 | 5'-TAACgACATAACATAATgAAAATg-3' | | | |
| <i>nadI</i> | EgN 1 | 5'-AgTCTCgTAAgggCCCTAACA-3' | 60 | 60 | Bart et al. 2006a |
| | EgN 2 | 5'-CCCgCTgACCAACTCTCTTTC-3' | | | |
| <i>atp6</i> | EgMF | 5'-AAACTgTAGggTTCATgTC-3' | 50 | 60 | Yang et al. 2005 |
| | EgNO2R | 5'-CAAAACCCgAATAATCTATC-3' | | | |

performed. A cluster of genotypes was considered relevant when its robustness was over 75%.

Results

In this study, 37 hydatid cysts were collected in hospitals from patients ranging in age from 15 to 74, with a median of 42. Fourteen patients were men and 23 women. All of them were Tibetan herdspeople (Table 1).

The genotypes of the 55 *E. granulosus* cysts and adults reported in the present study were all similar to the common sheep strain referenced in GenBank (rGB: AF297617). With the cytochrome *c* oxidase I (*coxI*) marker, we obtained a 396-bp partial sequence. All the samples presented the same mutation, 7220T>C. Other mutations were observed but they were only found in a few samples. Six cysts collected from patients in the Yushu hospital showed two other mutations, 7175C>T and 7366T>C. Thirteen other cysts, collected from five other patients, four cattle and four sheep showed mutations 7175C>T, 7232T>C and 7355G>T. The 36 other samples (26 humans, one sheep, five cattle and four dogs) showed a mutation only at position 7220T>C.

A 418-bp partial sequence of the gene coding for NADH dehydrogenase subunit I (*nadI*) was obtained for all the 55

samples. Of these, 20 human, five sheep and nine cattle cysts and the four adult worms collected from dogs were identical to the common sheep G1 strain (rGB: AF297617). Nine human cysts showed mutation 5068T>C. Another mutation, 4883A>G, was found in only seven human patients and all of them were from the same hospital (Yushu). Another sample, from a patient from Guoluo, showed two mutations, 4883A>G and 5068T>C.

For *atp6*, 34 isolates (24 humans, three sheep, five cattle and two dogs) were identical to the G1 genotype sequence (rGB: AF297617). Six isolates from patients treated in Yushu hospital showed two mutations, 3420T>C and 3357G>A. Four cattle cysts showed two mutations, 3348G>A and 3438G>A. The remaining 11 isolates (eight humans, two sheep and one dog) showed mutation 3438G>A.

A total of 1,327bp were sequenced and 13 distinct genotypes were identified in the 55 samples of this study. Figure 2 shows the genetic distances which exist between our isolates and the *E. granulosus* G1 reference strain (rGB: AF297617). Four of them (G1M4, G1M5, G1M6 and G1M7) were found in 65.5% of the panel.

According to the comparison between our sequences and those already published in GenBank, six genotypes (G1M5, G1M6, G1M7, G1M8, G1M10 and G1M12), identified in 33 samples, have already been described in other CE foci.

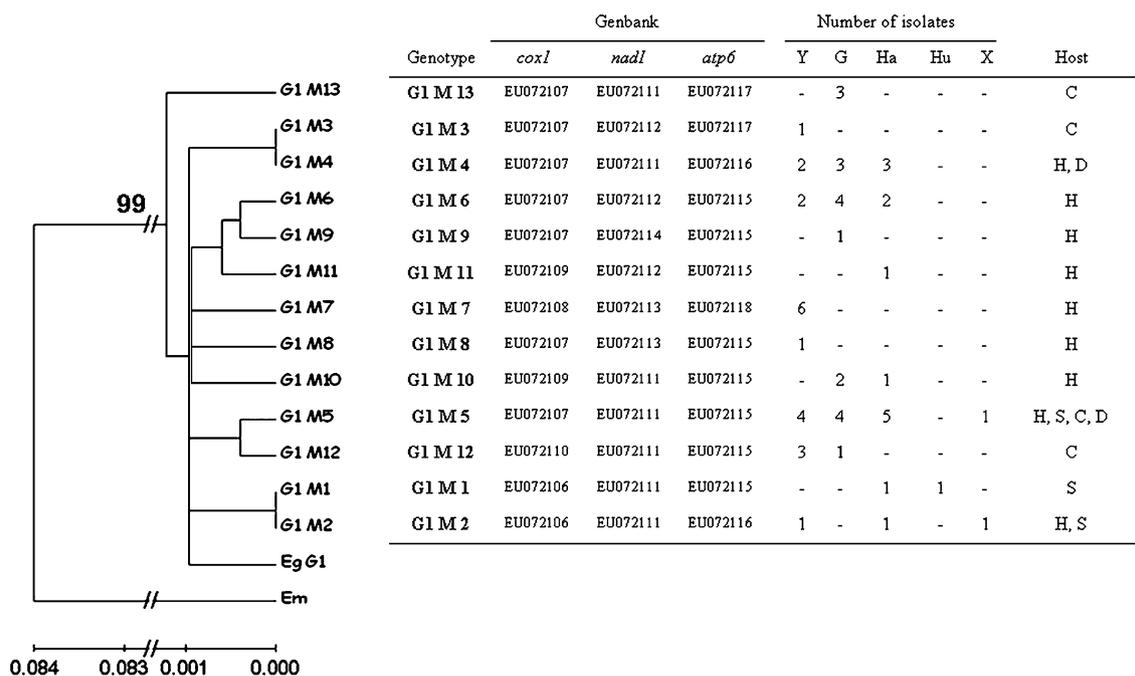


Fig. 2 The dendrogram shows the genetic distances separating the 13 genotypes (G1M1 to G1M13) identified in this study using *coxI*, *nadI* and *atp6* (MEGA software v.3.1, <http://www.megasoftware.net>). EgG1 is the complete mitochondrial genome of the *E. granulosus* sheep strain (reference GenBank: AF297617) and outgroup Em is the complete mitochondrial genome of *E. multilocularis* (rGB:

AB018440). A bootstrap test of 1,000 repetitions was performed and the values above 75% were added to the dendrogram. For each of these 13 genotypes, we show their GenBank accession numbers (Benson et al. 2007), their geographic distribution and the hosts in which they were observed. *Y* Yushu, *G* Guoluo, *Ha* Hainan, *Hu* Huangnan, *X* Xining, *C* cattle, *S* sheep, *H* human patient, *D* dog

G1M5, the most frequent genotype in our study (14 samples), was, for *coxI* and *nadI*, 100% identical to those reported in Mongolia (rGB: AB271235), Morocco (rGB: EF367274), in China (one sample out of 87 studied in Bart et al. 2006b), Romania (one sample out of 26 studied in Bart et al. 2006a) and Ethiopia (one sample out of five studied in Maillard et al. 2007). This genotype was also identified in most of the Algerian samples reported by Maillard et al. (2007).

Genotype G1M6 was found in eight samples collected from patients in our study. They presented the same *coxI* sequence as the cysts collected in Mongolia (rGB: AB271235), Morocco (rGB: EF367274) and China (rGB: DQ356883), the same *nadI* sequence as the cysts collected in China (rGB: AY572548) and the same *atp6* sequence as the cysts collected in China (rGB: AB027559).

Genotype G1M7 was found in six patients in Yushu hospital (four women and two men, aged 27 to 68). This genotype was identical to *coxI*, *nadI* and *atp6* sequences identified in Morocco, Australia, Greece and India (rGB: EF367291, AJ508063, DQ856469 and EF423800, respectively).

Genotypes G1M8, G1M10 and G1M11 were less frequent in the present work, but they were identical to mitochondrial sequences found in Mongolia (rGB: AB271235), Morocco (rGB: EF367274/44), China (rGB: DQ356881 and AB027559), Australia (rGB: AJ508063), Greece (rGB: DQ856469) and India (rGB: DQ856469).

The seven remaining genotypes (G1M1, G1M2, G1M3, G1M4, G1M9, G1M12 and G1M13), found in 22 samples, were defined by a new sequence, involving one, if not more, of the three markers; they were therefore considered as new variants of the common G1 strain.

Discussion

This study was carried out in the CE focus of Qinghai to determine if there is a particular *E. granulosus* genotype which could explain the high prevalence observed there. Using *coxI*, *nadI* and *atp6*, we assessed the genetic polymorphism of 55 *E. granulosus* samples, mainly from human patients, collected in this province. Our results showed a high genetic polymorphism in our panel of samples, but the 13 genotypes defined here showed great similarity to the common sheep G1 strain. The same results were reported in Bart et al. (2006a, b) and Maillard et al. (2007). These studies described three different G1 genotypes in 26 isolates in Romania, ten G1 genotypes in 87 isolates in China and 22 G1 genotypes in 71 isolates in Algeria and Ethiopia, respectively. Because most of the genotypes in the cysts collected in our study have been found in other virulent foci, the hypothesis that one specific

genotype is responsible for the extremely high human incidence of the disease in China can be discarded. However, G1M5 is the most frequent of the genotypes observed in our study, and it was also the most frequent in Algeria and Ethiopia (Bart et al. 2004; Maillard et al. 2007). The geographic distribution of this genotype is vast and includes countries which differ from each other, particularly in terms of climate. This genotype has also been observed in a large spectrum of intermediate hosts. In our study, it was found in humans, cattle, sheep and dogs. In other studies, it was found not only in these hosts, but also in yaks. Because its distribution is far greater than any other, this genotype merits further investigation on a larger scale.

The parasite population in Qinghai does not differ substantially from those found in other CE foci. In our study, it presented a comparable level of genetic diversity and showed the same main genotypes. However, there were higher incidences observed in humans, and this may be related to host factors. It is interesting to note that all our patients were Tibetan, whereas other ethnical groups also live in Qinghai. The Han ethnic group represents 54% of the population and the Tibetans, the Hui and the Tu represent respectively 23%, 16% and 4%; the Mongols and the Salar represent 1.8% each. The Han, Hui and Tu ethnic groups generally live in the north of Qinghai (Xining City, the Caidamu Basin and the Hehuang Valley), where the altitude is about 2,500 m. These groups generally work in industry, agriculture and commerce and thus do not, in the main, come in contact with contaminated dogs. The Tibetans, however, are a nomadic population, are generally herdspeople, and usually live on the south plateau of Qinghai. Called “the Roof of the World”, the Qinghai–Tibetan plateau is a vast, elevated plateau (4,500 m high), composed of extensive pasturelands and high mountains and covering most of the Tibet Autonomous Region and Qinghai Province in western China. Because of its topography and its climate, livestock farming (mainly sheep, cattle and yaks) is practiced in 90% of the area. Dogs are a necessity for guarding the livestock. Consequently, the definitive host of *E. granulosus* and a large panel of putative intermediate ones are present in this area, and they sustain the cycle of the parasite. In addition, the Tibetan herdspeople have a lifestyle which is very different from the ethnic groups in the North. The environment, their nomadic lifestyle and religious beliefs create a more complex situation in terms of hygiene, health and education than that in the more urbanised North. For example, a lot of herdspeople allow their dogs to sleep in their tents and thus, the risk of contamination with *E. granulosus* eggs is increased. Amongst the 37 patients reported in the present study, 23 were women. This may be associated with task distribution. Women are responsible for the dogs and they collect livestock faeces (which can be mixed with dog

faeces) which are used for fuel for fires. They generally cannot wash their hands before eating because there is very little water, potable or otherwise, in or near the grazing areas. This nomadic population harbors a high risk of infection and subsequent development of CE, which could explain the high incidence reported for them: much higher than for other ethnic groups (Schantz et al. 2003).

In conclusion, our molecular study has demonstrated that the high incidence of CE in Qinghai is not due to a specific aggressive genotype but, more probably, to the specific conditions of life of the Tibetan herdspeople. There is therefore an urgent need to better understand the influence of these conditions of life on the risk of contamination to stop the transmission of the parasite to humans and to develop effective measures to control CE in Qinghai.

References

- Bart JM, Bardonnet K, Elfegoun MC, Dumon H, Dia L, Vuitton DA, Piarroux R (2004) *Echinococcus granulosus* strain typing in North Africa: comparison of eight nuclear and mitochondrial DNA fragments. *Parasitology* 128(Pt 2):229–234
- Bart JM, Morariu S, Knapp J, Ilie MS, Pitulescu M, Anghel A, Cosoroaba I, Piarroux R (2006a) Genetic typing of *Echinococcus granulosus* in Romania. *Parasitol Res* 98(2):130–137
- Bart JM, Abdukader M, Zhang YL, Lin RY, Wang YH, Nakao M, Ito A, Craig PS, Piarroux R, Vuitton DA, Wen H (2006b) Genotyping of human cystic echinococcosis in Xinjiang, PR China. *Parasitology* 133(Pt 5):571–579
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL (2007) GenBank. *Nucleic Acids Res*. 35 Database issue: D21–5
- Bowles J, Blair D, McManus DP (1994) Molecular genetic characterization of the cervid strain ('northern form') of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 109(Pt 2):215–221
- Cabrera M, Canova S, Rosenzvit M, Guarnera E (2002) Identification of *Echinococcus granulosus* eggs. *Diagn Microbiol Infect Dis* 44(1):29–34
- Campbell G, Garcia HH, Nakao M, Ito A, Craig PS (2006) Genetic variation in *Taenia solium*. *Parasitol Int* 55(Suppl): S121–S126
- Craig PS, McManus DP, Lightowlers MW, Chabalgoity JA, Garcia HH, Gavidia CM, Gilman RH, Gonzalez AE, Lorca M, Naquira C, Nieto A, Schantz PM (2007) Prevention and control of cystic echinococcosis. *Lancet Infect Dis* 7(6):385–394
- Eckert J, Deplazes P (2004) Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev* 17(1):107–135
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791
- Giraudoux P, Craig PS, Delattre P, Bao G, Bartholomot B, Harraga S, Quere JP, Raoul F, Wang Y, Shi D, Vuitton DA (2003) Interactions between landscape changes and host communities can regulate *Echinococcus multilocularis* transmission. *Parasitology* 127(Suppl):S121–S131
- Kimura M (1980) Average time until fixation of a mutant allele in a finite population under continued mutation pressure: studies by analytical, numerical, and pseudo-sampling methods. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(1):522–526
- Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirvela-Koski V, Meri S (2003) Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 127(Pt 3):207–215
- Ma S, H W, WM L (2006) Analysis on epidemic status on echinococcosis in Qinghai Province. *J Trop Med Hyg* 1:8–10
- Maillard S, Benchikh-Elfegoun MC, Knapp J, Bart JM, Koskei P, Gottstein B, Piarroux R (2007) Taxonomic position and geographical distribution of the common sheep G1 and camel G6 strains of *Echinococcus granulosus* in three African countries. *Parasitol Res* 100(3):495–503
- McManus DP, Ding Z, Bowles J (1994) A molecular genetic survey indicates the presence of a single, homogeneous strain of *Echinococcus granulosus* in north-western China. *Acta Trop* 56(1):7–14
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4(4):406–425
- Schantz PM, Wang H, Qiu J, Liu FJ, Saito E, Emshoff A, Ito A, Roberts JM, Delker C (2003) Echinococcosis on the Tibetan Plateau: prevalence and risk factors for cystic and alveolar echinococcosis in Tibetan populations in Qinghai Province, China. *Parasitology* 127(Suppl):S109–S120
- Scott JC, McManus DP (1994) The random amplification of polymorphic DNA can discriminate species and strains of *Echinococcus*. *Trop Med Parasitol* 45(1):1–4
- Scott JC, Stefaniak J, Pawlowski ZS, McManus DP (1997) Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 114(Pt 1):37–43
- Vega R, Pinero D, Ramanankandrasana B, Dumas M, Bouteille B, Fleury A, Scitutto E, Larralde C, Fragoso G (2003) Population genetic structure of *Taenia solium* from Madagascar and Mexico: implications for clinical profile diversity and immunological technology. *Int J Parasitol* 33(13):1479–1485
- Yang YR, Rosenzvit MC, Zhang LH, Zhang JZ, McManus DP (2005) Molecular study of *Echinococcus* in west-central China. *Parasitology* 131(Pt 4):547–555

4. DISCUSSION

Cette étude a été réalisée dans le but de déterminer si un génotype particulier d'*E. granulosus* pouvait expliquer les fortes prévalences observées dans la province chinoise du Qinghai. En utilisant les marqueurs mitochondriaux *cox1*, *nad1* et *atp6*, nous avons caractérisé le polymorphisme génétique de 55 échantillons collectés dans cette région, principalement des échantillons provenant de patients chinois hospitalisés (37 sur 55).

Nos résultats ont montré un niveau important de variabilité génétique mais les 13 variants identifiés étaient tous proches du génotype G1 de la souche ovine commune. Ce même constat avait également été observé dans d'autres foyers d'échinococcose kystique [7-9, 114]. Parce que la plupart des génotypes rapportés ici ont également été retrouvés dans d'autres foyers, l'hypothèse qu'un génotype particulier pouvant expliquer l'hyperendémicité chinoise peut être écartée. Néanmoins, le variant G1M5 est apparu le plus fréquent dans ce travail mais également dans d'autres foyers [7, 9]. La distribution géographique de ce génotype s'étend donc sur de nombreux foyers et inclue des pays qui diffèrent les uns des autres par de nombreuses caractéristiques (topographie, climat, us et coutumes de la population, etc.). Ce variant a été également observé chez un large spectre d'hôte intermédiaire. Dans notre étude, il a été identifié chez des humains, des bovins et des ovins. Dans d'autres, il a été trouvé non seulement dans ces hôtes mais également chez des yaks.

La population parasitaire du Qinghai ne diffère pas significativement de celle retrouvée dans d'autres foyers. Les fortes prévalences humaines et animales résulteraient donc de facteurs autres tels que ceux liés à l'hôte. Il est intéressant de noter que tous les patients étudiés sont tibétains. Au Qinghai, la population Ha représente 54% de la population tandis que les tibétains et les Hui représentent respectivement 23% et 16% (**Encadré 3**). Les Han et les Hui vivent dans le nord du Qinghai (Xining City, le bassin Caidamu et la vallée Hehyang), travaillent principalement dans l'industrie, l'agriculture et le commerce et donc, sont très peu en contact avec des chiens, l'hôte définitif principal d'*E. granulosus*. Au contraire, les tibétains sont des nomades qui vivent généralement de l'élevage. Ils habitent le plus souvent dans des yourtes (**Figure 31**) dans le sud du plateau du Qinghai. Appelé le toit du monde, le plateau du Tibet-Qinghai est vaste et culmine à 4 500m d'altitude, est composé de terres arables et de hautes montagnes. En raison de sa topographie et de son climat, l'élevage

(principalement les ovins, les bovins et les yaks) est pratiqué dans 90% de la superficie de la province. Les chiens sont généralement utilisés pour garder les troupeaux. Par conséquent, tous les acteurs sont présents dans cette zone pour assurer le cycle biologique du parasite. Les éleveurs tibétains ont un mode de vie qui est très différent des ethnies plus urbanisées du nord du Qinghai. L'environnement, leur mode de vie nomade et leurs pratiques religieuses créent une situation complexe en termes d'hygiène, de santé et d'éducation et en font une population particulièrement à risque pour l'échinococcose kystique. Dans ces grandes étendues pastorales, les éleveurs tirent leur eau de puits généralement non couverts et qui peuvent donc être souillés par les déjections animales (notamment les chiens). Lorsque les animaux sont abattus pour fournir de la nourriture et de la fourrure, les viscères sont généralement gardés pour nourrir les chiens. Ces derniers font partie intégrante du cadre familial et dorment au sein du foyer. Par ailleurs, parmi les 37 échantillons humains, 23 sont des femmes. Le risque de contamination semble donc accru pour elles et cela pourrait s'expliquer par la répartition des tâches au sein de la famille. Les femmes sont en effet responsables des chiens. De plus, elles collectent quotidiennement des fèces de chien et d'autres animaux pour le chauffage de leur habitat. Comme les puits potables ne sont pas toujours à proximité, les femmes qui s'occupent de la collecte des fèces n'ont généralement pas la possibilité de se laver les mains avant de vaquer à d'autres occupations, comme préparer à manger ou même, manger.

Cette population nomade cumule donc de nombreux facteurs de risque pour la contamination et le développement du parasite. En l'absence de génotype particulier dans ce foyer, ces facteurs pourraient être plus à même d'expliquer les forts taux de prévalence observés dans cette population, qui sont d'ailleurs beaucoup plus élevés que ceux observés dans les autres ethnies du plateau du Tibet-Qinghai [115].

La République populaire de Chine reconnaît sur son territoire 56 ethnies différentes. En Chine, une nation correspond globalement à une ethnie, un peuple uni par une culture, une langue, une religion ou des traditions propres, bien que cette notion d'ethnie soit vague, selon les critères considérés (langue, religion, géographie ou coutumes).

Les **Han** représentaient plus de 90% de la population totale (1,42 milliard), et les 55 autres ethnies, 8%. Parmi les 55 ethnies minoritaires, à l'exception des Hui et des Mandchous qui utilisent les dialectes chinois, 53 ont leur propre langue, 21 possèdent leur propre écriture et utilisent 27 systèmes d'écriture.

Les **Zhuang**, la première grande minorité (16 millions) sont surtout présents dans les régions de Guangxi, Yunnan, Guangdong, Guizhou et se consacrent surtout à l'agriculture.

Les **Hui** (10 millions) forment une des 10 ethnies musulmanes. La plupart des Hui sont culturellement et anthropologiquement similaires aux Han à cela près qu'ils pratiquent l'islam. Ils vivent principalement dans les provinces du Ningxia et du Gansu, mais on en trouve des communautés dans toute la Chine.

Tout comme les Han, Les **Manchous** (10 millions) sont à 80% engagés dans l'agriculture. Ceux qui vivent dans les villes travaillent surtout dans les industries.

Les **Hmong** (9 millions) constituent un peuple des régions montagneuses du sud de la Chine (spécialement la région du Guizhou) au nord du Viêt Nam et du Laos. Ils sont aussi appelés les **Miao** ce qui signifie « riz cru » et désigne depuis longtemps des populations nomades peu intégrées.

Les **Ouïghour** (7 millions) constituent un peuple turcophone et musulman sunnites habitant le Xinjiang en Chine. Bien que cette région de Chine bénéficie d'un régime officiel d'autonomie, elle connaît comme le Tibet une politique de sinisation par le peuple Han. L'afflux d'immigrants Han pourrait en faire à long terme la principale population dans ce pays à l'origine Ouïghour. Les deux populations se côtoient mais ne se mélangent pas.

L'ethnie **Yi**, forte d'une population de 8 millions de personnes, est répandue principalement dans les provinces du Sichuan, du Yunnan et du Guizhou, ainsi que dans la région autonome Zhuang du Guangxi. De vastes forêts s'étendent dans ces régions.

Les **Tujia** (6 millions) vivent principalement dans la préfecture autonome de Xiangxi Tujia-Miao. Ils sont très semblables aux Han.

Les **Tibétains** (5,4 millions) le gouvernement central chinois a ses organes administratifs au Tibet, où il nomme ou décharge de leurs fonctions les fonctionnaires locaux et assure l'administration des affaires importantes. Les titres de Dalai-Lama ainsi que les sceaux officiels représentant leurs pouvoirs sont conférés par le gouvernement central chinois. Le Dalai-Lama actuellement en exil à l'étranger est né dans la province chinoise du Qinghai. Il a été désigné et intronisé avec l'approbation du gouvernement central de Chine.

Les **Mongols** sont un peuple nomade qui vit actuellement en Mongolie, en Russie et en Chine. Ils sont actuellement environ 9 millions, dont près de 5,8 millions en Chine.

Encadré 3. Principales ethnies chinoises.

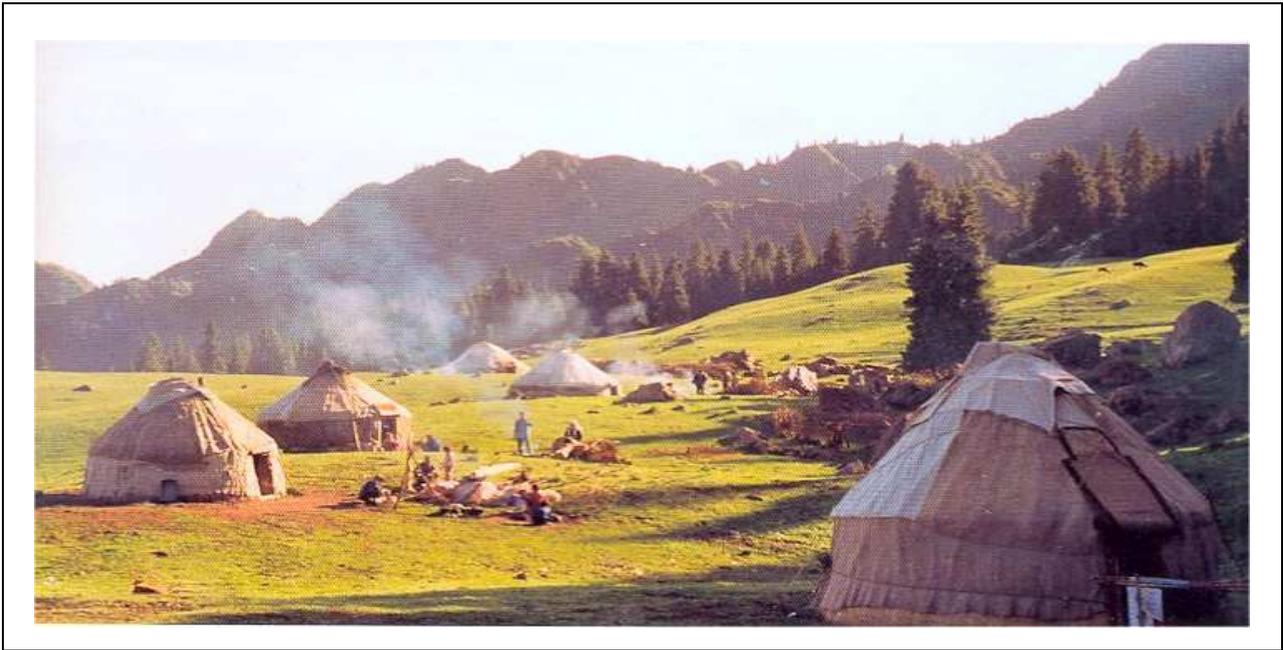


Figure 31. Yourtes tibétaines.

*Les deux études précédentes ont été menées afin de répondre à des problématiques taxonomiques et épidémiologiques précises. Elles ont aussi permis d'évaluer les apports des différentes séquences d'ADN polymorphes les plus couramment utilisées. Les marqueurs mitochondriaux ont montré un niveau de polymorphisme suffisant pour identifier les différentes souches du parasite *E. granulosus* mais aussi, quelques variations intraspécifiques. Toutefois, il n'est pas possible de relier ces variations à l'origine géographique des échantillons et donc, d'identifier des génotypes spécifiques à certains foyers. Les cibles mitochondriales ne permettent pas non plus d'observer des événements de reproduction croisée, contrairement aux marqueurs nucléaires. Néanmoins, dans l'étude du foyer nord africain, ces derniers ont montré un niveau de polymorphisme encore bien inférieur à celui des cibles mitochondriales. Il est par conséquent nécessaire d'évaluer d'autres outils, qui permettraient à la fois d'avoir une importante variabilité et de détecter les hybrides. Nous nous sommes donc intéressés à des marqueurs nucléaires potentiellement très polymorphes, les microsatellites.*

**III- *EVALUATION DE 4
MICROSATELLITES SIMPLE-
LOCUS***

1. INTRODUCTION

L'étude du polymorphisme génétique d'*E. granulosus* se fait généralement grâce aux marqueurs mitochondriaux et dans une moindre mesure, nucléaires. Comme nous l'avons vu précédemment, ces marqueurs montrent des limites. L'utilisation de marqueurs nucléaires très discriminants tels que les microsatellites permettrait d'accéder à un niveau supérieur dans l'analyse génétique de ce polymorphisme. Ces microsatellites sont des séquences ADN constitués de courts motifs répétés (2 à 5 nucléotides). Le nombre de ces répétitions est d'ailleurs à la source de leur variabilité.

A ce jour, hormis Egmsca1, 2 et Egmsga 1 définis directement à partir du génome nucléaire d'*E. granulosus*, très peu de microsatellites simple-locus ont été utilisés pour étudier ce groupe. La cible Egmsca1 a permis d'analyser le polymorphisme de 73 échantillons d'Amérique du sud [73]. Les échantillons brésiliens qui portaient la souche bovine G5 du parasite et les échantillons argentins qui portaient la souche cameline présentaient tous l'allèle [CA]₇. Les échantillons brésiliens et argentins portant les souches ovine commune ou ovine de Tasmanie présentaient 2 allèles, (CA)₈ et (CA)₁₀. Ce travail décrivait pour la première fois l'identification et la caractérisation de microsatellite chez *E. granulosus*.

Un plus grand nombre de microsatellites simple-locus ont été développés et utilisés dans le cadre de l'étude d'*E. multilocularis* : U1 snRNA, EMms1 (rebaptisé NAK1) et EMms2 [74, 76, 78]. Cependant, ces microsatellites n'ont pas montré pas un polymorphisme suffisant pour permettre un suivi de variants à différentes échelles géographiques. Trois autres microsatellites ont été développés dans notre laboratoire : EmsJ, EmsK et EmsB. Ces trois marqueurs ainsi que NAK1 ont été utilisés pour caractériser un panel de 76 échantillons *E. multilocularis* collectés en Alaska, au Canada, en Europe et en Asie [78]. EmsJ et EmsK isolèrent les échantillons provenant d'Europe des autres groupes. Quand à NAK1, il montra la présence d'allèles spécifiques chez les échantillons du Tibet et de l'Alaska.

2. DESCRIPTION DE L'ETUDE

Au cours de notre étude, nous avons évalué les apports des microsatellites simple-locus Egmsca1, NAK1, EmsJ et EmsK à l'étude de l'épidémiologie moléculaire d'*E. granulosus* sensu lato, grâce à un panel de 59 kystes hydatiques collectés chez des bovins, des ovins, des dromadaires et des patients humains dans différentes villes d'Algérie, de Mauritanie et d'Ethiopie. Ces échantillons avaient déjà été caractérisés par les cibles mitochondriales *cox1* et *nad1* au cours de l'étude du foyer nord africain [9]. Les objectifs de ce travail ont donc consisté (i) à évaluer le degré de polymorphisme de ces cibles parmi des échantillons G1 et G6 et (ii) à déterminer s'il existait une relation entre ce polymorphisme et les caractéristiques écoépidémiologiques des échantillons (hôte et origine géographique).

3. MATERIELS ET METHODES

3.1. Echantillonnage

Le panel d'échantillon utilisé dans cette étude se compose de 36 kystes G1 et de 23 kystes G6. Ils ont été collectés par des équipes locales de vétérinaires et de médecins dans trois pays d'Afrique du nord : l'Algérie, la Mauritanie et l'Ethiopie. Leurs caractéristiques écoépidémiologiques sont présentées en **Tableau 3**.

3.2. Typage moléculaire

3.2.1. Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN total est réalisée grâce à l'utilisation du kit « High Pure PCR Preparation Kit » (Roche, Mannheim, Allemagne). Les extraits sont ensuite conservés à une température de -20°C.

| | Echantillon | Hôte | Origine | Souche | | Echantillon | Hôte | Origine | Souche |
|----------------|-------------|------------|-------------|--------|-------------------|-------------|------------|-------------|--------|
| ALGERIE | | | | | | | | | |
| | | | | | 32 | 633 | bovin | Ouargla | G1 |
| 1 | 301 | bovin | Sétif | G1 | 33 | 638 | dromadaire | Ouargla | G6 |
| 2 | 302 | bovin | Constantine | G1 | 34 | 640 | dromadaire | Ouargla | G6 |
| 3 | 304 | bovin | Constantine | G1 | 35 | 641 | dromadaire | Ouargla | G6 |
| 4 | 305 | bovin | Annaba | G1 | 36 | 642 | dromadaire | Ouargla | G1 |
| 5 | 307 | bovin | Batna | G1 | 37 | 643 | dromadaire | Ouargla | G1 |
| 6 | 309 | bovin | Jijel | G1 | MAURITANIE | | | | |
| 7 | 312 | ovin | Batna | G1 | | | | | |
| 8 | 313 | ovin | Constantine | G1 | 38 | 10 | homme | Nouakchott | G6 |
| 9 | 314 | ovin | Sétif | G1 | 39 | 12 | bovin | Nouakchott | G6 |
| 10 | 315 | bovin | Constantine | G1 | 40 | 101 | homme | Nouakchott | G6 |
| 11 | 505 | homme | Tébessa | G1 | 41 | 109 | dromadaire | Nouakchott | G6 |
| 12 | 506 | homme | Batna | G1 | 42 | 110 | dromadaire | Nouakchott | G6 |
| 13 | 516 | bovin | Constantine | G1 | 43 | 113 | dromadaire | Nouakchott | G6 |
| 14 | 525 | dromadaire | Touggourt | G6 | 44 | 116 | dromadaire | Nouakchott | G6 |
| 15 | 527 | dromadaire | Touggourt | G6 | 45 | 117 | dromadaire | Nouakchott | G6 |
| 16 | 528 | dromadaire | Touggourt | G6 | 46 | 207 | dromadaire | Nouakchott | G6 |
| 17 | 531 | ovin | Touggourt | G1 | 47 | 208 | dromadaire | Nouakchott | G6 |
| 18 | 533 | ovin | Touggourt | G1 | 48 | 209 | dromadaire | Nouakchott | G6 |
| 19 | 553 | ovin | Aïn M'lila | G1 | 49 | 210 | dromadaire | Nouakchott | G6 |
| 20 | 570 | bovin | Constantine | G1 | 50 | 212 | dromadaire | Nouakchott | G6 |
| 21 | 571 | bovin | Constantine | G1 | 51 | 213 | dromadaire | Nouakchott | G6 |
| 22 | 572 | bovin | Constantine | G1 | 52 | 214 | dromadaire | Nouakchott | G6 |
| 23 | 622 | ovin | Ouargla | G1 | 53 | 215 | dromadaire | Nouakchott | G6 |
| 24 | 623 | ovin | Ouargla | G1 | 54 | 218 | dromadaire | Nouakchott | G6 |
| 25 | 624 | ovin | Ouargla | G1 | ETHIOPIE | | | | |
| 26 | 625 | ovin | Ouargla | G1 | | | | | |
| 27 | 626 | ovin | Ouargla | G1 | 55 | A74/3 | bovin | Assela | G1 |
| 28 | 627 | ovin | Ouargla | G1 | 56 | S24/1 | ovin | Addis Ababa | G1 |
| 29 | 629 | ovin | Ouargla | G1 | 57 | S29/2 | ovin | Addis Ababa | G1 |
| 30 | 631 | bovin | Ouargla | G1 | 58 | S29/3 | ovin | Addis Ababa | G1 |
| 31 | 632 | bovin | Ouargla | G1 | 59 | S35/1 | ovin | Addis Ababa | G1 |

Tableau 3. Caractéristiques des échantillons utilisés pour l'évaluation des microsatellites EmsJ, EmsK, NAK1 et Egmscal.

3.2.2. Amplification des microsatellites par PCR

3.2.2.1. Microsatellites amplifiés

Les microsatellites EmsJ et EmsK (Références GenBank : respectivement AY680845 et AY680857) ont été caractérisées au laboratoire [78] tandis que les microsatellites EMms1/Nak1 (AB100031) et Egmsca 1 sont extraits de la littérature [73, 76]. Des paires d'amorces spécifiques ont été définies pour chacune de ces cibles : EmsJ 1/2, EmsK 1/2, Egmsca1 F/R, NAK1 A/D (**Tableau 4**).

| Amorces | Séquence des amorces | Température d'hybridation (°C) | Taille des fragments | Motif de répétition |
|-----------|----------------------------|--------------------------------|----------------------|---------------------|
| EmsJ1* | 5'-GAACGCGCTAACCGATTG-3' | 54 | 148-185 | (CT) _n |
| EmsJ2 | 5'-TTAGGAATGGGAAGGTGTCG-3' | | | |
| EmsK1* | 5'-GAGCTCAAAGAACCCGAAG-3' | 54 | 247-249 | (CA) _n |
| EmsK2 | 5'-CCAAACTTCCGCTCACTCTG-3' | | | |
| Egmsca1F* | 5'-CGAAAGTGATGACAAACCAA-3' | 58 | 91-99 | (CA) _n |
| Egmsca1R | 5'-GCTTGATGGAGATGAGGTCG-3' | | | |
| NAK1A* | 5'-GGTAGCCAATGCTGTGGTTT-3' | 55 | 94 | (CAC) _n |
| NAK1D | 5'-TAGTGGGAAGCGATCACGAG-3' | | | |

Tableau 4. Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification par PCR des microsatellites EmsJ, EmsK, NAK1 et Egmsca1.

*Amorce marquée par un fluorochrome

3.2.2.2. Protocole d'amplification

La réaction de PCR a été réalisée en utilisant 1 µl d'ADN extrait du parasite, 1,5 µl mM de dNTP (1 mM), 0,5 µl d'amorce 5'→3' (12,5 pmol/µl), marquée par un fluorochrome, 0,5 µl d'amorce 3'→5' (20 pmol/µl), 0,5 µl de Red Taq Polymérase (1 U/µl) dans un volume final de 11 µl. Pour les cibles EmsJ et EmsK, la réaction de PCR a été réalisée simultanément avec les deux couples d'amorces. Les cibles Egmsca et Nak1 ont été amplifiées séparément. Les amplifications ont été réalisées dans un thermocycleur de type Master Gradient Eppendorf selon le schéma suivant : une étape préalable de dénaturation de 4 min à 94°C, suivie de 30 cycles de 3 étapes : 30 s à 94°C, 30s à température d'hybridation et 1 min à 72°C. Les produits de PCR peuvent alors être stockés à 4°C.

Un contrôle est réalisé par électrophorèse des produits de PCR sur un gel d'agarose 1,5% soumis à un courant électrique de 100 V pendant 30 min. Un marqueur de taille a également été utilisé (Bio Fidal Ladder 50 bp DNA GeneRuler).

3.2.3. Analyse des fragments produits

Le polymorphisme des microsatellites simples résulte du nombre de répétition du motif à l'intérieur. Afin d'évaluer ce polymorphisme, 0,5 µl de chaque produit de PCR sont ajoutés à 40 µl de formamide et à 0,5 µl de marqueur de taille. Ils sont ensuite placés dans un séquenceur automatique Beckman CEQ 8000. Les fragments y sont séparés grâce à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Un capteur mesure les temps de migration de chacun grâce au fluorochrome qu'ils portent. Le séquenceur calcule ensuite leur taille respective. Il est ensuite possible de comparer les tailles observées.

3.3. Analyse statistique des résultats

EmsJ, EmsK, Egmsca1 et NAK1 sont des microsatellites simple-locus qui présentent donc pour des échantillons homozygotes, un profil composé d'un seul pic. Les données ont été traitées en termes de présence/absence de ces pics.

Leur pouvoir discriminant a été évalué par le calcul de l'indice de Hunter (D) [116]. Il traduit la capacité d'un marqueur à différencier deux échantillons non liés. Plus D est proche de 1, plus la discrimination est forte.

$$D = 1 - \left[\frac{1}{N(N-1)} \sum_{i=1}^S n_i(n_i-1) \right] \quad \text{avec :}$$

N = nombre total d'échantillon

S = nombre total de groupes définis

N_i = nombre d'échantillon dans le groupe j

4. RESULTATS

Les résultats obtenus avec les microsatellites EmsJ, EmsK, Nak1 et Egmsca1 sont synthétisés dans le **Tableau 5**.

4.1. EmsJ

Avec le microsatellite EmsJ, tous les échantillons G1 ont montré un profil complexe qui n'a pas été possible de caractériser. Pour 20 des 23 échantillons G6, un pic unique à 162 pb a pu être observé. Les 3 autres G6 n'ont pu être amplifiés.

4.2. EmsK

Pour 35 des 36 échantillons G1, le microsatellite EmsK a montré un pic unique à 249 pb. Un pic à 247 pb a été obtenu pour 22 des 23 échantillons G6. Les deux derniers échantillons n'ont pu être amplifiés pour cette cible.

4.3. NAK1

Trente quatre des 36 échantillons G1 ont montré un pic à 93 pb tandis que le dernier G1 a montré un pic à 107 pb. Pour pouvoir utiliser cette cible, un couple d'amorces plus spécifiques a dû être défini (NAK1 A/D, A/R, C/D, C/R, F/D et F/R) car les amorces NAK1 A/B ne donnaient aucun résultat pour la souche ovine G1. Cela a été réalisé à partir de la séquence de NAK1 disponible dans la littérature (référence GenBank : AB100031, [76]). Concernant les échantillons G6, seuls deux échantillons (525 et 528) ont pu être amplifiés. Ils ont montré respectivement un pic à 265 et un pic à 268 pb.

4.4. Egmsca1

Avec le microsatellite Egmsca1, les échantillons G1 montrèrent deux profils composés d'un seul pic (93 ou 97 pb) et deux profils mixtes composés de deux pics (93/97 ou 95/97 ou 97/99 pb). Au total, 45% des échantillons G1 présentaient le profil 93/97, 28% le profil 93, 22% le profil 97 et 2,5% présentant soit le profil 95/97, soit le profil 97/99. L'indice de Hunter nous donne un pouvoir discriminant $D=0,7$ donc un indice moyen. Les échantillons G6 ont tous montré un profil unique composé d'un pic à 91 pb.

| G1 | Egmsca1 | | | | EmsK 249 | NAK1 | | G6 | Egmsca1 91 | EmsJ 162 | EmsK 247 | NAK1 | |
|-------|---------|----|----|----|-------------|------|-----|-----|---------------|-------------|-------------|------|-----|
| | 93 | 95 | 97 | 99 | | 93 | 107 | | | | | 265 | 268 |
| 301 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 525 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 302 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 527 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 304 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 528 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 305 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 638 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 307 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 640 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 309 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 641 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 312 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 10 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 313 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 12 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 314 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 101 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 315 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 109 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 505 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 110 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 506 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 113 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 516 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 116 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 531 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 117 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 533 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 207 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 553 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 208 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 570 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 209 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 571 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 210 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 572 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 212 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 622 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 213 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 623 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 214 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 624 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 215 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 625 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 218 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 626 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | | | | | | |
| 627 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | | | | | | |
| 629 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | | | | | | |
| 631 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | | | | | | |
| 632 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | | | | | | |
| 633 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | | | | | | |
| 642 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | | | | | | |
| 643 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | | | | | | |
| E74/3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | | | | | | |
| E24/1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | | | | | | |
| E29/2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | | | | | | |
| E29/3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | | | | | | |
| E35/1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | | | | | | |

Tableau 5. Résultats des analyses menées avec les microsatellites simples EmsJ, EmsK, NAK1 et Egmsca1.

La présence d'un pic est codée 1 tandis que l'absence de pic est codée 0.

5. DISCUSSION

Au cours de ce travail, le polymorphisme de quatre microsatellites simple-locus a été évalué grâce à 59 échantillons *E. granulosus* : EmsJ, EmsK, NAK1 et Egmsca1. Ces marqueurs ont permis de différencier la souche ovine/*E. granulosus* sensu stricto G1 de la souche cameline/*E. canadensis* G6. Seul le microsatellite Egmsca1 a permis d'identifier plusieurs variants parmi les échantillons G1.

Des difficultés ont été rencontrées pour amplifier la cible NAK1. Initialement, les amorces avaient été définies à partir du génome du parasite *E. multilocularis*. Plusieurs couples d'amorces différents ont donc dû être redéfinis à partir de cette même séquence mais seul le couple d'amorces NAK1 A/D a permis d'amplifier les échantillons G1. Il serait nécessaire d'isoler la séquence Nak1 dans le génome nucléaire de la souche cameline G6.

Au cours de cette étude, seul le microsatellite Egmsca1 a montré une variabilité intraspécifique. Pour les échantillons G1, nous avons obtenu différents génotypes avec 50% de profils simples et 50% de profils mixtes. Pour des microsatellites simples, l'obtention de profils mixtes pourrait s'expliquer par une mutation ponctuelle d'un des deux allèles. Toutefois, dans le cas de cette étude, le taux d'hétérozygotie 93/97 est tel qu'il serait davantage en faveur d'échanges génétiques entre un ver homozygote 93 et un ver homozygote 97.

Parmi les 4 microsatellites étudiés, Egmsca1 est le plus polymorphe avec un indice de discrimination de $D=0,7$. Toutefois, tous comme pour les autres microsatellites simple-locus testés dans cette étude, ce polymorphisme reste très faible. Ces outils présentent également d'autres limites. En effet, leur nature simple-locus leur confère une sensibilité pour l'amplification et le typage qui pourrait ne pas être suffisante pour l'étude de vers adultes et d'œufs et les profils mixtes obtenus seraient à considérer avec précaution. Par conséquent, tous comme les marqueurs mitochondriaux, les microsatellites simple-locus ne nous permettent pas de répondre à notre objectif principal : définir une approche permettant à la fois d'identifier des variants que nous pourrions suivre à différentes échelles géographiques et discuter la taxonomie du parasite.

***IV- EVALUATION DU
MICROSATELLITE MULTILOCUS
EMSB***

1. INTRODUCTION

La plupart des études génétiques portant sur *E. granulosus* sensu lato utilisent le polymorphisme mitochondrial. Récemment, quatre espèces distinctes ont été définies au sein de ce groupe paraphylétique : *E. granulosus* sensu stricto (G1 à G3), *E. equinus* (G4), *E. ortleppi* (G5) et *E. canadensis* (G6 à G10). Néanmoins, cette approche montre des limites notables.

A ce jour, très peu de marqueurs nucléaires ont été utilisés pour caractériser ces espèces et ainsi, s'assurer de leur pertinence. Une étude a récemment été menée dans des foyers où la circulation sympatrique de plusieurs variants avait déjà été observée (Argentine, Algérie, Brésil et Roumanie). Des isolats G1, G2, G5, G6 et G7 ont été collectés dans ces régions particulières et ont été analysés grâce aux marqueurs *mdh* et *EgAgB4*. Trois variants ont été identifiés avec *mdh* (Md1 - Md3) et deux avec *EgAgB4* (*EgAgB-1* et *EgAgB-2*). Les allèles Md1 et Md2 et *EgAgB4-1* ont été plus fréquemment trouvés chez des échantillons G1 et G2 tandis que Md3 et *EgAgB4-2* ont été plus fréquemment trouvés chez des échantillons G5 et G7. L'obtention de profils mixtes dans cette étude suggère l'absence d'une barrière de reproduction fortement installée entre les différents variants. Néanmoins, il apparaît dans de nombreuses études telles que celles-ci, que les marqueurs nucléaires « classiques » manquent de pouvoir discriminant et qu'aucune des variations observées ne peut être reliée spécifiquement à une zone géographique [9, 63, 117].

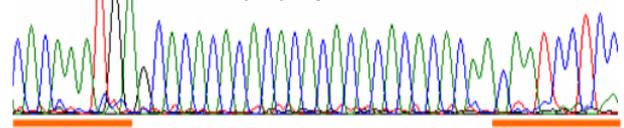
Récemment, Bart *et al.* ont identifié un microsatellite multilocus (**Encadré 4, Figure 32 et 33**, [77]). Malgré sa relative complexité, EmsB montre d'intéressantes propriétés : spécificité, sensibilité, répétabilité, reproductibilité, stabilité dans le temps et surtout, un fort pouvoir discriminant. Grâce à ce nouvel outil, de nombreux variants génétiques ont pu être identifiés au sein d'*E. multilocularis*, une espèce sœur considérée comme extrêmement homogène [76]. Ces variants ont pu être reliés avec l'origine géographique des échantillons utilisés et cela, aussi bien à l'échelle d'un continent qu'à l'échelle d'une prairie [78-81]. De plus, étant d'origine nucléaire, ce microsatellite peut subir des recombinaisons génétiques suite à des croisements entre variants.

Un microsatellite simple apparaît en une seule copie dans le génome.

Le motif (CA) dans cet exemple est présent 12 fois. La présence de séquence conservée de part et d'autre de cette séquence permet son amplification spécifique. De part ses caractéristiques, il ne montre qu'un seul polymorphisme, celui qui correspond au nombre de répétition du motif (CA).

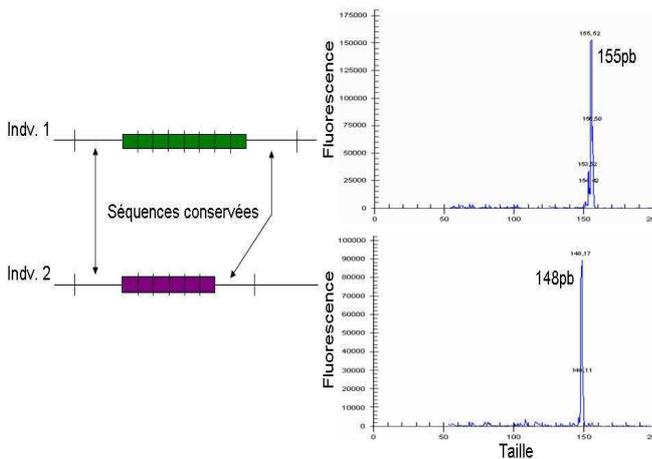
210 220 230 240 250
 CACAAATGATCACACACACACACACACACACACACACAAACAATCCTCC

Motif (CA) répété 12 fois



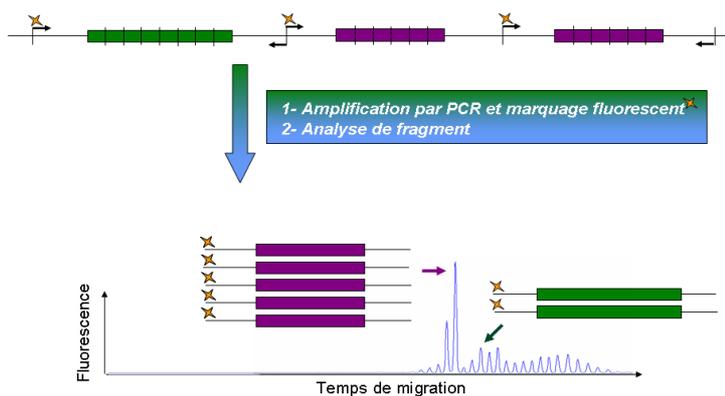
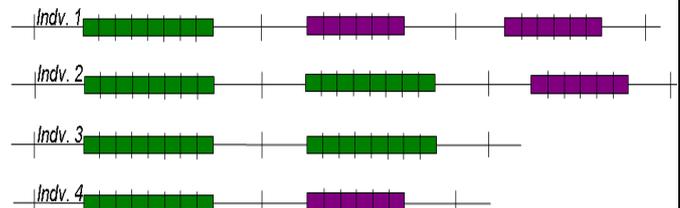
Séquence conservée

Analyse de fragment



Lors de l'amplification de ce microsatellite, l'utilisation d'une amorce fluorescente permet de marquer chaque fragment, quelque soit sa taille (qui dépend du nombre de répétition du motif). Ces fragments sont ensuite séparés suivant leur temps de migration lors d'une électrophorèse automatisée au travers d'un gel constitué de polyacrylamide. La lecture de la fluorescence au moment du passage de chaque fragment devant le capteur permet d'obtenir des profils composés de pics. En abscisse est représenté le temps de migration (qui dépend de la taille) et en ordonnée la fluorescence mesurée. Deux allèles différents produiront des pics décalés puisque leur taille respective sera différente.

Concernant le microsatellite complexe EmsB, cela équivaut à un microsatellite simple répété plusieurs fois (pour EmsB, ces unités sont positionnées en tandem). A chaque unité correspond un nombre déterminé de répétition du motif. Le nombre de répétition de ces unités est lui-même variable dans le génome.



Comme pour l'amplification PCR d'un microsatellite simple, l'utilisation d'une amorce marquée venant se fixer au niveau de séquences conservées permettra de marquer chaque fragment produit. Lors de la migration électrophorétique, quand deux unités de même taille passeront devant le capteur de fluorescence, l'intensité mesurée sera proportionnelle. EmsB produira des profils complexes dont les pics seront de nombre et de hauteur variables.

Encadré 4. D'un microsatellite simple à un microsatellite complexe.

(A) Profils obtenus par PCR montrant les caractéristiques structurales du microsatellite EmsB. Aux lignes 1, 2, 5 et 6 correspondent des échantillons *E. multilocularis* et aux lignes 3, 4 et 7 des échantillons *E. granulosus* (N=control négatif, MW=poids moléculaire). Les amorces EmsB A/B amplifient une région de 0,6 Kb contenant la séquence microsatellite et une de 1,4 Kb contenant deux fois cette séquence ainsi que la région située entre elles. Les amorces Aext/Bext qui sont complémentaires à EmsB A/B amplifient spécifiquement cette région (0,2 Kb). La seconde bande observée avec ces amorces (1 Kb) montre l'amplification de deux de ces régions, entrecoupées d'une séquence microsatellite.

(B) Interprétation graphique de ces résultats. Le sens d'amplification PCR est indiqué par les flèches. L'amorce C est également située. La séquence microsatellite est localisée entre les amorces A et C.

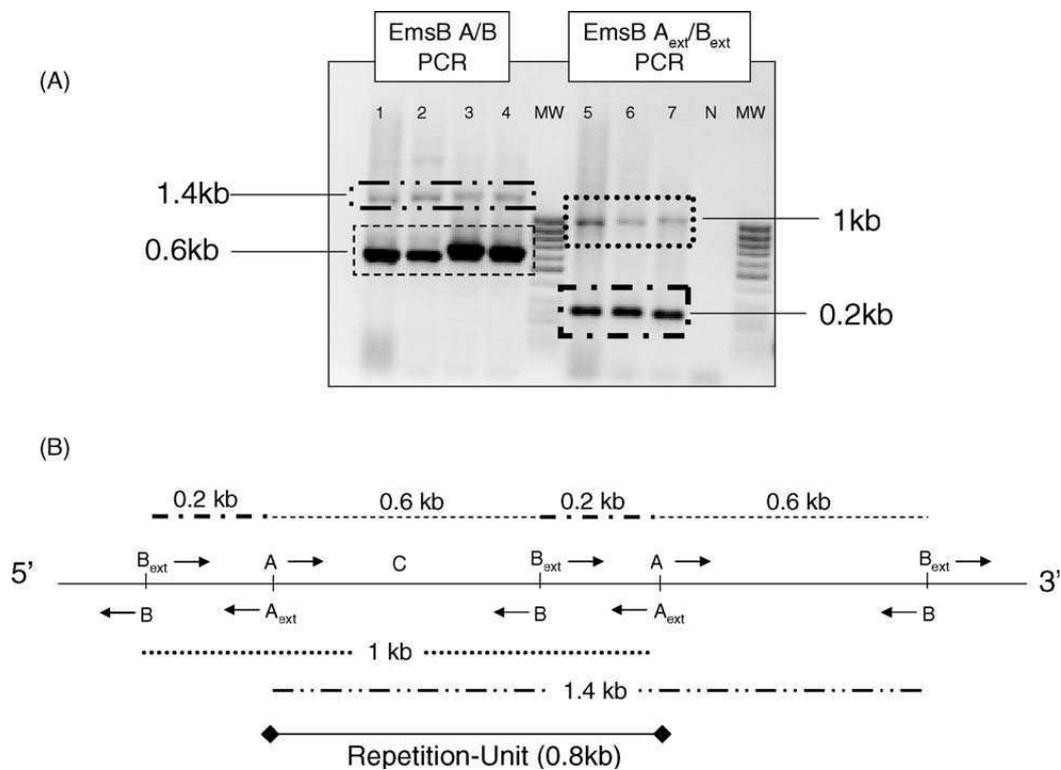


Figure 32. Structure du microsatellite multilocus EmsB.

[77]

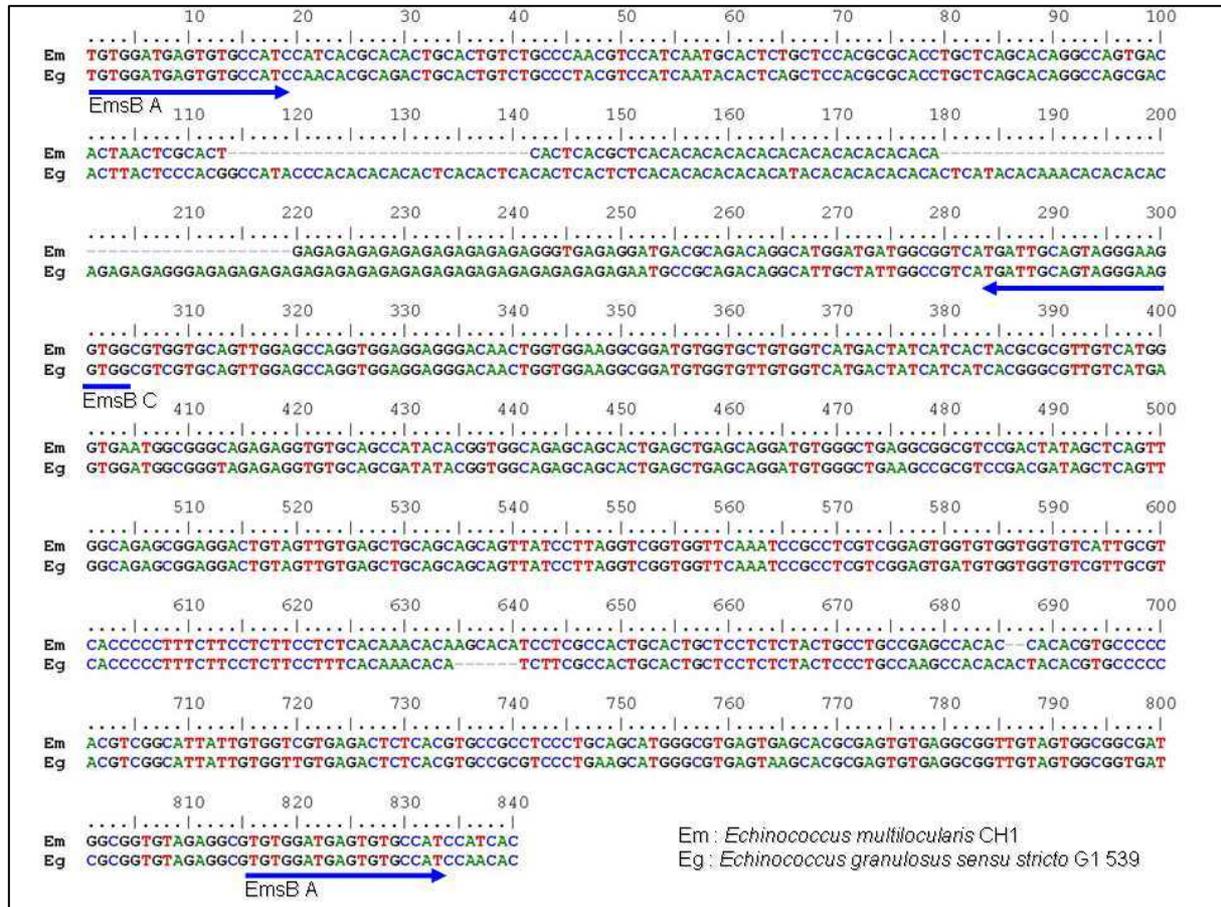


Figure 33. Séquences du microsatellite EmsB obtenues à partir du clonage d'un échantillon *E. multilocularis* collecté en suisse (CH1) et d'un échantillon *E. granulosus sensu stricto* G1 collecté en Algérie (539).

EmsB A/C : couple d'amorce permettant l'amplification du microsatellite.

[77]

2. DESCRIPTION DE L'ETUDE

Afin d'évaluer cet outil pour l'étude d'*E. granulosus* sensu lato, nous avons étudié le polymorphisme génétique de 127 échantillons collectés dans 6 pays endémiques pour l'échinococcose kystique. Cette évaluation a porté sur deux critères : d'une part, l'identification de variants intraspécifiques et d'éventuels liens avec l'origine géographique des échantillons et d'autre part, sa capacité à mettre en évidence des événements de reproduction croisée.

3. PUBLICATION

Publication 3 : Maillard, S., B. Gottstein, K.L. Haag, S. Ma, I. Colovic, M.C. Benchikh-Elfegoun, J. Knapp, and R. Piarroux (2009). "The *EmsB* tandemly repeated multilocus microsatellite: a new tool to investigate genetic diversity of *Echinococcus granulosus* sensu lato." *J Clin Microbiol* **47**(11): p. 3608-16.

The EmsB Tandemly Repeated Multilocus Microsatellite: a New Tool To Investigate Genetic Diversity of *Echinococcus granulosus* Sensu Lato[∇]

S. Maillard,^{1,2*} B. Gottstein,² K. L. Haag,³ S. Ma,⁴ I. Colovic,⁵ M. C. Benchikh-Elfegoun,⁶ J. Knapp,¹ and R. Piarroux^{1,7}

UMR6249 CNRS/UFC Chrono-Environnement, Department of Parasitology and Mycology, University of Franche-Comté, Besançon, France¹; Institute of Parasitology, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Bern, Switzerland²; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil³; Institute of Parasitology, Medical College of Qinghai University, Xining City, Qinghai Province, China⁴; Institute of Microbiology and Immunology, University of Belgrade, Faculty of Medicine, Belgrade, Serbia⁵; Laboratory of Parasitology, University of Mentouri, Constantine, Algeria⁶; and Department of Parasitology and Mycology, Hôpital la Timone, Marseille, France⁷

Received 12 May 2009/Returned for modification 29 June 2009/Accepted 30 August 2009

Cystic echinococcosis (CE) is a widespread and severe zoonotic disease caused by infection with the larval stage of the eucestode *Echinococcus granulosus* sensu lato. The polymorphism exhibited by nuclear and mitochondrial markers conventionally used for the genotyping of different parasite species and strains does not reach the level necessary for the identification of genetic variants linked to restricted geographical areas. EmsB is a tandemly repeated multilocus microsatellite that proved its usefulness for the study of genetic polymorphisms within the species *E. multilocularis*, the causative agent of alveolar echinococcosis. In the present study, EmsB was used to characterize *E. granulosus* sensu lato samples collected from different host species (sheep, cattle, dromedaries, dogs, and human patients) originating from six different countries (Algeria, Mauritania, Romania, Serbia, Brazil, and the People's Republic of China). The conventional mitochondrial *cox1* and *nad1* markers identified genotypes G1, G3, G5, G6, and G7, which are clustered into three groups corresponding to the species *E. granulosus* sensu stricto, *E. ortleppi*, and *E. canadensis*. With the same samples, EmsB provided a higher degree of genetic discrimination and identified variations that correlated with the relatively small-scale geographic origins of the samples. In addition, one of the Brazilian single hydatid cysts presented a hybrid genotypic profile that suggested genetic exchanges between *E. granulosus* sensu stricto and *E. ortleppi*. In summary, the EmsB microsatellite exhibits an interesting potential for the elaboration of a detailed map of the distribution of genetic variants and therefore for the determination and tracking of the source of CE.

Cystic echinococcosis (CE) is a widespread and severe zoonosis caused by infection with the larval stage of the eucestode *Echinococcus granulosus* sensu lato. Classification of the organisms within this paraphyletic taxon has undergone and continues to undergo important changes. Mitochondrial DNA-based studies have shown that *E. granulosus* sensu lato is composed of 10 heterogeneous groups of variants, defined as strains (strains G1 to G10) (5, 6, 17). However, these strains are now reorganized within distinct species (21, 25). *E. granulosus* sensu stricto encompasses strains G1, G2, and G3; *E. equinus* corresponds to strain G4; and *E. ortleppi* comprises strain G5. Strains G6, G7, G8, G9, and G10 have been also classified under a well-supported monophyletic species, *E. canadensis* (16, 19, 21). Recently, the lion strain has been characterized as another new species, *E. felidis* (11).

Currently, mitochondrial and nuclear markers are not sufficiently polymorphic for use for the identification of genetic variations that could reflect geographically based peculiarities. The use of sensitive tools such as microsatellites may provide

more information about the polymorphism of the parasite and the spatial-temporal characteristics of its patterns of transmission between foci. However, to date, only four single-locus microsatellites have been used to investigate *E. granulosus* sensu lato isolates: U1snRNA, EgmSca 1, EgmSca 2, and EgmSga 1. The U1snRNA gene exhibited 11 distinct profiles: 8 for *E. granulosus* sensu stricto (G1/G2), 2 for *E. ortleppi* (G5), and 1 for *E. canadensis* (G6) (22). However, no spatial correlation with the geographic origin of the isolates was observed. Among the three microsatellites described by Bartholomei-Santos et al. (4), only EgmSca 1 correlated the genotypes with the origins of the samples.

Recently, Bart et al. (3) developed EmsB, a tandemly repeated multilocus microsatellite, for the genotyping of *E. multilocularis*. This marker showed a higher level of intraspecific variability compared with that shown by any previously published marker, as well as a very high degree of sensitivity (7, 13–15). It is composed of an array of 800-bp DNA fragments containing a variable combination of CA and GA repeats. The use of such a microsatellite could contribute to the better identification of the spatial-temporal characteristics of the *E. granulosus* transmission patterns, as is the case for *E. multilocularis*. Indeed, using this new tool, Knapp et al. managed to perform efficient genetic tracking of *E. multilocularis* isolates in different foci of alveolar echinococcosis (13–15). Furthermore,

* Corresponding author. Mailing address: Institute of Parasitology, University of Bern, Länggass-Strasse 122, Bern CH-3012, Switzerland. Phone: 41 316312396. Fax: 41 316312622. E-mail: maillard_steph@yahoo.com.

[∇] Published ahead of print on 9 September 2009.

TABLE 1. Characteristics of the 66 clusters of samples showing the same profile with the EmsB multilocus microsatellite (E1 to E66)

| EmsB profile | Characteristics of samples showing the EmsB profiles | | | | | |
|--------------|--|--------------------|------------------------|---|---|------------------------------------|
| | No. of samples | Origin | Host | Mitochondrial polymorphism ^a : | | Species |
| | | | | <i>cox1</i> | <i>nad1</i> | |
| E1 | 2 | China | Fox | M1 | M1 | <i>E. multilocularis</i> |
| E2 | 3 | China | Dog, cattle, and human | G1 and G1 (246G → T) | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E3 | 2 | Algeria | Sheep | G1 and G1 (56 → T) | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E4 | 1 | Algeria | Cattle | G1 | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E5 | 1 | Brazil | Cattle | G1 | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E6 | 1 | Serbia | Human | G1 (154A → G, 211A → C) | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E7 | 1 | Algeria | Sheep | G1 | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E8 | 1 | Romania | Cattle | G1 | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E9 | 2 | Romania | Sheep | G1 | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E10 | 2 | Algeria | Sheep | G1 and G3 | G1 (282C → T) and G2/G3 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E11 | 1 | Algeria | Cattle | G1 (56C → T) | G1 (150T → C, 282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E12 | 1 | Algeria | Dromedary | G1 | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E13 | 1 | China | Human | G1 | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E14 | 2 | China | Human | G1 | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E15 | 1 | China | Human | G1 | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E16 | 1 | China | Human | G1 | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E17 | 1 | China | Cattle | G1 (123T → C) | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E18 | 4 | China | Cattle and human | G1, G1 (123T → C), and G3 | G1 (282C → T) and G2/G3 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E19 | 1 | China | Human | G1 | G1 (282C → T, 426A → G) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E20 | 2 | China | Human | G3 | G2/G3 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E21 | 2 | China | Human | G1 | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E22 | 2 | China | Human | G1 | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E23 | 4 | China | Sheep | G1 (246G → T) and G3 | G1 (282C → T) and G2/G3 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E24 | 1 | China | Dog | G1 | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E25 | 2 | China | Sheep | G1 and G1 (246G → T) | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E26 | 2 | Algeria | Cattle and human | G1 (66C → T) and G1 (108T → C, 111C → T) | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E27 | 4 | Algeria and Serbia | Cattle and human | G1 and G1 (220A → G) | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E28 | 1 | Algeria | Cattle | G1 | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E29 | 2 | Algeria | Sheep and cattle | G1 and G1 (56C → T) | G1 (282C → T) and G1 (121A → G, 237G → A, 282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E30 | 1 | Romania | Pig | G3 | G2/G3 (282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |
| E31 | 2 | Algeria | Sheep and human | G1 | G1 (282C → T) and G1 (66C → T, 121A → G, 282C → T) | <i>E. granulosus sensu stricto</i> |

Continued on next page

TABLE 1—Continued

| EmsB profile | Characteristics of samples showing the EmsB profiles | | | | | |
|--------------|--|-----------------------------|-------------------------|---|--|--|
| | No. of samples | Origin | Host | Mitochondrial polymorphism ^a : | | Species |
| | | | | <i>cox1</i> | <i>nad1</i> | |
| E32 | 3 | Algeria and Romania | Sheep and cattle | G1 | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus</i> sensu stricto |
| E33 | 2 | Algeria and Romania | Sheep and cattle | G1 | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus</i> sensu stricto |
| E34 | 3 | Algeria | Cattle | G1 | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus</i> sensu stricto |
| E35 | 4 | Algeria and Romania | Sheep and cattle | G1, G1 (312G → A), G1 (56C → T, 325A → G), and G3 | G1 (282C → T) and G2/G3 (237T → A, 282C → T) | <i>E. granulosus</i> sensu stricto |
| E36 | 4 | Algeria, Romania and Brazil | Cattle and human | G1 and G1 (73T → C) | G1 (282C → T and G1 (208T → G, 282C → T) | <i>E. granulosus</i> sensu stricto |
| E37 | 2 | Romania and Brazil | Cattle | G1 | G1 (282C → T) and G1 (28C → T, 181T → C, 282C → T) | <i>E. granulosus</i> sensu stricto |
| E37 | Sample B395 ^b | Brazil | Cattle | G1 | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus</i> sensu stricto/ <i>E. ortleppi</i> |
| E38 | 7 | Algeria and Romania | Sheep, cattle and human | G1 and G3 (228A → G) | G1 (282C → T) and G2/G3 (282C → T) | <i>E. granulosus</i> sensu stricto |
| E39 | 3 | Algeria and Romania | Sheep and cattle | G1 (56C → T, 111C → T), G1 (204T → G), and G3 | G1 (282C → T) and G2/G3 (282C → T) | <i>E. granulosus</i> sensu stricto |
| E40 | 2 | Algeria | Cattle | G1 | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus</i> sensu stricto |
| E41 | 2 | Romania | Cattle | G3 | G2/G3 (282C → T) | <i>E. granulosus</i> sensu stricto |
| E42 | 2 | Romania | Sheep and cattle | G1 (66C → T, 228A → G) and G3 | G2/G3 (282C → T) | <i>E. granulosus</i> sensu stricto |
| E43 | 1 | Romania | Sheep | G1 | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus</i> sensu stricto |
| E44 | 1 | China | Human | G1 | G1 (228T → C, 282C → T) | <i>E. granulosus</i> sensu stricto |
| E45 | 10 | China | Human | G1 and G3 | G1 (282C → T), G1 (228T → C, 282C → T), and G2/G3 (282C → T) | <i>E. granulosus</i> sensu stricto |
| E46 | 3 | Brazil | Cattle | G5 | G5 | <i>E. ortleppi</i> |
| E46 | Sample B395 ^b | Brazil | Cattle | G1 | G1 (282C → T) | <i>E. granulosus</i> sensu stricto/ <i>E. ortleppi</i> |
| E47 | 1 | Mauritania | Human | G6 (129T → C, 269T → C) | G6 | <i>E. canadensis</i> |
| E48 | 1 | Mauritania | Dromedary | G6 | G6 | <i>E. canadensis</i> |
| E49 | 1 | Mauritania | Dromedary | G6 | G6 | <i>E. canadensis</i> |
| E50 | 2 | Mauritania | Dromedary, Human | G6 | G6 and G6 (165T → C) | <i>E. canadensis</i> |
| E51 | 1 | Mauritania | Dromedary | G6 | G6 | <i>E. canadensis</i> |
| E52 | 2 ^c | Mauritania | Dromedary | G6 | G6 | <i>E. canadensis</i> |
| E53 | 3 | Algeria | Dromedary | G6 | G6 | <i>E. canadensis</i> |
| E54 | 1 | Algeria | Dromedary | G6 | G6 | <i>E. canadensis</i> |
| E55 | 1 | Algeria | Dromedary | G6 | G6 | <i>E. canadensis</i> |
| E56 | 1 | Serbia | Human | G7 (195T → C) | G7 | <i>E. canadensis</i> |
| E57 | 1 | Mauritania | Dromedary | G6 | G6 | <i>E. canadensis</i> |
| E58 | 1 | Mauritania | Dromedary | G6 | G6 | <i>E. canadensis</i> |
| E59 | 1 | Serbia | Human | G7 | G7 | <i>E. canadensis</i> |
| E60 | 1 | Romania | Pig | G7 | G7 | <i>E. canadensis</i> |
| E61 | 2 | Romania | Pig | G7 | G7 | <i>E. canadensis</i> |
| E62 | 1 | Romania | Pig | G7 | G7 | <i>E. canadensis</i> |
| E63 | 1 | Romania | Pig | G7 | G7 | <i>E. canadensis</i> |
| E64 | 1 | Algeria | Dromedary | G6 | G6 (165T → C) | <i>E. canadensis</i> |
| E65 | 1 | Algeria | Dromedary | G6 | G6 | <i>E. canadensis</i> |
| E66 | 1 | Algeria | Dromedary | G6 | G6 | <i>E. canadensis</i> |

^a The mitochondrial *cox1* and *nad1* sequences obtained from the 129 samples of this study were compared with the sequences reported by Bowles et al. (5, 6); their *E. granulosus* sensu lato genotypes G1, G2, G3, G5, G6, and G7 and *E. multilocularis* genotype M1 were used here as reference strains. With the marker *nad1*, G2 and G3 could not be distinguished (G2/G3). When a sequence showed additional mutations when it was compared to the sequence of the reference genotype, these mutations and their positions in this genotype are indicated in parentheses.

^b B395, *E. granulosus* sensu stricto/*E. ortleppi* hybrid Brazilian sample.

^c One of the two samples showing this EmsB profile was selected to study the repeatability of the EmsB profiles and determine the threshold used for hierarchical classification.

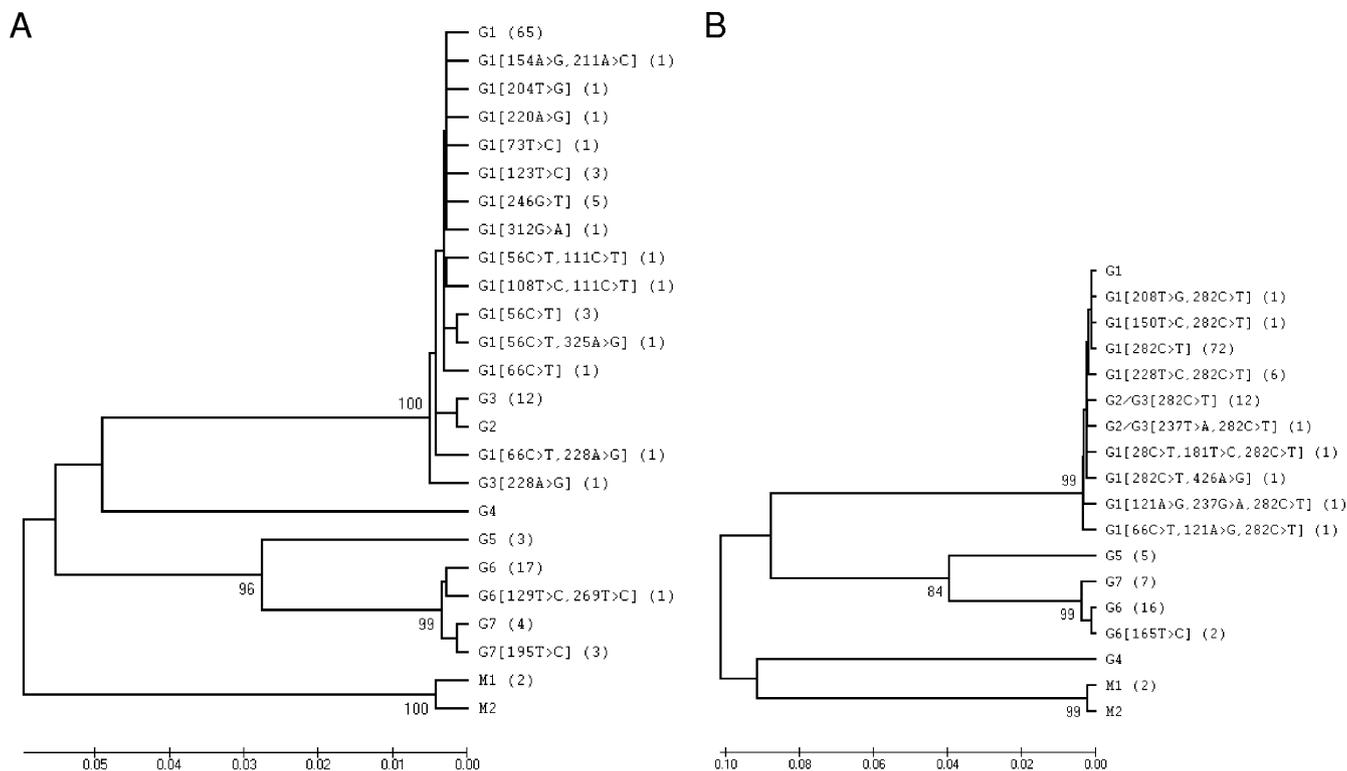


FIG. 1. Dendrograms constructed with the *cox1* (A) and *nad1* (B) mitochondrial gene sequences obtained from the 129 samples evaluated in this study. MEGA software was used (24). A bootstrap test with 1,000 repetitions was performed, and values above 75% are indicated. The sequences were compared to the sequences of *E. granulosus sensu lato* genotypes G1, G3, G6, and G7 and *E. multilocularis* genotypes M1 and M2 reported by Bowles et al. (5, 6). When a sequence showed mutations compared to the sequence of the reference genotype, these mutations and their positions in this genotype are indicated in brackets. For each sequence, the corresponding number of samples is reported in parentheses.

because of its localization within the nuclear genome, cross-fertilization processes may modify EmsB patterns. Therefore, this microsatellite may be an interesting marker for use for both assessment of the genetic polymorphism of *E. granulosus sensu lato* and detection of the genetic exchange events between the variants.

In the present work, we tackled its variability using a panel of 127 *E. granulosus sensu lato* samples collected in six countries where CE is endemic.

MATERIALS AND METHODS

Isolates. One hundred twenty-seven unilocular hydatid cysts ($n = 125$) and adult worms ($n = 2$) were collected from different intermediate or definitive hosts (their characteristics are reported in Table 1) in six different countries where CE is endemic. The cysts from animals were isolated in slaughterhouses by local veterinarians. The cysts from human patients were surgically resected in hospitals for the treatment of CE and were then given anonymously to the Department of Parasitology and Mycology, UMR6249, for scientific research. The two adult worms were isolated by local veterinarians from the intestines of two dogs captured and euthanized during a campaign to regulate the stray dog population in Qinghai Province, People's Republic of China.

Among the 45 samples from Algeria, 24 samples (from sheep, cattle, and human patients) originated from the urban region along the Mediterranean coast of northern Algeria, while the other samples (from sheep, cattle, and dromedaries) came from the pastoral Ouargla/Touggourt region near the Sahara Desert. Ten samples (from human patients or cattle) came from the region of Nouakchott, the capital of Mauritania. Seven samples were isolated from cattle in the Brazilian region of Rio Grande do Sul. Thirty-six cysts (from sheep, cattle, and human patients) were collected in five different prefectures of Qinghai Province. Twenty-three samples (from sheep, cattle, and pigs) were collected

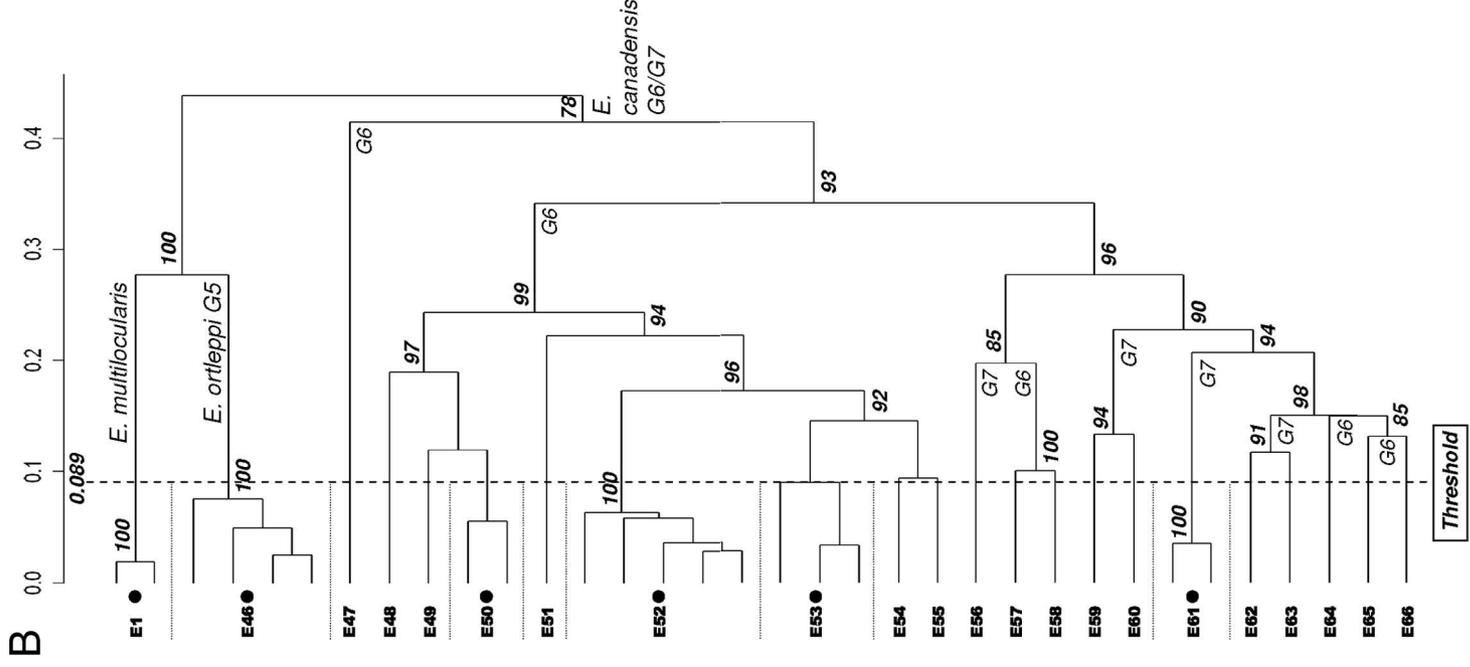
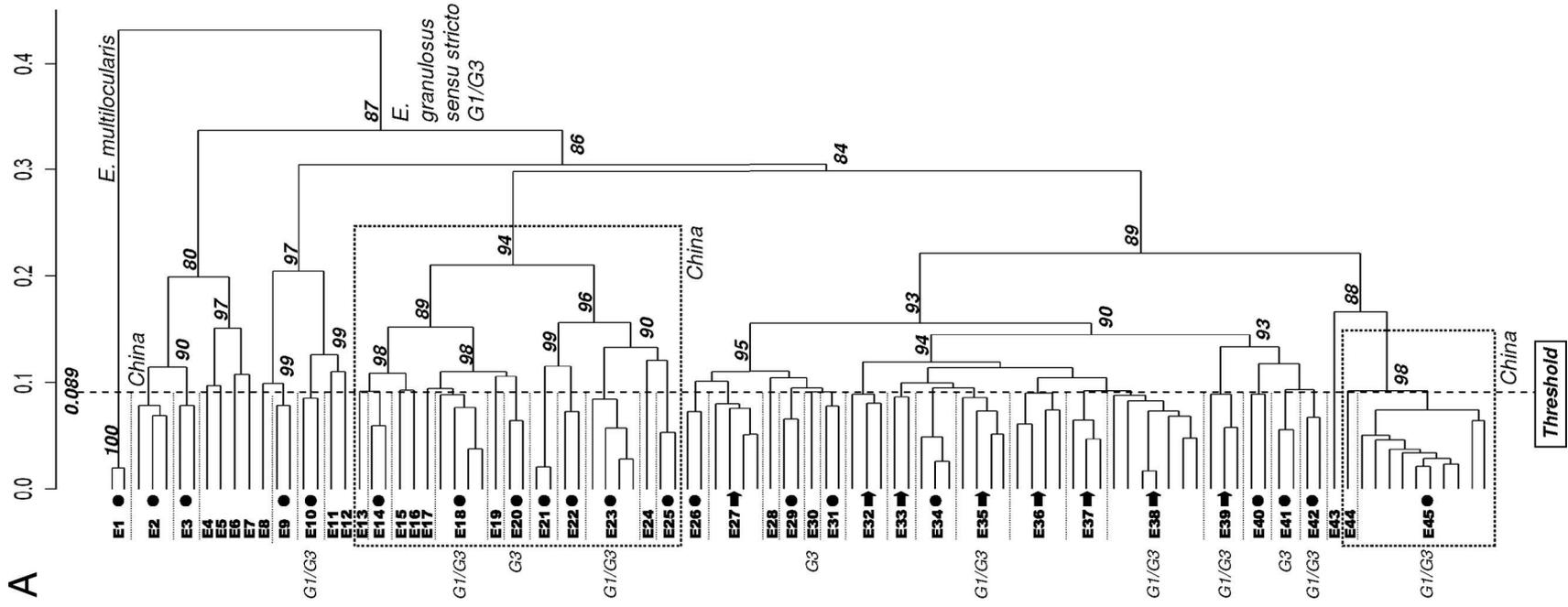
from four different places in Romania, and four samples were taken from human patients in the hospital of Belgrade, Serbia. Two adult worms were collected from foxes killed by hunters in Qinghai Province.

DNA extraction, PCR amplification, and sequencing. For each isolate, genomic DNA was extracted by using a High Pure PCR preparation kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

A portion of the *cox1* mitochondrial gene, which codes for subunit 1 of the cytochrome *c* oxidase and a portion of the *nad1* mitochondrial gene, which codes for subunit 1 of the NADH dehydrogenase, were amplified by PCR (the primers have been described by Bart et al. [3]). PCR amplification was performed as previously reported by Maillard et al. (18). The presence of amplicons was checked by electrophoresis in a 1.5% (wt/vol) Tris-acetate-EDTA agarose gel. The sequencing protocols and the subsequent ethanol purification of the fragments were also the same as those reported by Maillard et al. (18).

Genotype identification and phylogenetic reconstruction. The *cox1* and *nad1* mitochondrial gene sequences were aligned by using Bioedit software, version 7.0.5.3 (10). These sequences were compared to those reported by Bowles and colleagues (5, 6). The genetic distances were calculated in accordance with the Kimura two-parameter model of nucleotide substitution (12), and the samples were clustered by the neighbor-joining method (23). The phylogenetic reconstructions were performed with MEGA software (24). The dendrograms were rooted with the sequences obtained from the two *E. multilocularis* samples, and a bootstrap test with 1,000 repetitions was done to evaluate the robustness of each dichotomy (8).

The EmsB tandemly repeated multilocus microsatellite. PCR amplification of the EmsB fragments was carried out in a reaction mixture with a final volume of 10 μ l containing 1 μ l genomic DNA, 150 μ M of each deoxynucleoside triphosphate (GeneAmp; Applied Biosystems), 0.5 μ M of fluorescent forward primer/1 μ M of nonlabeled reverse primer (the primers used have been described by Bart et al. [3]), and 0.5 U of Red *Taq* DNA polymerase in 1.5 μ l 10 \times reaction buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The reaction was performed as follows: 30 cycles of denaturation at 94 $^{\circ}$ C for 30 s, annealing at 60 $^{\circ}$ C for 30 s, and extension



at 72°C for 1 min. The presence of amplicons was determined by electrophoresis in 1.5% (wt/vol) Tris-acetate-EDTA agarose gels.

Fragment analysis was performed with an automatic sequencer (ABI Prism 3130; Applied Biosystems). For each sample, we obtained a profile composed of several peaks; the time of migration of each fragment is on the abscissa, and the intensity of the fluorescence is on the ordinate. These parameters were directly related to the size of each locus and the number of repetitions of the locus in the genome (2). For the mathematical study of these profiles, we followed the procedures reported by Knapp et al. (13–15). By using R software and the pvcult library (20), the Euclidean distances between these profiles were calculated and a hierarchical clustering analysis was performed with an average linkage algorithm (see Fig. 2). The robustness of each dichotomy was calculated with a bootstrap test of 1,000 iterations (8). Knapp et al. tested the reproducibility and repeatability of EmsB microsatellite analyses by comparing the profiles obtained from several experiments performed with the same isolate maintained in vivo for several months and calculated a genetic threshold for identification of the isolate clusters (14). In order to adapt this threshold to the experimental conditions of the present work and to ascertain the clonality of the protoscolecids for the EmsB microsatellite, one cyst (cyst M110) was selected from the panel, and the protocol was performed four times: four distinct tubes, each of which contained 25 mg fragment of the germinal layer and a pool of protoscolecids, were investigated. The tubes were then used separately for DNA extraction, PCR amplification, and EmsB fragment analysis. The Euclidean distances between the four profiles were calculated, and a threshold was determined by using the same process described by Knapp et al. (14). Below this limit, the profiles were considered identical.

RESULTS

Mitochondrial polymorphism. The *cox1* and *nad1* sequences were compared to those reported by Bowles and colleagues (5, 6). The genotypes identified in this study and detailed in Table 1 were used to draw two mitochondrial dendrograms, represented in Fig. 1. The two adult worms collected from foxes belonged to the species *E. multilocularis* and were used as the outgroup control.

The EmsB tandemly repeated multilocus microsatellite. All of the fragments produced by the amplification of EmsB were between 250 bp and 310 bp for samples from *E. granulosus sensu stricto* and *E. canadensis* and between 220 bp and 240 bp for samples from *E. ortleppi* and *E. multilocularis*. The four profiles obtained by the analysis of sample M110 four times were extremely similar. The threshold calculated from these profiles was equal to 0.089. At this limit, 44 EmsB profiles were discriminated within *E. granulosus sensu stricto* samples (samples E2 to E45): 20 within *E. canadensis* samples (samples E47 to E66), 1 within *E. ortleppi* samples (sample E46), and 1 within *E. multilocularis* samples (the outgroup control, sample E1). In a global hierarchical classification of all the samples based on the similarities of the EmsB profiles, no *E. granulosus sensu stricto* profile clustered with the *E. canadensis* profiles. To obtain more robust ramifications and better visibility, the classification was subdivided into two dendrograms (Table 1 and Fig. 2). The first dendrogram included the *E. granulosus sensu stricto* samples, and the second contained the *E. canadensis*

and the *E. ortleppi* samples. In the first dendrogram, 44 distinct EmsB profiles were distinguished. Among those, 27 profiles included more than one sample. Nineteen of them grouped samples collected in the same area, and eight corresponded to samples collected from different foci. The hierarchical clustering analysis showed that 34 of the 37 Chinese samples were regrouped into two specific groups. The most important was an assemblage of 13 profiles found in 24 samples (samples E13 to E25 in Table 1). The second assemblage was formed by two profiles (named E44 and E45 in Table 1) that were weakly separated, and 1 and 10 samples, respectively, had those two profiles. The 13 G3 samples provided 11 different EmsB profiles, but 8 of them were also identified in G1 samples.

In the second dendrogram, the three *E. ortleppi* samples showed the same profile. Only 4 of the 20 *E. canadensis* profiles reassembled more than one sample. Each of these four profiles corresponded to a given geographical location. For the seven G7 samples, the EmsB microsatellite produced six different profiles. Even though we found no profile that was shared by the G6 and G7 samples, the hierarchical clustering analysis failed to separate the G6 profile from the G7 profile, and all of them were mixed in a monophyletic cluster of profiles (Fig. 2).

Using the nuclear marker EmsB, we also obtained a hybrid profile for a Brazilian isolate (Fig. 3). This profile was composed of two ranges of peaks: the first range was between 220 bp and 240 bp (13 peaks, sample E46), and the other was between 250 bp and 310 bp (21 peaks, sample E36). When they were added to the hierarchical clustering analysis of the EmsB profiles, the first range strongly clustered with the Brazilian *E. ortleppi* samples and the second range clustered with the Brazilian *E. granulosus sensu stricto* samples. The *cox1* and *nad1* sequences obtained from this sample were clearly G1, which allowed us to completely exclude the hypothesis that a mixture of two samples (one G1 and one G5) was present.

DISCUSSION

The main objective of this study was to estimate the value of the EmsB microsatellite for the identification and the geographical tracking of variants within *E. granulosus* parasite populations (strains and other groups). By using two mitochondrial markers of reference, *cox1* and *nad1*, and the EmsB multilocus microsatellite, we assessed the polymorphisms of 127 samples collected from six different hosts originating from six areas of endemicity: Algeria, Mauritania, Serbia, Romania, the People's Republic of China, and Brazil.

Mitochondrial markers could be discriminated into three groups, corresponding to samples from *E. granulosus sensu stricto* (99 samples), *E. canadensis* (25 samples), and *E. ortleppi*

FIG. 2. Hierarchical clustering analysis tree constructed with the 129 profiles provided by the EmsB multilocus microsatellite. The Euclidean distances calculated between the profiles are represented on the abscissa. A bootstrap test was done to assess the robustness of the branches. All mathematical analyses were performed with R software (20). Two dendrograms are drawn: the first one included all 99 *E. granulosus sensu stricto* G1/G3 samples (A), while the second one included the 25 *E. canadensis* G6/G7 samples and the 3 *E. ortleppi* G5 samples (B). A threshold was calculated with the four profiles obtained with different pools of protoscolecids and fragments of the germinal layer of the same cyst (cyst M110). Under this threshold, the EmsB profiles are considered to be identical. By this method, E1 to E66 represent clusters of samples showing the same profile. The characteristics of these clusters are detailed in Table 1. When a profile was found in more than one sample, a symbol was added: circles, all the samples showing this profile were collected from the same area; arrows, all the samples were collected from different areas.

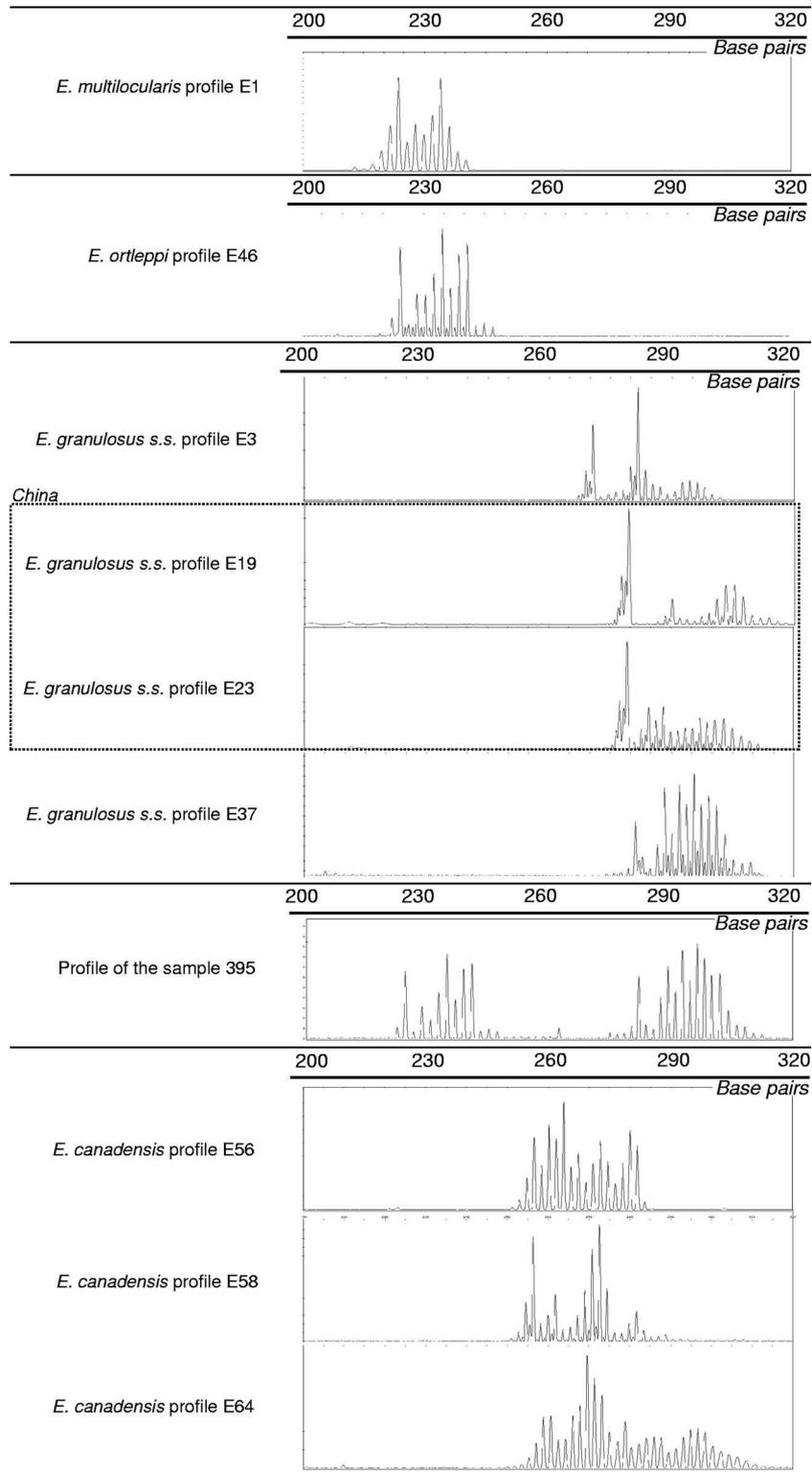


FIG. 3. Examples of the profiles obtained with the EmsB multilocus microsatellite. The lengths of the EmsB fragments are indicated on the abscissa, and the measure of fluorescence is indicated on the ordinate. For Brazilian sample B395, EmsB showed a mixed *E. granulosus sensu stricto* (s.s.) and *E. orteppi* profile.

(3 samples). The results corroborated the regrouping of genotypes G1 and G3 into a monophyletic and robust species, *E. granulosis* sensu stricto, and the regrouping of G6 and G7 into another monophyletic and robust species, *E. canadensis*, while *E. ortleppi* could be clearly individualized. On a continental scale, mitochondrial sequences of samples belonging to the same species could sometimes specify the geographical origins of the samples. For instance, the *E. canadensis* G6 samples from North Africa differed slightly from the *E. canadensis* G7 samples from Europe. In this study, genotype G6 was found in dromedaries and human patients in Algeria and Mauritania, while genotype G7 was found in pigs and human patients in Romania and Serbia. Similarly, some specific mutations could be used to identify Chinese *E. granulosis* sensu stricto isolates. However, within a given species, mitochondrial markers failed to exhibit a polymorphism that could pinpoint the geographical origin of samples at the subcontinental scale.

On the other hand, the EmsB multilocus microsatellite showed a higher degree of polymorphism and discriminatory power than the mitochondrial markers. However, because we found an overlap between the profiles for *E. granulosis* sensu stricto and *E. canadensis*, as well as between the profiles for *E. ortleppi* and *E. multilocularis*, we do not recommend the use of this marker to identify a sample to the species level. At such a level, mitochondrial and nuclear DNAs are polymorphic enough to allow the species identification of isolates by sequencing of the PCR products. As previously reported for *E. multilocularis*, EmsB is useful for investigation of the genetic variability at the subspecies level, especially for epidemiological purposes (7, 13–15). The present study showed that the EmsB microsatellite was sufficiently polymorphic for assessment of populations of parasites at the scale of their foci. The two profiles showed by almost all of the Chinese samples suggest a local and isolated population of parasites and an absence of interactions with the other foci studied. Conversely, some G1 profiles were found in several foci and were able to spread from one continent to another. For example, the E36 profile clustered the genotype G1 samples collected from Algeria, Romania, and Brazil. Owing to the nature of the hosts involved in the developmental cycle of *E. granulosis* sensu lato, the circulation of genotypes may be attributed to worldwide commercial exchanges. With regard to the genotype G3 samples, the EmsB microsatellite provided eight profiles that had also been identified in G1 samples. This result corroborated the weak pertinence of this genetic discrimination and the regrouping of the G1 and G3 strains into a monophyletic species, *E. granulosis* sensu stricto. The G6 and G7 samples showed distinct profiles, but these profiles did not form specific groups in the hierarchical clustering analysis. The EmsB microsatellite distinguished the G6 and G7 samples, but despite the high degree of polymorphism provided by this tool, this distinction stays weak and could corroborate the regrouping of G6 and G7 into the monophyletic species *E. canadensis*. Furthermore, with the microsatellite, one of the Brazilian samples showed a G1/G5 hybrid profile. Such a pattern cannot be found in a pure clonal context. This result proved that cross-fertilization processes between *E. granulosis* sensu stricto and *E. ortleppi* have certainly occurred at least once. The observation of such a hybrid genotype could suggest the absence of a strongly installed reproductive barrier between these two species (1). The

observation of such a heterozygote is very rare in the genus *Echinococcus* (9).

Overall, the EmsB microsatellite may potentially be useful for assessment of the genetic diversity within *E. granulosis*: both genotypes with a restricted distribution and genotypes with a widespread distribution were revealed in the field, and this might potentially have been driven by the trading of the hosts. Furthermore, EmsB genetic exchanges between distinct G1 and G5 populations of parasites circulating in the same focus may occur. As such, EmsB may be useful for assessment of the genetic polymorphism of *E. granulosis* and of its spatial distribution in detail. Knapp and colleagues earlier showed that this microsatellite enriched a powerful panel of markers that may be used to study the temporal and spatial development of *E. multilocularis* (7, 13–15). In the present study, we demonstrated that this observation also holds true for *E. granulosis* sensu lato. The next challenge will be to enlarge the panel of *E. granulosis* isolates and genotypes and to superimpose the genetic distribution map on ecoepidemiological data. The principal interest in such studies is the determination, at the local scale, of the genotypes that circulate in different foci of *E. granulosis*. The establishment of a detailed geographical map of genotypes could be essential to determine and track the source of CE. In addition, the accurate identification of the paths of circulation used by the parasite could be useful for isolation of the source and could thus increase the efficiency and the stability in time of the actions engaged against CE.

REFERENCES

1. Badaraco, J. L., F. J. Ayala, J. M. Bart, B. Gottstein, and K. L. Haag. 2008. Using mitochondrial and nuclear markers to evaluate the degree of genetic cohesion among *Echinococcus* populations. *Exp. Parasitol.* 119:453–459.
2. Bart, J. M., J. Knapp, B. Gottstein, F. El-Garch, P. Giraudoux, M. L. Glowatzki, H. Berthoud, S. Maillard, and R. Piarroux. 2006. EmsB, a tandem repeated multi-loci microsatellite, new tool to investigate the genetic diversity of *Echinococcus multilocularis*. *Infect. Genet. Evol.* 6:390–400.
3. Bart, J. M., S. Morariu, J. Knapp, M. S. Ilie, M. Pitulescu, A. Anghel, I. Cosoroaba, and R. Piarroux. 2006. Genetic typing of *Echinococcus granulosus* in Romania. *Parasitol. Res.* 98:130–137.
4. Bartholomei-Santos, M. L., L. S. Heinzlmann, R. P. Oliveira, G. Chemale, A. M. Gutierrez, L. Kamenetzky, K. L. Haag, and A. Zaha. 2003. Isolation and characterization of microsatellites from the tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 126(Pt 6):599–605.
5. Bowles, J., D. Blair, and D. P. McManus. 1992. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54:165–173.
6. Bowles, J., and D. P. McManus. 1993. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *Int. J. Parasitol.* 23:969–972.
7. Casulli, A., J. M. Bart, J. Knapp, G. La Rosa, G. Dusher, B. Gottstein, A. Di Cerbo, M. T. Manfredi, C. Genchi, R. Piarroux, and E. Pozio. 2009. Multilocus microsatellite analysis supports the hypothesis of an autochthonous focus of *Echinococcus multilocularis* in northern Italy. *Int. J. Parasitol.* 39:837–842.
8. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791.
9. Haag, K. L., A. M. Araujo, B. Gottstein, M. Siles-Lucas, R. C. Thompson, and A. Zaha. 1999. Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (Cestoda: Taeniidae): selfing or outcrossing? *Parasitology* 118(Pt 1):63–71.
10. Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95–98.
11. Huttner, M., M. Nakao, T. Wassermann, L. Siefert, J. D. Boomker, A. Dinkel, Y. Sako, U. Mackenstedt, T. Romig, and A. Ito. 2007. Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. *Int. J. Parasitol.* 38:861–868.
12. Kimura, M. 1980. Average time until fixation of a mutant allele in a finite population under continued mutation pressure: studies by analytical, numerical, and pseudo-sampling methods. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:522–526.
13. Knapp, J., J.-M. Bart, P. Giraudoux, M. L. Glowatzki, I. Breyer, F. Raoul, P. Deplazes, G. Dusher, K. Martinek, P. Dubinsky, M. H. Guislain, F. Cliquet, T. Romig, P. Malczewski, B. Gottstein, and R. Piarroux. 2009. Genetic

- diversity of the cestode *Echinococcus multilocularis* in red foxes at a continental scale in Europe. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**:e452.
14. Knapp, J., J. M. Bart, M. L. Glowatzki, A. Ito, S. Gerard, S. Maillard, R. Piarroux, and B. Gottstein. 2007. Assessment of use of microsatellite polymorphism analysis for improving spatial distribution tracking of *Echinococcus multilocularis*. *J. Clin. Microbiol.* **45**:2943–2950.
 15. Knapp, J., M. H. Guislain, J. M. Bart, F. Raoul, B. Gottstein, P. Giraudoux, and R. Piarroux. 2008. Genetic diversity of *Echinococcus multilocularis* on a local scale. *Infect. Genet. Evol.* **8**:367–373.
 16. Lavikainen, A., M. J. Lehtinen, S. Laaksonen, E. Agren, A. Oksanen, and S. Meri. 2006. Molecular characterization of *Echinococcus* isolates of cervid origin from Finland and Sweden. *Parasitology* **133**(Pt 5):565–570.
 17. Lavikainen, A., M. J. Lehtinen, T. Meri, V. Hirvela-Koski, and S. Meri. 2003. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* **127**(Pt 3):207–215.
 18. Maillard, S., M. C. Benchikh-Elfegoun, J. Knapp, J. M. Bart, P. Koskei, B. Gottstein, and R. Piarroux. 2007. Taxonomic position and geographical distribution of the common sheep G1 and camel G6 strains of *Echinococcus granulosus* in three African countries. *Parasitol. Res.* **100**:495–503.
 19. Nakao, M., D. P. McManus, P. M. Schantz, P. S. Craig, and A. Ito. 2006. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* **134**:713–722.
 20. R Development Core Team. 2005. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
 21. Romig, T., A. Dinkel, and U. Mackenstedt. 2006. The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol. Int.* **55**(Suppl.):S187–S191.
 22. Roratto, P. A., M. L. Bartholomei-Santos, A. M. Gutierrez, L. Kamenetzky, M. C. Rosenzvit, and A. Zaha. 2006. Detection of genetic polymorphism among and within *Echinococcus granulosus* strains by heteroduplex analysis of a microsatellite from the U1 snRNA genes. *Genet. Mol. Res.* **5**:542–552.
 23. Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406–425.
 24. Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**:1596–1599.
 25. Thompson, R. C., and D. P. McManus. 2002. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol.* **18**:452–457.

4. DISCUSSION

Cette étude a été réalisée afin d'évaluer les apports du polymorphisme du microsatellite EmsB à l'étude de l'épidémiologie moléculaire et taxonomique de variants du groupe *E. granulosus* sensu lato. Pour cela, nous avons analysé 127 échantillons originaires de six zones géographiques différentes : l'Algérie, la Mauritanie, la Serbie, la Roumanie, la République Populaire de Chine et le Brésil.

Les marqueurs mitochondriaux *cox1* et *nad1* ont permis l'identification de cinq variants de référence à savoir G1, G3, G5, G6 et G7. Ces différents variants ont été regroupés en trois grands ensembles robustes : *E. granulosus* sensu stricto G1/G3 (99 échantillons), *E. canadensis* G6/G7 (25) et *E. ortleppi* G5 (3).

A l'échelle du continent, les séquences mitochondriales montrent parfois des variations liées avec l'origine géographique des échantillons sans toutefois démarquer significativement les populations parasites qui les portent d'autres foyers, comme cela a été démontré dans l'étude du foyer chinois. Ces marqueurs manquent de pouvoir discriminant pour mettre en évidence une variabilité intraspécifique intéressante.

Le microsatellite multilocus EmsB, a montré ici un niveau de polymorphisme nettement supérieur. Néanmoins, la superposition de la plupart des profils *E. granulosus* sensu stricto G1/G3 et *E. canadensis* G6/G7 d'un côté et des profils *E. ortleppi* G5 et *E. multilocularis* de l'autre constitue une limite à cet outil. La comparaison de profils EmsB peut également comporter un risque d'homoplasie. En effet, les pics peuvent être identiques mais ne pas correspondre aux mêmes séquences nucléotidiques au sein du microsatellite [77]. Toutefois, il a été démontré que dans de nombreux types d'analyses de génétique des populations, la forte variabilité de ces séquences d'ADN répété parvenait à compenser le plus souvent cette faible perte d'information [83].

En raison d'une superposition des profils G1 et G6 mais aussi des profils G5 et *E. multilocularis*, EmsB ne permet pas d'obtenir une séparation suffisante de ces taxons pour pouvoir les identifier sans les données mitochondriales. Néanmoins, à un niveau sub-spécifique, EmsB fournit des résultats intéressants. Les deux assemblages formés par presque la totalité des échantillons chinois suggèrent une population locale isolée et l'absence

d'interactions avec d'autres foyers. Au contraire, des profils G1 ont été trouvés dans plusieurs foyers ce qui laisse à penser que ce variant se déplace entre ces foyers.

Le microsatellite EmsB a montré chez les échantillons G3, huit profils différents dont une grande partie a également été identifiée chez des échantillons G1. Les échantillons G6 et G7 montrèrent des profils distincts mais ces derniers ne formaient pas deux groupes bien différenciés. Ces résultats corroborent les récentes modifications taxonomiques au sein du groupe *E. granulosus* sensu lato. La distribution exclusive de ces souches pourrait être d'avantage liée à une distribution exclusive des hôtes intermédiaires qu'aux variations génétiques de ces souches.

Dans cette étude, un des échantillons brésiliens montra un profil EmsB hybride G1/G5. Tandis que les marqueurs mitochondriaux *cox1* et *nad1* montraient une séquence clairement de type G1 (**Figure 34**), ce profil hybride arborait à la fois les caractéristiques de profils obtenus à partir d'échantillons brésiliens G1 et dans des proportions identiques, celles de profils obtenus à partir d'échantillons brésiliens G5. Un tel profil mixte ne peut être obtenu dans un contexte qui fait intervenir uniquement l'autofécondation et la multiplication clonale. Grâce à l'étude des séquences mitochondriales, la possibilité d'une contamination a pu être exclue. Ce résultat démontre que des échanges génétiques ont dû certainement se produire entre *E. granulosus* sensu stricto et *E. ortleppi*.

Le microsatellite multilocus EmsB montre un potentiel intéressant pour l'étude de l'épidémiologie moléculaire et taxonomique du parasite *E. granulosus* sensu lato : il a identifié des génotypes circulant localement dans un foyer et des génotypes circulant dans différents foyers mondiaux. Ces derniers diffusent en grande partie grâce aux migrations et au commerce des hôtes qui les hébergent. De plus, EmsB a permis d'observer des échanges génétiques entre des variants circulant dans le même foyer. Des études ont déjà démontré que ce microsatellite permettait d'enrichir grandement le panel des marqueurs disponibles pour l'étude spatiale et temporelle d'*E. multilocularis* [78-81]. Grâce à l'évaluation présentée ici, nous avons démontré que cela est également vrai pour *E. granulosus* sensu lato

Dans cette étude, le microsatellite EmsB a présenté un potentiel intéressant. Il a entre autre permis d'observer des échanges génétiques entre deux variants E. granulosus sensu lato. La reproduction croisée est une voie rarement empruntée naturellement [62]. Il est donc très

difficile d'évaluer l'isolement reproductif des espèces du groupe E. granulosus sensu lato Le seul recours possible est de réaliser une double infection expérimentale chez le chien et ensuite, de caractériser la descendance produite. Seul un marqueur génétique nucléaire, sensible et discriminant pouvait permettre cette caractérisation. Le microsatellite EmsB pouvait donc être utilisé dans le cadre d'une telle étude.

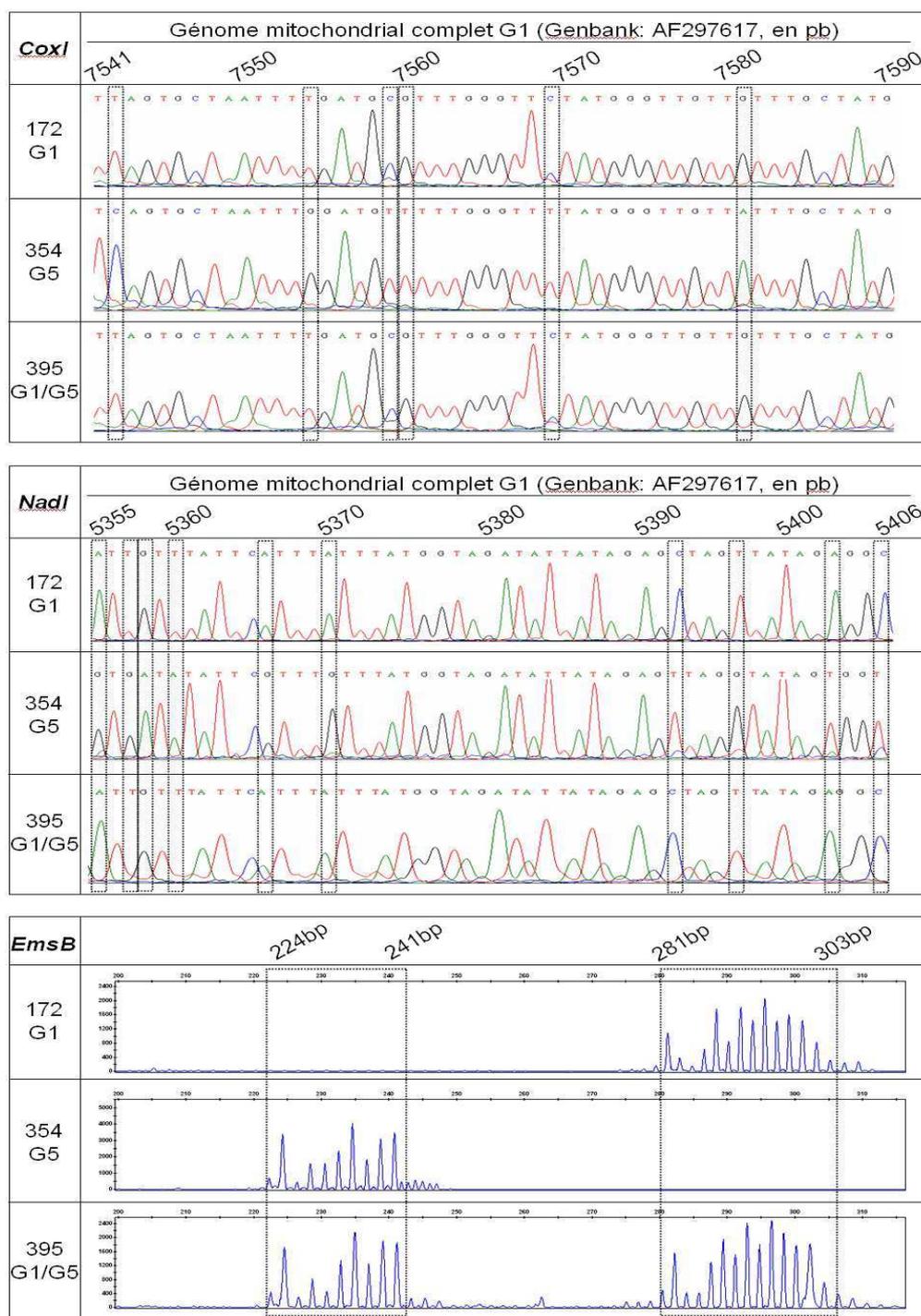


Figure 34. Comparaison des séquences mitochondriales et des profils EmsB obtenus à partir des échantillons brésiliens 172, 354 et 395.

***V- DOUBLE INFECTION
EXPERIMENTALE D'UN CHIEN
PAR G1 ET G6***

1. INTRODUCTION

Dans l'étude du foyer nord africain [9], les souches ovine G1 et cameline G6 sont apparues comme deux entités bien distinctes. De plus, les marqueurs nucléaires n'ont présenté aucun profil hybride parmi les kystes collectés dans la zone sympatrique algérienne. Ces résultats ont alors corroboré la séparation récente de ces deux variants en *E. granulosus* sensu stricto (*E. granulosus* sensu stricto) pour G1 et *E. canadensis* pour G6. L'appréciation de leur réelle divergence, notamment en termes d'isolement reproductif, requiert l'étude de la descendance que ces deux variants pourraient produire chez un hôte définitif contaminé par les deux. Des infections multiples par plusieurs variants *Echinococcus spp.* ont déjà été rapportées mais de telles observations restent rares [118, 119]. Seule la double contamination expérimentale d'un chien par G1 et G6 a pu permettre cette étude. Afin de déterminer les caractéristiques génétiques de la descendance produite, un outil à la fois nucléaire, polymorphe et sensible était nécessaire. Le microsatellite multilocus EmsB présentant ces caractéristiques, il a donc été sélectionné ([77-81], cf. Partie IV). En raison de sa localisation nucléaire, les processus de reproduction croisée peuvent modifier les profils obtenus avec EmsB, comme cela a été observé précédemment entre *E. granulosus* sensu stricto G1 et *E. ortleppi* G5.

2. DESCRIPTION DE L'ETUDE

Dans ce travail, nous avons évalué l'isolement reproductif de la souche G1 (*E. granulosus* sensu stricto) et de la souche cameline G6 (*E. canadensis*). Pour cela, un chien a été infecté expérimentalement par du matériel parasitaire des deux variants. Le microsatellite EmsB a ensuite été utilisé pour étudier la descendance produite (**Encadré 5**).

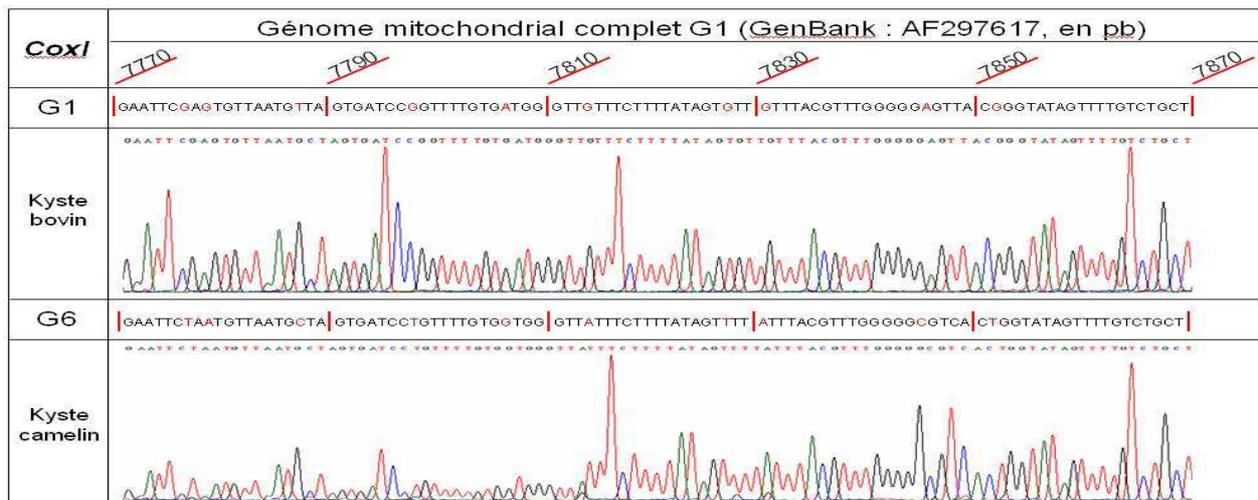
3. PUBLICATION

Publication 4 : Maillard, S., M.C. Benchikh-Elfegoun, K. Kohil, B. Gottstein and R. Piarroux. "Failure to observe cross-fertilization between *Echinococcus granulosus* sensu stricto G1 and *E. canadensis* G6 after an experimental double-infection of the definitive host." *Soumis à Vet Par.*



Le chien a tout d'abord été placé en isolement dans une cage prévue à cet effet. La nourriture et l'eau ont été déposées quotidiennement dans des bacs à l'extérieur de la cage (A) tandis que les excréments ont été récupérées dans un bac situé sous la cage (B). Avant de procéder à la double contamination du chien, un traitement antiparasitaire à base de mébendazole lui a été administré par voie orale afin d'éliminer tous les helminthes digestifs éventuels. Par la suite, sa nourriture a été contrôlée pour éviter toute contamination extérieure.

Deux kystes hydatiques ont été collectés, l'un provenant d'un bovin et l'autre d'un dromadaire. Après identification génétique par les marqueurs mitochondriaux *cox1* et *nad1*, ces kystes G1 et G6 ont été utilisés pour la double infection.



Après 60 jours d'incubation, le chien a été euthanasié et le petit intestin a été ligaturé puis collecté. Une centaine de vers adultes ont été ensuite prélevés sur la muqueuse intestinale. Sous microscope, ils ont été découpés en 2 parties, le scolex d'une part et le strobile qui contient les œufs d'autre part.

Les deux parties ont été analysées avec le microsatellite multilocus EmsB et les profils obtenus ont été comparés avec ceux des kystes hydatiques qui ont servis à la double infection.

(photographies de M.C. Benchikh-Elfegoun)

Encadré 5. Double infection d'un chien par les souches ovine G1 et cameline G6 du parasite *E. granulosus sensu lato*.

1 **Failure to observe cross-fertilization between *Echinococcus granulosus***
2 **sensu stricto G1 and *Echinococcus canadensis* G6 after an experimental**
3 **double-infection of the definitive host**

4
5 Maillard S^{1,2*}, Benchikh-Elfegoun MC³, Kohil K³, Gottstein B² and Piarroux R^{1,4}

6
7 ¹ UMR6249 CNRS/UFC Chrono-Environnement, Department of Parasitology and Mycology,
8 University of Franche-Comté, Besançon, France

9 ² Institute of Parasitology, University of Bern, Bern, Switzerland

10 ³ Laboratory of Parasitology, University of Mentouri, Constantine, Algeria

11 ⁴ Department of Parasitology and Mycology, Hôpital la Timone, Marseille, France

12
13
14
15
16 *Corresponding Author

17 Maillard Stéphane, Institute of Parasitology, University of Bern, Länggass-Strasse 122, CH-
18 3012 Bern, Switzerland

19 Email: maillard_steph@yahoo.com

20 **ABSTRACT**

21 The classification within the paraphyletic group *Echinococcus granulosus* sensu lato is
22 currently under debate. To assess the reproductive potential between *E. granulosus* sensu
23 stricto G1 (old sheep strain) and *Echinococcus canadensis* G6 (old camel strain), an
24 experimental double infection was carried out in a dog. First, two fertile hydatid cysts were
25 collected: one from an Algerian cattle and one from an Algerian dromedary. The
26 mitochondrial markers *coxI* and *nadI* confirmed they were G1 and G6, respectively.
27 Subsequently, a dog was inoculated with an approximately equal amount of protoscoleces
28 from these two cysts. Sixty days after infection, 85 adult worms were recovered from the
29 intestine of the dog, and each individual parasite was analyzed with the highly discriminating
30 multilocus microsatellite EmsB. For all worms, the scolex and the gravid proglottis,
31 separately analyzed, provided an identical genetic profile: the G1 profile was observed in 70
32 adults, and the G6 profile in the 15 others. No single worm exhibited a hybrid G1/G6 profile.
33 This result suggests the absence of cross-fertilizing between the two taxa under the given
34 experimental conditions, and so, the presence of a strong cross-reproductive barrier. This
35 observation corroborates with the recent reclassification of G1 and G6 within two distinct
36 species.

37

38 **1. INTRODUCTION**

39 The classification within the paraphyletic group *Echinococcus granulosus* sensu lato
40 has undergone and continues to undergo important changes. Among them, the common sheep
41 G1 and camel G6 strains have been reclassified within two distinct species: respectively, *E.*
42 *granulosus* sensu stricto and *E. canadensis*. In previous studies, Bart *et al.* and Maillard *et al.*
43 showed the presence of a G1/G6 sympatric area in Algeria (Bart *et al.*, 2004; Maillard *et al.*,
44 2007). However, in the second study, despite an important panel of cysts collected in various
45 hosts from this particular area (sheep, cattle, dromedaries, human patients), the sequencing of
46 the nuclear *act11* and *hbx2* markers identified no case of cross-fertilization. Therefore, this
47 result corroborated the recent revision of the classification concerning these variants
48 (Lavikainen *et al.*, 2006; Nakao *et al.*, 2007). Nevertheless, the assessment of their real
49 divergence needs to evaluate their reproductive isolation in characterizing their putative
50 offspring in the dog, the definitive host of the parasite. To date, even if multiple infections
51 with different *Echinococcus* variants have been sometimes observed (Xiao *et al.*, 2006, Yang
52 *et al.*, 2006), it stays very rare and consequently, the possibility of studying the occurrence or
53 absence of cross-fertilization, too (Haag *et al.*, 1999). In addition, such a study requires a

54 genetic marker that can both efficiently identify G1 and G6 but also, detect the G1/G6 cross-
55 fertilizing events.

56 Recently, Bart *et al.* developed EmsB, a tandemly repeated multilocus microsatellite
57 (Bart *et al.*, 2006) that has repeatedly proven its usefulness for genotyping of *E. multilocularis*
58 (Knapp *et al.*, 2007; Knapp *et al.*, 2008; Knapp *et al.*, 2009a; Knapp *et al.*, 2009b). It is
59 composed of a large array of approximately 800bp-DNA fragments. Each of them contains a
60 variable combination of (CA) and (GA) repeats. When compared to other markers, EmsB
61 showed a higher level of intraspecific variability and a very higher sensitivity. Despite its
62 relative complexity, this microsatellite also showed strong reproducibility, repeatability,
63 specificity and stability. In addition, because of its localization within the nuclear genome and
64 thus, contrarily to the commonly used mitochondrial markers (*coxI* and *nadI*), cross-
65 fertilization events can be involved in modifying EmsB. In a previous study, from isolates
66 identified as *E. granulosus sensu stricto* (G1 and G3), *E. canadensis* (G6 and G7) or *E.*
67 *ortleppi* (G5), EmsB provided a high degree of genetic discrimination, exhibited variations
68 that correlated with the relatively small scale geographic origins of the samples and
69 furthermore, presented a hybrid genotypic profile suggesting genetic exchanges between *E.*
70 *granulosus sensu stricto* G1 and *E. ortleppi* G5 (Maillard *et al.*, 2009). Therefore, EmsB
71 could be also able both to discriminate *E granulosus sensu stricto* G1 and *E. canadensis* G6
72 and to detect their putative genetic exchanges.

73 In the present work, we performed an experimental infection of a dog with an
74 approximately equal amount of protoscoleces belonging to *E. granulosus sensu stricto* G1 or
75 *E. canadensis* G6. Then, with the microsatellite EmsB, we analyzed each of the 85 adults that
76 we could collect in the intestine of the dog, with a particular interest for their reproduction
77 units (parasite intrauterine eggs).

78

79 **2. MATERIALS AND METHODS**

80 **2.1. Collection and characterization of the cysts**

81 Two hydatid cysts were collected in Algerian slaughterhouses by a veterinary team of
82 the University of Mentouri, Constantine (Algeria): one from a cattle and one from a
83 dromedary. The parasitic material was then sent to the Laboratory of Parasitology of
84 Besançon (France), for genetic analyses. The genomic DNA was extracted from this cysts
85 (protoscoleces and germinal layer) using the High Pure PCR Preparation Kit (Roche
86 Diagnostics, Mennheim, Germany). Then, it was used as a template for the amplification of

87 two mitochondrial markers conventionally used: ‘*cox1*’, a 309-bp portion of the gene coding
88 for cytochrome c oxidase I and ‘*nad1*’, a 279-bp sequence of the gene coding for NADH
89 dehydrogenase I. PCR amplification, sequencing and subsequent ethanol purification was
90 performed as previously described in Maillard *et al.*, 2007. To ensure the genotypes of the
91 two cysts, the *cox1* and *nad1* sequences were compared to genotypes referred in Bowles *et al.*,
92 1992 and Bowles and McManus, 1993. Then, the two cysts were also characterized with the
93 microsatellite EmsB.

94

95 **2.2. EmsB analyses of the cysts**

96 The PCR amplification of the EmsB fragments was carried out in a 10 µl-final volume
97 reaction containing 1 µl genomic DNA, 150 µM of each dNTP (GeneAmp, Applied
98 Biosystems, NJ, USA), 0.5 µM of fluorescent forward primer, 5’-(FAM)-fluorescent-labeled-
99 GTG TGG ATG AGT GTG CCA TC-3’ (Proligo, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA),
100 1µM of non labeled reverse primer, 5’-CCA CCT TCC CTA CTG CAA TC-3’ and 0.5 U of
101 Red Taq DNA polymerase in 1.5µl reaction buffer 10X (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO,
102 USA). The reaction was performed as follows: 30 cycles of denaturation at 94°C for 30s,
103 annealing at 60°C for 30s and extension at 72°C for one minute (min). The presence of
104 amplicons was determined using electrophoresis in 1.5% (w/v) Tris-acetate/EDTA (TAE)
105 agarose gels. Fragment analysis was performed using an automatic sequencer: the ABI Prism
106 3130 (Applied Biosystem, CA, USA). For each sample, we obtained a specific profile
107 composed of several peaks - the time of migration of each fragment was reported in abscissa,
108 and the intensity of their fluorescence in ordinate. These parameters were directly related to
109 the size of each locus and the number of repetitions of the locus in the genome (Bart *et al.*,
110 2006).

111 Once the genotypes G1 and G6 were confirmed, the viability of their protoscoleces
112 was evaluated by 1% aqueous eosin coloration and observation under a microscope. The cyst
113 contents were then used for the experimental infection.

114

115 **2.3. Double infection of a dog**

116 A male, one year old dog, without pedigree, was selected among a group of dogs
117 captured in Constantine during a regulation campaign of stray dog population. To rule out any
118 putative helminthic infection, the animal was isolated and received an anthelmintic treatment:

119 mebendazol (Vermox N.D.), 20mg/kg PV, *per os*, and twice a day during five days. The dog
120 was then checked by conventional coprological analyses prior to be used for experimentation.
121 One week after being treated, it was given simultaneously 50mL suspension of G1
122 protoscoleces and 50mL suspension of G6 protoscoleces, which had been previously collected
123 from the two cysts. For both genotypes, viability of protoscoleces was >80%. Protoscoleces
124 were not counted, but a visual turbidimetric assessment was done to estimate an approximate
125 equal parasite number. During the prepatent incubation period, the dog daily received
126 standard ratios of food, and drinking water *ad libitum*. After sixty days, the dog was
127 euthanized with an intravenous injection of pentobarbital, identically to the other dogs
128 captured during the control campaign. The dog was then necropsied *post mortem* and the
129 proximal section of the small intestine was ligatured and isolated. The tissues were
130 decontaminated at -80°C for a period of one week. Eighty-five adults were collected, one by
131 one, all along the mucous membrane of the intestine, separated individually and conserved at
132 -20°C. Contrarily to worms isolated after medication with anthelmintics or arecolin, this
133 procedure ensures the integrity of the parasites. The isolation, contamination and euthanasia
134 of the dog were performed by the same veterinary team than for the collection of the G1 and
135 G6 cysts. All the animal experimentation was approved according to the ethical guidelines of
136 the University of Mentouri. Similarly to the cysts, the adult worms were then sent (frozen) to
137 the Laboratory of Parasitology of Besançon for further investigation.

138

139 **2.4. EmsB analyses of the adults**

140 Each of the 85 adult worms was dissected under a microscope such as to isolate the
141 scolex and the posterior strobile. The genomic DNA of each part was extracted using the High
142 Pure PCR Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mennheim, Germany). DNAs were then
143 analyzed with the microsatellite EmsB, following the same procedure as for the cysts.
144 Consequently, for all adults, we obtained two profiles (one for the scolex and one for the
145 strobile) that were compared between themselves, and with those of the other adults as well as
146 with those from the cysts. This comparison was done with the software ABI GeneMapper
147 v3.7.

148

149 **3. RESULTS**

150 **3.1. Genetic characterization of the cysts**

151 The genotyping using mitochondrial markers *cox1* and *nad1* exhibited a G1 sequence
152 corresponding to the sheep strain for the cattle cyst and a G6 sequence corresponding to the
153 camel strain for the camel cyst. With the multilocus microsatellite EmsB, the G1 and G6 cysts
154 showed two distinct profiles (Figure 1).

155

156 **3.2. EmsB analyses of the adults**

157 For all of the 85 adults, the gravid strobile (corresponding to the reproductive
158 “offspring” upon the intrauterine eggs) of this dual infection provided the same profile than
159 the scolex matching to the respective strobile. For 70 of them, this profile corresponded to
160 that of the G1 cyst, while for the 15 others, this profile was identical that of the G6 cyst
161 (Figure 1). No EmsB profile presented a mixed G1/G6 pattern. Therefore, no case of cross-
162 fertilization between *E. granulosus* sensu stricto G1 and *E. canadensis* G6 could be detected.

163

164 **4. DISCUSSION**

165 The objective of the present work was to carry out an experimental intestinal double-
166 infection in the definitive host that may allow a putative cross-fertilization between *E.*
167 *granulosus* sensu stricto G1 and *E. canadensis* G6, and to subsequently characterize the “off-
168 spring” in terms of a potential cross-hybridization. For all of the 85 adults isolated and
169 studied, the multilocus microsatellite EmsB exhibited G1 or G6 profiles but no mixed G1/G6
170 profile. The absence of a visible genetic exchange between G1 and G6 adults, while they were
171 concomitantly infecting the intestine of the same definitive host, suggested a strong
172 reproductive isolation and thus, could corroborate the recent reclassification of the G1 and G6
173 strains in two distinct species.

174 Nevertheless, even if this study was designed to provide the best conditions for cross-
175 fertilization events, a double infection does not guarantee sufficient contacts between the
176 adults to ensure the occurrence of such events, even in the case of a weak reproductive
177 barrier. Therefore, further studies could be envisaged, as for example, to infect several dogs
178 with different quantities of protoscoleces and with different ratios between G1/G6.

179 The common sheep G1 strain is widespread, and has been mainly identified in
180 Mediterranean and semi-arid breeding areas, carried by sheep and cattle. By contrast, the

181 camel G6 strain is often found in desert areas, carried by camels. Most human infections are
182 due to the common sheep strain while only a few cases have been attributed to the camel
183 strain (Bardonnet *et al.*, 2002). They have not the same epidemiological profile and the same
184 impact on public health (WHO-IWGE, 2002). Thus, in eradication or control programs, an
185 action targeting G1 could be inappropriate to target G6 and *vice versa*. Thus, their separation
186 in two distinct species is pertinent, at different levels. The improvement of our knowledge of
187 the genetic diversity of the parasite *Echinococcus granulosus*, the taxonomic links and the
188 differences of epidemiological pattern between the variants has important implications for the
189 design, development and targeting of vaccines, diagnostic reagents and drugs effective against
190 this parasite (McManus, 2002).

191

192 **REFERENCE**

- 193 Bardonnet, K., Piarroux, R., Dia, L., Schneegans, F., Beurdeley, A., Godot, V. and Vuitton,
194 D. A., 2002. Combined eco-epidemiological and molecular biology approaches to
195 assess *Echinococcus granulosus* transmission to humans in Mauritania: occurrence of
196 the 'camel' strain and human cystic echinococcosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*
197 96(4), 383-6.
- 198 Bart, J. M., Bardonnet, K., Elfegoun, M. C., Dumon, H., Dia, L., Vuitton, D. A. and Piarroux,
199 R., 2004. *Echinococcus granulosus* strain typing in North Africa: comparison of eight
200 nuclear and mitochondrial DNA fragments. *Parasitology.* 128(Pt 2), 229-34.
- 201 Bart, J. M., Knapp, J., Gottstein, B., El-Garch, F., Giraudoux, P., Glowatzki, M. L., Berthoud,
202 H., Maillard, S. and Piarroux, R., 2006. EmsB, a tandem repeated multi-loci
203 microsatellite, new tool to investigate the genetic diversity of *Echinococcus*
204 *multilocularis*. *Infect Genet Evol.* 6(5), 390-400.
- 205 Bowles, J., Blair, D. and McManus, D. P., 1992. Genetic variants within the genus
206 *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol.*
207 54(2), 165-73.
- 208 Bowles, J. and McManus, D. P., 1993. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for
209 species and strains of the genus *Echinococcus*. *Int J Parasitol.* 23(7), 969-72.
- 210 Haag, K. L., Araujo, A. M., Gottstein, B., Siles-Lucas, M., Thompson, R. C. and Zaha, A.,
211 1999. Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (Cestoda; Taeniidae): selfing or
212 outcrossing? *Parasitology.* 118 (Pt 1)(63-71.

213 Knapp, J., Bart, J. M., Giraudoux, P., Glowatzki, M. L., Breyer, I., Raoul, F., Deplazes, P.,
214 Duscher, G., Martinek, K., Dubinsky, P., Guislain, M. H., Cliquet, F., Romig, T.,
215 Malczewski, A., Gottstein, B. and Piarroux, R., 2009a. Genetic Diversity of the
216 Cestode *Echinococcus multilocularis* in Red Foxes at a Continental Scale in Europe.
217 PLoS Negl Trop Dis. 3(6), e452.

218 Knapp, J., Bart, J. M., Glowatzki, M. L., Ito, A., Gerard, S., Maillard, S., Piarroux, R. and
219 Gottstein, B., 2007. Assessment of use of microsatellite polymorphism analysis for
220 improving spatial distribution tracking of *echinococcus multilocularis*. J Clin
221 Microbiol. 45(9), 2943-50.

222 Knapp, J., Bart, J. M., Maillard, S., Gottstein, B. and Piarroux, R., 2009b. The genomic
223 *Echinococcus* microsatellite EmsB sequences: from a molecular marker to the
224 epidemiological tool. Parasitology. 1-11.

225 Knapp, J., Guislain, M. H., Bart, J. M., Raoul, F., Gottstein, B., Giraudoux, P. and Piarroux,
226 R., 2008. Genetic diversity of *Echinococcus multilocularis* on a local scale. Infect
227 Genet Evol. 8(3), 367-73.

228 Lavikainen, A., Lehtinen, M. J., Laaksonen, S., Agren, E., Oksanen, A. and Meri, S., 2006.
229 Molecular characterization of *Echinococcus* isolates of cervid origin from Finland and
230 Sweden. Parasitology. 133(Pt 5), 565-70.

231 Maillard, S., Benchikh-Elfegoun, M. C., Knapp, J., Bart, J. M., Koskei, P., Gottstein, B. and
232 Piarroux, R., 2007. Taxonomic position and geographical distribution of the common
233 sheep G1 and camel G6 strains of *Echinococcus granulosus* in three African countries.
234 Parasitol Res. 100(3), 495-503.

235 Maillard, S., Gottstein, B., Haag, K. L., Ma, S., Colovic, I., Benchikh-Elfegoun, M. C.,
236 Knapp, J. and Piarroux, R., 2009. The EmsB tandemly repeated multilocus
237 microsatellite: a new tool to investigate genetic diversity of *Echinococcus granulosus*
238 *sensu lato*. J Clin Microbiol. 47(11), 3608-16.

239 McManus, D. P., 2002. The molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* and cystic
240 hydatid disease. Trans R Soc Trop Med Hyg. 96 Suppl 1(S151-7).

241 Nakao, M., McManus, D. P., Schantz, P. M., Craig, P. S. and Ito, A., 2007. A molecular
242 phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes.
243 Parasitology. 134(Pt 5), 713-22.

244 WHO-IWGE (Eckert J., Gemmel M.A., Meslin F.-X., Pawlowski, Z.S.), 2002. WHO/OIE
245 manual on echinococcosis in humans and animals : a public health problem of global
246 concern. WHO Organisation for Animal Health, Paris, France, 265 pp.

247 Xiao, N., Nakao, M., Qiu, J., Budke, C. M., Giraudoux, P., Craig, P. S. and Ito, A., 2006.
248 Dual infection of animal hosts with different Echinococcus species in the eastern
249 Qinghai-Tibet plateau region of China. *Am J Trop Med Hyg.* 75(2), 292-4.
250 Yang, Y. R., Liu, X. Z., Vuitton, D. A., Bartholomot, B., Wang, Y. H., Ito, A., Craig, P. S.
251 and McManus, D. P., 2006. Simultaneous alveolar and cystic echinococcosis of the
252 liver. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 100(6), 597-600.

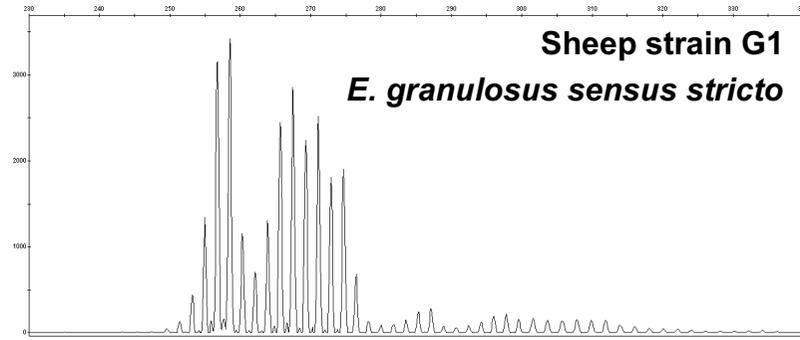
253

254 **LEGENDS OF THE FIGURES**

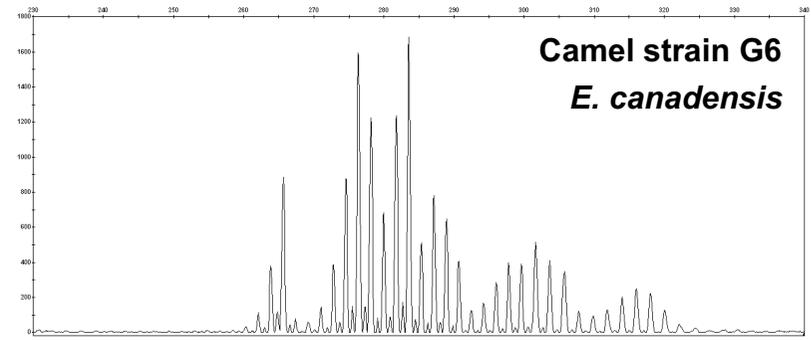
255 **Figure 1.**

256 Complex profiles obtained with the tandemly repeated multilocus microsatellite EmsB. The
257 two first profiles were provided from two hydatid cysts, collected from an Algerian cattle and
258 an Algerian dromedary and subsequently used for the experimental dual infection of a dog
259 (A). According the mitochondrial *coxI* and *nadI* sequences, these cysts were respectively of
260 the sheep strain G1 (*E. granulosus sensu stricto*) and of the camel strain G6 (*E. canadensis*).
261 The four other profiles were provided by two of the 85 adults collected from the intestine of
262 the infected dog (B). For each of them, the scolex and the reproduction units were separated
263 and analyzed individually.

A

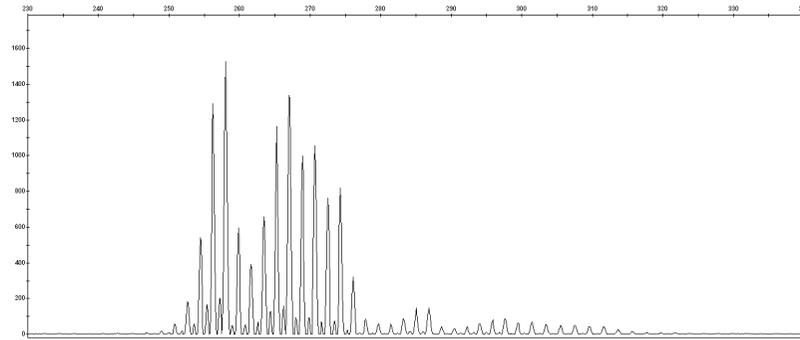


Cyst - Algerian cattle

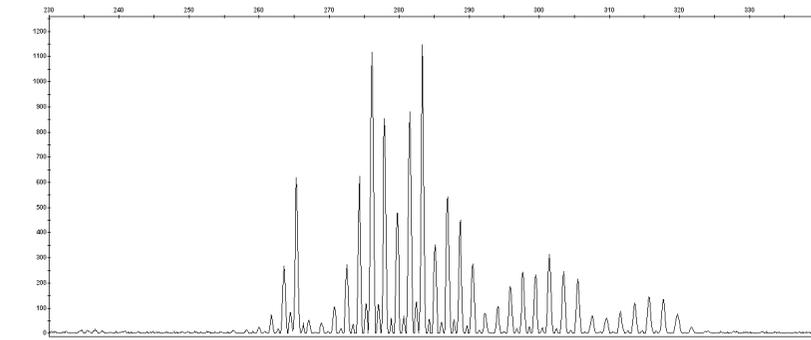


Cyst - Algerian dromedary

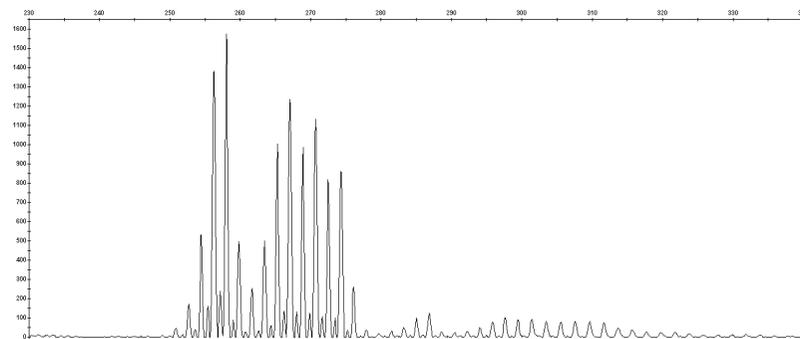
B



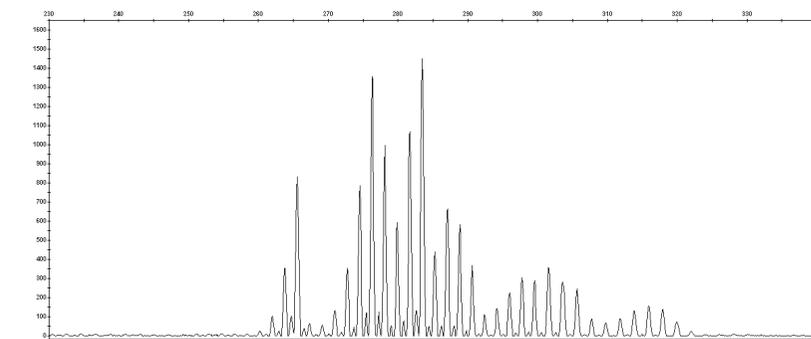
Adult 5.1 - Scolex



Adult 10.7 - Scolex



Adult 5.1 - Reproduction units



Adult 10.7 - Reproduction units

4. DISCUSSION

Dans ce travail, l'objectif était de provoquer expérimentalement la rencontre des souches ovine G1 et cameline G6 dans l'intestin du même hôte définitif et de caractériser la descendance produite.

Parmi les 85 adultes analysés, aucun n'a montré de profil mixte G1/G6 avec le microsatellite EmsB. Ce résultat pourrait signifier l'absence d'échange génétique entre ces deux variants et ainsi suggérer la présence d'une barrière reproductive fortement installée. Il corroborerait donc la dernière révision de la taxonomie du parasite *E. granulosus* sensu lato à savoir la reconnaissance des espèces *E. granulosus* sensu stricto G1 et *E. canadensis* G6.

Toutefois, même si cette étude a été élaborée pour favoriser les événements de reproduction croisée, une double contamination ne garantit pas suffisamment de contacts entre les adultes pour assurer leur survenue dans le cas d'une barrière reproductive faiblement installée. La caractérisation d'œufs individualisés prélevés sur plusieurs vers adultes constitue la prochaine étape de cette étude, afin de la porter à une nouvelle échelle, potentiellement plus informative. Par ailleurs, le typage de mélanges d'ADN G1 et G6 avec différents ratios de concentration permettrait d'obtenir une meilleure indication des capacités du microsatellite EmsB en ce qui concerne la détection des hybrides de ces variants.

Bien que cosmopolite, la souche G1 est principalement identifiée dans des régions d'élevage méditerranéennes et semi-arides, chez des ovins et des bovins. Au contraire, la souche G6 est principalement identifiée dans des régions d'élevage désertiques, chez des camélidés. La plupart des cas humains incriminent la souche G1 tandis que seuls quelques cas sont attribués à la souche G6. Ces deux variants n'ont donc pas le même profil épidémiologique et le même impact en termes de santé publique. Par conséquent, les programmes de lutte adaptés pour G1 peuvent ne pas l'être pour G6, et *vice versa*. La séparation de ces deux variants en deux espèces distinctes est donc pertinente à de multiples niveaux.

Le microsatellite EmsB présente encore dans cette étude un potentiel très intéressant pour l'étude de l'épidémiologie moléculaire et de la taxonomie du parasite *E. granulosus* sensu lato.

DISCUSSION

1. SYNTHÈSE

L'échinococcose kystique est une importante zoonose helminthique qui demeure encore à l'heure actuelle, un véritable problème sanitaire et économique pour de nombreuses régions pastorales dans le monde. Dans certains foyers d'infection, les campagnes de lutte ont toutefois réussi à faire reculer cette maladie et même parfois, à l'éradiquer [18]. Lutter contre l'échinococcose kystique requiert de connaître au mieux les variants du groupe *E. granulosus* sensu lato, leur statut, leurs hôtes, leurs modes de circulation et de transmission à l'homme. Dans ce travail de recherche, le principal objectif était de proposer une approche permettant à la fois l'étude de l'épidémiologie moléculaire et de la taxonomie de ce cestode. Dans ce but, nous avons donc évalué diverses séquences d'ADN polymorphes, allant des marqueurs les plus couramment utilisés aux microsatellites (**Tableau 6**).

Dans un premier temps, nous avons évalué les marqueurs mitochondriaux *cox1*, *nad1*, *atp6* et les marqueurs nucléaires *act11* et *hbx2*, en étudiant deux foyers hautement endémiques : le nord de l'Afrique et la province chinoise du Qinghai. Dans l'étude du foyer nord-africain, nous avons analysé le polymorphisme d'échantillons originaires de trois pays, incluant une région sympatrique pour G1 et G6. Malgré cette coexistence, qui va jusqu'à la superposition des spectres d'hôte, ces deux souches sont apparues comme deux entités distinctes et aucun profil mixte n'a été obtenu avec les marqueurs nucléaires. Dans l'étude du foyer chinois, les marqueurs mitochondriaux ont identifié 13 géotypes variants de G1. Six d'entre eux avaient déjà été rapportés en Chine et dans d'autres foyers à travers le monde. Les sept autres n'avaient jamais été décrits auparavant. La population parasitaire chinoise étudiée n'a finalement montré aucune particularité qui la différenciait significativement de celles d'autres foyers.

En raison des limites observées chez ces marqueurs conventionnels, il était donc nécessaire de développer une nouvelle approche. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux microsatellites simple-locus EmsJ, EmsK, Egmsca1 et NAK1. Leur polymorphisme a été analysé sur un panel d'échantillons nord-africains. Egmsca1 s'est montré le plus variable mais le polymorphisme mis en évidence restait insuffisant pour mener à bien des études épidémiologiques fines. Nous avons ensuite étudié le microsatellite multilocus EmsB, grâce à des échantillons provenant d'hôtes variés et originaires de six pays

répartis sur plusieurs continents. Les marqueurs mitochondriaux ont identifié les génotypes G1, G3, G5, G6 et G7, regroupés en trois groupes robustes : *E. granulosus* sensu stricto, *E. ortleppi* et *E. canadensis*. EmsB a montré un grand pouvoir discriminant et a identifié à la fois des génotypes dont la distribution géographique paraît se restreindre à un foyer et des génotypes présentant une diffusion plus cosmopolite. De plus, un des échantillons brésiliens a présenté un profil mixte G1/G5, suggérant la survenue d'échanges génétiques entre *E. granulosus* sensu stricto et *E. ortleppi*. Cela remet donc apparemment en cause l'existence d'une barrière de reproduction fortement installée entre ces variants. Comparé aux marqueurs qui ont déjà permis de mettre en évidence des profils hybrides dans la littérature, le microsatellite EmsB apporte davantage de robustesse à l'observation de profils hybrides (nombre de pics et polymorphisme importants). Toutefois, ce microsatellite a également montré quelques limites.

La comparaison des profils EmsB fait appel à la numérisation des données et à leur agrégation en fonction de leur niveau de ressemblance. Les profils obtenus avec EmsB sont donc *a priori* analysés comme des caractères phénétiques bien que le polymorphisme de taille soit basé sur une structure génétique particulière [77]. Par conséquent, le risque d'homoplasie est bien présent : un même pic peut en effet être obtenu à partir de différentes séquences nucléotidiques. Néanmoins, Estoup *et al.* ont démontré mathématiquement que l'homoplasie ne représentait pas un problème significatif dans la plupart des études de génétique des populations puisque plus les microsatellites présentaient une forte variabilité, plus celle-ci compensait la faible perte d'information liée à ce phénomène [83]. Etant très polymorphe et très informatif, EmsB peut donc être utile et fiable pour répondre à des problématiques à la fois taxonomiques et épidémiologiques. Cependant, du fait de données insuffisantes actuellement sur son mode de transmission d'une génération à une autre et sur son évolution, nous avons limité son utilisation à des problématiques épidémiologiques.

Etant donné sa capacité à différencier *E. granulosus* sensu stricto G1 et *E. canadensis* G6, le microsatellite EmsB a été utilisé dans une dernière étude visant à apprécier l'isolement reproductif entre ces variants. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus suggèrent l'absence d'échange génétique et donc, la présence d'une barrière reproductrice fortement installée.

Au cours de cette thèse, le microsatellite multilocus EmsB est donc apparu comme étant l'un des outils les plus informatifs disponibles à ce jour pour étudier le groupe *E. granulosus* sensu lato, à l'image de ce qui avait été décrits pour d'autres espèces échinocoques [77, 78, 80, 81].

2. ETUDE DE LA TAXONOMIE D'*E. GRANULOSUS* SENSU LATO

L'enrichissement de nos connaissances des liens taxonomiques entre les variants du parasite *E. granulosus* sensu lato et de leur évolution n'est pas seulement un exercice visant à les classer et à les hiérarchiser [86]. Etablir une nomenclature pertinente, basée notamment sur des critères génétiques et épidémiologiques est essentiel pour décrire au mieux la biodiversité du parasite et affiner le ciblage des actions de lutte contre l'échinococcose kystique.

Dans le cas de ce parasite, la notion de souche a longtemps été utilisée afin de donner un statut aux variants identifiés. Néanmoins, même si cette délimitation revêt un intérêt pratique, elle reste taxonomiquement invalide et doit être formalisée pour s'inscrire avec justesse dans une classification plus globale [120]. Nos résultats suggèrent que selon les cas, les souches définies antérieurement pouvaient représenter soit un simple taxon, soit un véritable clade (une espèce par exemple) [9, 37, 44, 63, 66, 67, 121, 122]. Le groupe *E. granulosus* sensu lato serait paraphylétique, c'est à dire composé de plusieurs espèces se ressemblant (espèces cryptiques) mais ne présentant pas toutes la même évolution.

Dans l'étude du foyer nord-africain, les marqueurs mitochondriaux et nucléaires ont identifié deux entités bien distinctes, *E. granulosus* sensu stricto G1 et *E. canadensis* G6. La congruence des résultats obtenus quelle que soit la méthode est très bonne : aucun génotype n'est passé d'un groupe à l'autre et aucun hétérozygote n'a pu être mis en évidence. Pourtant, les conditions étaient favorables pour faciliter la mise en évidence de stigmates de reproduction croisée : ces souches circulent en sympatrie dans la région subsaharienne de l'Algérie, elles y partagent le même hôte définitif à savoir le chien et certains hôtes intermédiaires. Il n'y a donc ni barrière géographique ni barrière d'hôte dans cette région. Malgré cela, aucun hybride n'a été détecté. L'expérience de double infection G1/G6 chez un chien, rendu possible par l'utilisation du microsatellite EmsB, avait pour but de favoriser la survenue d'échanges génétiques entre les deux souches mais là encore, aucune hybridation

n'a été détectée. Bien qu'elles partagent un certain nombre de caractères lorsqu'elles circulent en sympatrie, les souches G1 et G6 arborent en général un profil épidémiologique très différent. Cette forte différenciation suggère une évolution divergente entraînant progressivement une spéciation. Etant donné que ces souches circulent actuellement de manière sympatrique dans certains foyers comme le foyer Algérien, nous pouvons postuler qu'il s'agit soit d'une spéciation sympatrique ayant eu lieu progressivement dans les foyers concernés, soit d'une spéciation allopatrique ayant eu lieu avant l'établissement de cette circulation sympatrique. Les résultats préliminaires obtenus dans cette étude semblent indiquer que cette spéciation est complète, jusqu'à l'isolement reproductif. Le rang d'espèce paraît donc approprié dans le cas de ces deux souches. Toutefois, cette hypothèse pourrait être confortée par l'étude d'un grand échantillon de vers adultes et la caractérisation des œufs qu'ils portent.

Une divergence similaire peut être observée entre la souche ovine G1 et la souche bovine G5. Ces variants sont considérées depuis plusieurs années comme des espèces à part entières, *E. granulosus* et *E. ortleppi*. Néanmoins, le microsatellite EmsB a mis en évidence la survenue d'échanges génétiques entre elles. Ce résultat corrobore une étude récente qui émettait l'hypothèse d'un isolement reproductif partiel entre ces souches [63]. Ces deux groupes seraient donc encore en cours de spéciation.

Au contraire, la discrimination de la souche du buffle G3 à partir de la souche ovine G1 est beaucoup moins marquée quel que soit l'outil moléculaire utilisé. Cette observation peut remettre en question le statut génétique de la souche G3. En effet, cela reviendrait à dire que la souche G3 ne serait finalement qu'un microvariant de la souche G1, ce qui pourrait constituer un exemple de surdiscrimination. Les critères qui permettent cette différenciation sont peu nombreux en comparaison de ceux qui permettent de montrer les souches G1 et G6 comme des entités cladistiques distinctes.

De la même manière, la distinction des souches cameline G6 et porcine G7 pourrait être sujette à controverse. En effet, malgré son grand pouvoir discriminant, même le microsatellite EmsB, n'a pu permettre une séparation forte sur le plan génétique. Avec les marqueurs mitochondriaux et nucléaires, même avec le microsatellite EmsB, les souches cameline G6 et porcine G7 apparaissent très proches, si bien qu'elles pourraient être en fait incluses dans la même espèce. Les seules différences se situent donc au niveau des

distributions géographiques et des spectres d'hôte intermédiaire. La pertinence d'une telle discrimination peut donc être remise en question. Ces différences peuvent en effet être dues à d'autres facteurs que le parasite lui-même. Les dromadaires vivent le plus souvent dans des régions où l'élevage du porc n'est pas une pratique courante (pour des raisons culturelles et religieuses) et inversement.

La notion de souche a été utilisée au sein d'*E. granulosus* sensu lato pour désigner d'un côté des entités cladistiques montrant entre elles un niveau de divergence similaire à celle d'espèces distinctes et de l'autre, de simples microvariants. Ces derniers sont très proches génétiquement et ne sont distingués que par des particularités médicales et épidémiologiques dont la pertinence reste à déterminer. Il est vraisemblable qu'en absence de données supplémentaires, la reconnaissance de souches au sein des espèces nouvellement définies devrait encore un peu perdurer. Les génomes mitochondriaux complets de nombreux variants du genre *Echinococcus* ont récemment été déterminés dans leur totalité et ont permis de retracer une phylogénie qui corrobore la récente révision du groupe *E. granulosus* sensu lato [11].

3. ETUDE DE L'EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE D'*E. GRANULOSUS* SENSU LATO

L'analyse génétique est aujourd'hui l'une des approches les plus fiables et performantes pour apprécier le polymorphisme d'un organisme. Toutefois, les séquences polymorphes communément utilisées pour l'étude d'*E. granulosus* sensu lato montrent plusieurs limites, notamment en ce qui concerne le suivi des populations de parasite dans le temps et l'espace.

Même si les marqueurs mitochondriaux permettent l'identification des souches et l'étude de leurs relations phylogénétiques, leur variabilité n'est pas suffisante pour relier les échantillons étudiés à leur foyer d'origine. A l'échelle du continent, les séquences mitochondriales montrent parfois des variations corrélées avec l'origine géographique des échantillons. Par exemple, les échantillons G6 du nord de l'Algérie diffèrent légèrement des échantillons G7 collectés en Europe. De la même manière, quelques échantillons chinois ont également montré des mutations spécifiques, sans toutefois se démarquer significativement des populations parasitaires d'autres foyers. Néanmoins, ces marqueurs manquent de pouvoir

discriminant pour mettre en évidence une variabilité intraspécifique intéressante sur le plan épidémiologique. Les marqueurs nucléaires classiques peuvent détecter les échanges génétiques et ainsi être utile dans l'étude taxonomique du parasite. Cependant, leur variabilité est encore plus faible, ce qui limite leurs apports dans l'étude de l'épidémiologie moléculaire du parasite. Seule exception à ce jour, le microsatellite multilocus EmsB offre un pouvoir de discrimination important. La reproductibilité, la répétabilité, la stabilité et la sensibilité et donc la fiabilité de cet outil avaient déjà été illustrées lors de précédents travaux portant sur *E. multilocularis* [77-81]. Tout comme pour ce parasite, le microsatellite EmsB a montré un potentiel intéressant pour l'étude d'*E. granulosus* sensu lato

EmsB a permis de mettre en évidence deux types de circulation, une circulation limitée à l'échelle d'un foyer et une circulation à l'échelle mondiale. La circulation intracontinentale des génotypes peut être le résultat de déplacements locaux de troupeaux d'élevages, accompagnés des chiens qui les gardent (transhumances) mais aussi d'échanges commerciaux intracontinentaux. La circulation intercontinentale peut être le résultat d'échanges commerciaux étendus. Le rôle de l'homme dans le brassage des populations de parasite et leur dissémination apparaît donc capital. Cette caractéristique distingue fortement ce groupe des autres espèces échinocoques dont les cycles font essentiellement intervenir des hôtes définitifs et intermédiaires sauvages.

Le séquençage complet du génome mitochondrial de nombreux variants du genre *Echinococcus* a permis d'établir une phylogénie détaillée mais aussi, de formuler des hypothèses concernant l'évolution et la diffusion historique des échinocoques [37]. Dans cette phylogénie, les positions basales des espèces *E. oligarthrus* et *E. vogeli* indiquent qu'elles sont sans doute parmi les espèces les plus anciennes du genre *Echinococcus*. Plusieurs de leurs HD descendraient de populations de félidés et de canidés d'Amérique du Nord, qui auraient migré vers le sud durant le Pliocène. Par conséquent, il est probable que l'espèce ancestrale du genre *Echinococcus* ait suivi cette migration et provienne également d'Amérique du Nord. Etant donné que l'hôte ancestral est encore inconnu, il pouvait s'agir aussi bien d'un canidé que d'un félidé. Par conséquent, le berceau des échinocoques pourrait être le même que celui des canidés, situé en Amérique du Nord et datant du Miocène ou que celui des félidés, situé en Asie de l'Est et datant également du Miocène. Quelque soit le lieu de ce berceau, les populations de canidés et de félidés ont probablement migré d'un continent

à l'autre par le détroit de Béring durant le Miocène, emportant avec eux le parasite. Par la suite, les échinocoques pourraient avoir diffusé dans le monde entier à partir de ces deux foyers. A partir de l'Amérique du Nord, le parasite a donc probablement commencé à migrer vers le sud pour devenir les espèces *E. oligarthrus* et *E. vogeli* tandis qu'à partir de l'Asie de l'Est, les premières espèces à se différencier étaient probablement *E. shiquicus* et *E. multilocularis*. Concernant *E. granulosus* sensu stricto, *E. equinus*, *E. ortleppi* et *E. canadensis*, il est très difficile de connaître leur évolution spatiotemporelle car ces espèces impliquent des hôtes domestiques généralement soumis à des pratiques d'élevage et de commerce qui perturbent fortement leur distribution naturelle. A ce niveau, seul un marqueur moléculaire suffisamment polymorphe pour établir une carte détaillée des génotypes pourrait permettre de suivre cette évolution.

EmsB a donné des résultats très intéressants au cours de cette étude. En effet, il a permis d'identifier des profils spécifiques aux échantillons collectés dans la province chinoise du Qinghai. Ceci pourrait indiquer un isolement des cheptels hôte et donc, l'absence de flux migratoires et commerciaux entre le foyer chinois et les autres foyers étudiés. Les pratiques d'élevage et de commerce étant souvent ancestrales dans les régions pastorales, elles pourraient avoir préservé cette population parasitaire de toute contamination génétique extérieure, après l'installation du parasite dans cette région.

La souche G6 est présente chez des dromadaires des zones désertiques de la République Populaire de Chine, du Moyen-Orient et de l'Afrique. La souche G7 est présente en Europe et en Russie. Ces deux variants circulent en sympatrie en Amérique du Sud [5]. Les publications les plus récentes tendent à regrouper ces souches dans la même espèce, *E. canadensis* [37, 51, 66]. Les marqueurs mitochondriaux et le microsatellite EmsB indique toutefois quelques différences génétiques même si elles ne sont pas suffisantes pour les séparer de manière robuste. *E. canadensis* regrouperait également les souches des cervidés G8 et G10. Ces souches sauvages arctiques et subarctiques pourraient avoir donné naissance aux variants G6 et G7 en se domestiquant. L'utilisation du microsatellite EmsB sur des échantillons G6 à G10 collectés dans différents foyers de l'Europe, du Moyen-Orient, de la Russie, de la Chine et de l'Amérique du Sud permettrait de contribuer à la détermination de l'histoire de la diffusion de ces souches.

Au cours de cette étude, le microsatellite EmsB a donc montré un potentiel intéressant pour l'étude de l'épidémiologie moléculaire du parasite *E. granulosus* sensu lato car il a permis d'identifier des populations particulières présentant soit une distribution géographique restreinte, soit une distribution mondiale, sans doute conditionnée par l'ampleur des échanges commerciaux et des migrations qui touchent les cheptels.

4. CONCLUSION

Toutes les séquences polymorphes évaluées dans ce travail de recherche ont présentés des apports certains à l'étude de l'épidémiologie moléculaire et de la taxonomie d'*E. granulosus* sensu lato mais également quelques limites (**Tableau 6**). L'approche optimale qui a été retenue combine l'utilisation du microsatellite EmsB avec les marqueurs mitochondriaux conventionnels, car elle seule permet à l'heure actuelle l'étude de ce parasite à différents niveaux taxonomiques (spécifiques et subsécifiques) et à différentes échelles géographiques (intra et intercontinental). Aujourd'hui, l'emploi de cette approche sur un grand nombre d'échantillons collectés à partir de divers hôtes, dans divers foyers répartis dans le monde entier permettrait d'enrichir nos connaissances sur le parasite *E. granulosus* sensu lato et ses différents variants et de définir ainsi, des campagnes adaptées pour lutter efficacement contre l'Echinococcose kystique.

| Séquence | | Polymorphisme | | Apports en taxonomie et phylogénie | Apports en épidémiologie moléculaire | |
|---------------------------------|--------------|---------------|---|---|--|---|
| | | Niveau | Différenciation | | | |
| Mitochondrial | <i>cox1</i> | +++ | Toutes les souches étudiées | + Polymorphisme important + Transmission verticale + Nombreuses copies par cellule (sensibilité +) - Ne peuvent pas mettre en évidence de recombinaisons | + Quelques mutations G1 spécifiques du foyer chinois - Pas présentes chez tous les individus de ce foyer | |
| | <i>nad1</i> | ++ | | | | |
| | <i>atp6</i> | ++ | | | | |
| Nucléaire Non microsatellite | <i>act11</i> | + | <i>E. granulosus</i> sensu stricto (aucune distinction entre G1 et G3) <i>E. canadensis</i> G6 | + Pourrait mettre en évidence des recombinaisons G1/G6 - Peu polymorphes - Peu de copies (sensibilité -) | - Peu polymorphes | |
| | <i>hbx2</i> | + | | | | |
| Nucléaire Microsatellite | Simple-locus | <i>EgSga1</i> | + | <i>E. granulosus</i> sensu stricto G1 <i>E. canadensis</i> G6 | + Multiples profils G1 + A mis en évidence des recombinaisons entre G1 et pourrait mettre en évidence des recombinaisons G1/G6 + Pourrait mettre en évidence des recombinaisons génétiques G1/G6 - Amplification difficile + Pourrait mettre en évidence des recombinaisons génétiques G1/G6 + Différenciation G1/G6 - Profils complexes pour G1 | - Peu polymorphes |
| | | <i>NAK1</i> | + | | | |
| | | <i>EmsK</i> | + | | | |
| | | <i>EmsJ</i> | - | | | |
| | Multilocus | <i>EmsB</i> | +++++ | <i>E. granulosus</i> sensu stricto (aucune distinction entre G1 et G3) <i>E. ortleppi</i> G5 <i>E. canadensis</i> G6 et G7 (distinction faible entre les 2) | + Polymorphisme très important + Très nombreuses copies par cellule (sensibilité ++), bonne répétabilité + A montré un profil hybride G1/G5 + Pourrait mettre en évidence des recombinaisons G1/G6 - Superposition de profils G1 et G6 (n'empêche pas leur différenciation mais diminue sa robustesse) - Risque d'homoplasie mais modérée - Mécanismes de formation, de modification et de transmission d'EmsB inconnus pour l'instant | + Polymorphisme très important + Isole les échantillons G1 chinois, G6 africains et G7 européens (circulation locale) + Identifie des profils G1 identiques dans plusieurs foyers du monde (circulation à grande échelle) - Risque d'homoplasie mais modérée |

Tableau 6. Synthèse des résultats obtenus avec les 10 séquences d'ADN polymorphes testées au cours de cette thèse.
(+ : apports, - : limites)

ANNEXES

1. REFERENCES

1. Kumaratilake, L.M. and R.C. Thompson, *A review of the taxonomy and speciation of the genus Echinococcus Rudolphi 1801*. Z Parasitenkd, 1982. **68**(2): p. 121-46.
2. Xiao, N., J. Qiu, M. Nakao, T. Li, W. Yang, X. Chen, P.M. Schantz, P.S. Craig, and A. Ito, *Echinococcus shiquicus n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China*. Int J Parasitol, 2005. **35**(6): p. 693-701.
3. Torgerson, P., *Methods for global burden assessment echinococcosis.*, in *22nd International Congress of hydatidology, Athens 2007*: Athens.
4. Moro, P. and P.M. Schantz, *Echinococcosis: a review*. Int J Infect Dis, 2008.
5. WHO-IWGE, *WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals : a public health problem of global concern*. Eckert J., Gemmel M.A., Meslin F.-X., Pawlowski, Z.S. ed. 2002, Paris, France: WHO Organisation for Animal Health. 265.
6. Combes, C., *The Art of Being a Parasite*. 2005, Chicago, USA: The University of Chicago Press. 291pp.
7. Bart, J.M., K. Bardonnnet, M.C. Elfegoun, H. Dumon, L. Dia, D.A. Vuitton, and R. Piarroux, *Echinococcus granulosus strain typing in North Africa: comparison of eight nuclear and mitochondrial DNA fragments*. Parasitology, 2004. **128**(Pt 2): p. 229-34.
8. Bart, J.M., S. Morariu, J. Knapp, M.S. Ilie, M. Pitulescu, A. Anghel, I. Cosoroaba, and R. Piarroux, *Genetic typing of Echinococcus granulosus in Romania*. Parasitol Res, 2006. **98**(2): p. 130-7.
9. Maillard, S., M.C. Benchikh-Elfegoun, J. Knapp, J.M. Bart, P. Koskei, B. Gottstein, and R. Piarroux, *Taxonomic position and geographical distribution of the common sheep G1 and camel G6 strains of Echinococcus granulosus in three African countries*. Parasitol Res, 2007. **100**(3): p. 495-503.
10. Rausch, R.L., *Cystic echinococcosis in the Arctic and Sub-Arctic*. Parasitology, 2003. **127 Suppl**: p. S73-85.
11. Eckert, J. and P. Deplazes, *Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern*. Clin Microbiol Rev, 2004. **17**(1): p. 107-35.
12. Centers for Disease Control and prevention. *Cycle parasitaire d'Echinococcus granulosus*. Dernière consultation: Mai 2009. Adresse: www.dpd.cdc.gov.
13. Rausch, R.L., *Life-cycle patterns and geographic distribution of Echinococcus species*, in *Echinococcus and hydatid disease*, R.C. Thompson and A.J. Lymbery, Editors. 1995, CAB International: Wallingford. p. 89-134.
14. Eckert, J. and P. Deplazes, *Alveolar echinococcosis in humans: the current situation in Central Europe and the need for countermeasures*. Parasitol Today, 1999. **15**(8): p. 315-9.
15. Wang, Z., X. Wang, and X. Liu, *Echinococcosis in China, a review of the epidemiology of Echinococcus spp*. Ecohealth, 2008. **5**(2): p. 115-26.
16. Reuter, S., *Cycle parasitaire d'E. multilocularis*.
17. Xiao, N., J. Qiu, M. Nakao, T. Li, W. Yang, X. Chen, P.M. Schantz, P.S. Craig, and A. Ito, *Echinococcus shiquicus, a new species from the Qinghai-Tibet plateau region of China: discovery and epidemiological implications*. Parasitol Int, 2006. **55 Suppl**: p. S233-6.

18. Craig, P.S., D.P. McManus, M.W. Lightowers, J.A. Chabalgoity, H.H. Garcia, C.M. Gavidia, R.H. Gilman, A.E. Gonzalez, M. Lorca, C. Naquira, A. Nieto, and P.M. Schantz, *Prevention and control of cystic echinococcosis*. *Lancet Infect Dis*, 2007. **7**(6): p. 385-94.
19. McManus, D.P., W. Zhang, J. Li, and P.B. Bartley, *Echinococcosis*. *Lancet*, 2003. **362**(9392): p. 1295-304.
20. Torgerson, P.R., *Economic effects of echinococcosis*. *Acta Trop*, 2003. **85**(2): p. 113-8.
21. Umur, S., *Prevalence and economic importance of cystic echinococcosis in slaughtered ruminants in Burdur, Turkey*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2003. **50**(5): p. 247-52.
22. Majorowski, M., H. Carabin, M. Kilani, and A. Bensalah, *Echinococcosis in Tunisia: a cost analysis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2005. **99**(4): p. 268-78.
23. Budke, C.M., Q. Jiamin, W. Qian, and P.R. Torgerson, *Economic effects of echinococcosis in a disease-endemic region of the Tibetan Plateau*. *Am J Trop Med Hyg*, 2005. **73**(1): p. 2-10.
24. Craig, P., *Echinococcus multilocularis*. *Curr Opin Infect Dis*, 2003. **16**(5): p. 437-44.
25. Deplazes, P., D. Hegglin, S. Gloor, and T. Romig, *Wilderness in the city: the urbanization of Echinococcus multilocularis*. *Trends Parasitol*, 2004. **20**(2): p. 77-84.
26. Kern, P., K. Bardonnnet, E. Renner, H. Auer, Z. Pawlowski, R.W. Ammann, D.A. Vuitton, and P. Kern, *European echinococcosis registry: human alveolar echinococcosis, Europe, 1982-2000*. *Emerg Infect Dis*, 2003. **9**(3): p. 343-9.
27. Piarroux, M., S. Bresson-Hadni, I. Capek, J. Knapp, J. Watelet, J. Dumortier, A. Abergel, A. Minello, A. Gérard, J. Beytout, R. Piarroux, B. Kantelip, E. Delabrousse, V. Vaillant, D.A. Vuitton, and p.l.r. FrancEchino, *Surveillance de l'échinococcose alvéolaire en France : bilan de cinq années d'enregistrement 2001-2005*. *BEH*, 2006. **n°27-28**: p. 206-208.
28. Tappe, D., A. Stich, and M. Frosch, *Emergence of polycystic neotropical echinococcosis*. *Emerg Infect Dis*, 2008. **14**(2): p. 292-7.
29. Kumaratilake, L.M. and R.C. Thompson, *Morphological characterisation of Australian strains of Echinococcus granulosus*. *International Journal for Parasitology*, 1984. **14**(5): p. 467-77.
30. Eckert, J., R.C. Thompson, S.A. Michael, L.M. Kumaratilake, and H.M. el-Sawah, *Echinococcus granulosus of camel origin: development in dogs and parasite morphology*. *Parasitology Research*, 1989. **75**(7): p. 536-44.
31. McManus, D.P. and J.D. Smyth, *Isoelectric focusing of some enzymes from Echinococcus granulosus (horse and sheep strains) and E. multilocularis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1979. **73**(3): p. 259-65.
32. Hobbs, R.P., A.J. Lymbery, and R.C. Thompson, *Rostellar hook morphology of Echinococcus granulosus (Batsch, 1786) from natural and experimental Australian hosts, and its implications for strain recognition*. *Parasitology*, 1990. **101 Pt 2**: p. 273-81.
33. Lymbery, A.J., R.C. Thompson, and R.P. Hobbs, *Genetic diversity and genetic differentiation in Echinococcus granulosus (Batsch, 1786) from domestic and sylvatic hosts on the mainland of Australia*. *Parasitology*, 1990. **101 Pt 2**: p. 283-9.

34. McManus, D.P. and J. Bowles, *Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics*. International Journal for Parasitology, 1996. **26**(7): p. 687-704.
35. Saccone, C., C. Gissi, C. Lanave, A. Larizza, G. Pesole, and A. Reyes, *Evolution of the mitochondrial genetic system: an overview*. Gene, 2000. **261**(1): p. 153-9.
36. Gray, M.W., G. Burger, and B.F. Lang, *Mitochondrial Evolution*. Science, 1999. **283**(5407): p. 1476-1481.
37. Nakao, M., D.P. McManus, P.M. Schantz, P.S. Craig, and A. Ito, *A molecular phylogeny of the genus Echinococcus inferred from complete mitochondrial genomes*. Parasitology, 2007. **134**(Pt 5): p. 713-22.
38. Boore, J.L., *Animal mitochondrial genomes*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(8): p. 1767-80.
39. Bowles, J., D. Blair, and D.P. McManus, *Genetic variants within the genus Echinococcus identified by mitochondrial DNA sequencing*. Mol Biochem Parasitol, 1992. **54**(2): p. 165-73.
40. Bowles, J. and D.P. McManus, *NADH dehydrogenase I gene sequences compared for species and strains of the genus Echinococcus*. Int J Parasitol, 1993. **23**(7): p. 969-72.
41. Thompson, R.C., A.J. Lymbery, and C.C. Constantine, *Variation in Echinococcus: towards a taxonomic revision of the genus*. Advance in Parasitology, 1995. **35**: p. 145-76.
42. Bowles, J., D. Blair, and D.P. McManus, *A molecular phylogeny of the genus Echinococcus*. Parasitology, 1995. **110** (Pt 3): p. 317-28.
43. Haag, K.L., A. Zaha, A.M. Araujo, and B. Gottstein, *Reduced genetic variability within coding and non-coding regions of the Echinococcus multilocularis genome*. Parasitology, 1997. **115** (Pt 5): p. 521-9.
44. Le, T.H., M.S. Pearson, D. Blair, N. Dai, L.H. Zhang, and D.P. McManus, *Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse-dog and sheep-dog strains of Echinococcus granulosus*. Parasitology, 2002. **124**(Pt 1): p. 97-112.
45. Nakao, M., D.P. McManus, P.M. Schantz, P.S. Craig, and A. Ito, *A molecular phylogeny of the genus Echinococcus inferred from complete mitochondrial genomes*. Parasitology, 2006: p. 1-10.
46. McManus, D.P., T.H. Le, and D. Blair, *Genomics of parasitic flatworms*. Int J Parasitol, 2004. **34**(2): p. 153-8.
47. Rausch, V.R. and R.L. Rausch, *The karyotype of Echinococcus multilocularis (Cestoda: Taeniidae)*. Can J Genet Cytol, 1981. **23**(1): p. 151-4.
48. Bowles, J. and D.P. McManus, *Molecular variation in Echinococcus*. Acta Trop, 1993. **53**(3-4): p. 291-305.
49. Rosenzvit, M.C., F. Camicia, L. Kamenetzky, P.M. Muzulin, and A.M. Gutierrez, *Identification and intra-specific variability analysis of secreted and membrane-bound proteins from Echinococcus granulosus*. Parasitol Int, 2006. **55** Suppl: p. S63-7.
50. van Herwerden, L., R.B. Gasser, and D. Blair, *ITS-1 ribosomal DNA sequence variants are maintained in different species and strains of Echinococcus*. Int J Parasitol, 2000. **30**(2): p. 157-69.
51. Lavikainen, A., M.J. Lehtinen, T. Meri, V. Hirvela-Koski, and S. Meri, *Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of Echinococcus granulosus*. Parasitology, 2003. **127**(Pt 3): p. 207-15.

52. Cruz-Reyes, A., C.C. Constantine, A.C. Boxell, R.P. Hobbs, and R.C. Thompson, *Echinococcus granulosus* from Mexican pigs is the same strain as that in Polish pigs. *J Helminthol*, 2007. **81**(3): p. 287-92.
53. Haag, K.L., L. Alves-Junior, A. Zaha, and F.J. Ayala, *Contingent, non-neutral evolution in a multicellular parasite: natural selection and gene conversion in the Echinococcus granulosus antigen B gene family*. *Gene*, 2004. **333**: p. 157-67.
54. Shepherd, J.C., A. Aitken, and D.P. McManus, *A protein secreted in vivo by Echinococcus granulosus inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis*. *Mol Biochem Parasitol*, 1991. **44**(1): p. 81-90.
55. Mamuti, W., Y. Sako, J.M. Bart, M. Nakao, X. Ma, H. Wen, and A. Ito, *Molecular characterization of a novel gene encoding an 8-kDa-subunit of antigen B from Echinococcus granulosus genotypes 1 and 6*. *Parasitol Int*, 2007. **56**(4): p. 313-6.
56. Chemale, G., K.L. Haag, H.B. Ferreira, and A. Zaha, *Echinococcus granulosus antigen B is encoded by a gene family*. *Mol Biochem Parasitol*, 2001. **116**(2): p. 233-7.
57. Arend, A.C., A. Zaha, F.J. Ayala, and K.L. Haag, *The Echinococcus granulosus antigen B shows a high degree of genetic variability*. *Exp Parasitol*, 2004. **108**(1-2): p. 76-80.
58. Gimba, E.R., G. Chemale, S.S. Farias, and A. Zaha, *Cloning and characterization of Echinococcus granulosus (Cestode) EgactI and EgactII actin gene promoters and their functional analysis in the NIH3T3 mouse cell line*. *Braz J Med Biol Res*, 2000. **33**(11): p. 1283-92.
59. Oliver, G., M. Vispo, A. Mailhos, C. Martinez, B. Sosa-Pineda, W. Fielitz, and R. Ehrlich, *Homeoboxes in flatworms*. *Gene*, 1992. **121**(2): p. 337-42.
60. Kamenetzky, L., A.M. Gutierrez, S.G. Canova, K.L. Haag, E.A. Guarnera, A. Parra, G.E. Garcia, and M.C. Rosenzvit, *Several strains of Echinococcus granulosus infect livestock and humans in Argentina*. *Infect Genet Evol*, 2002. **2**(2): p. 129-36.
61. Oudni, M., S. M'Rad, M. Mekki, M. Belguith, J. Cabaret, F. Pralong, T. Sayadi, A. Nouri, H. Mezhoud, H. Babba, and R. Azaiez, *Genetic relationships between sheep, cattle and human Echinococcus infection in Tunisia*. *Vet Parasitol*, 2004. **121**(1-2): p. 95-103.
62. Haag, K.L., A.M. Araujo, B. Gottstein, M. Siles-Lucas, R.C. Thompson, and A. Zaha, *Breeding systems in Echinococcus granulosus (Cestoda; Taeniidae): selfing or outcrossing?* *Parasitology*, 1999. **118** (Pt 1): p. 63-71.
63. Badaraco, J.L., F.J. Ayala, J.M. Bart, B. Gottstein, and K.L. Haag, *Using mitochondrial and nuclear markers to evaluate the degree of genetic cohesion among Echinococcus populations*. *Exp Parasitol*, 2008.
64. Turcekova, L., V. Snabel, S. D'Amelio, M. Busi, and P. Dubinsky, *Morphological and genetic characterization of Echinococcus granulosus in the Slovak Republic*. *Acta Trop*, 2003. **85**(2): p. 223-9.
65. Lahmar, S., M.E. Sarciron, F.B. Chehida, A. Hammou, H.A. Gharbi, A. Gherardi, J. Lahmar, A. Ghannay, and A.F. Petavy, *Cystic hydatid disease in sheep: treatment with percutaneous aspiration and injection with dipeptide methyl ester*. *Vet Res Commun*, 2006. **30**(4): p. 379-91.
66. Lavikainen, A., M.J. Lehtinen, S. Laaksonen, E. Agren, A. Oksanen, and S. Meri, *Molecular characterization of Echinococcus isolates of cervid origin from Finland and Sweden*. *Parasitology*, 2006. **133**(Pt 5): p. 565-70.

67. Le, T.H., D. Blair, and D.P. McManus, *Mitochondrial genomes of parasitic flatworms*. Trends Parasitol, 2002. **18**(5): p. 206-13.
68. Rosenzvit, M.C., L.H. Zhang, L. Kamenetzky, S.G. Canova, E.A. Guarnera, and D.P. McManus, *Genetic variation and epidemiology of Echinococcus granulosus in Argentina*. Parasitology, 1999. **118** (Pt 5): p. 523-30.
69. Gasser, R.B. and N.B. Chilton, *Characterisation of taeniid cestode species by PCR-RFLP of ITS2 ribosomal DNA*. Acta Trop, 1995. **59**(1): p. 31-40.
70. M'Rad, S., D. Filisetti, M. Oudni, M. Mekki, M. Belguith, A. Nouri, T. Sayadi, S. Lahmar, E. Candolfi, R. Azaiez, H. Mezhoud, and H. Babba, *Molecular evidence of ovine (G1) and camel (G6) strains of Echinococcus granulosus in Tunisia and putative role of cattle in human contamination*. Vet Parasitol, 2005. **129**(3-4): p. 267-72.
71. Ahmadi, N. and A. Dalimi, *Characterization of Echinococcus granulosus isolates from human, sheep and camel in Iran*. Infect Genet Evol, 2006. **6**(2): p. 85-90.
72. Wilder, J. and H. Hollocher, *Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans*. Mol Biol Evol, 2001. **18**(3): p. 384-92.
73. Bartholomei-Santos, M.L., L.S. Heinzelmann, R.P. Oliveira, G. Chemale, A.M. Gutierrez, L. Kamenetzky, K.L. Haag, and A. Zaha, *Isolation and characterization of microsatellites from the tapeworm Echinococcus granulosus*. Parasitology, 2003. **126**(Pt 6): p. 599-605.
74. Bretagne, S., B. Assouline, D. Vidaud, R. Houin, and M. Vidaud, *Echinococcus multilocularis: microsatellite polymorphism in U1 snRNA genes*. Exp Parasitol, 1996. **82**(3): p. 324-8.
75. Roratto, P.A., M.L. Bartholomei-Santos, A.M. Gutierrez, L. Kamenetzky, M.C. Rosenzvit, and A. Zaha, *Detection of genetic polymorphism among and within Echinococcus granulosus strains by heteroduplex analysis of a microsatellite from the U1 snRNA genes*. Genet Mol Res, 2006. **5**(3): p. 542-52.
76. Nakao, M., Y. Sako, and A. Ito, *Isolation of polymorphic microsatellite loci from the tapeworm Echinococcus multilocularis*. Infect Genet Evol, 2003. **3**(3): p. 159-63.
77. Bart, J.M., J. Knapp, B. Gottstein, F. El-Garch, P. Giraudoux, M.L. Glowatzki, H. Berthoud, S. Maillard, and R. Piarroux, *EmsB, a tandem repeated multi-loci microsatellite, new tool to investigate the genetic diversity of Echinococcus multilocularis*. Infect Genet Evol, 2006. **6**(5): p. 390-400.
78. Knapp, J., J.M. Bart, M.L. Glowatzki, A. Ito, S. Gerard, S. Maillard, R. Piarroux, and B. Gottstein, *Assessment of use of microsatellite polymorphism analysis for improving spatial distribution tracking of echinococcus multilocularis*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(9): p. 2943-50.
79. Casulli, A., J.M. Bart, J. Knapp, G. La Rosa, G. Dusher, B. Gottstein, A. Di Cerbo, M.T. Manfredi, C. Genchi, R. Piarroux, and E. Pozio, *Multi-locus microsatellite analysis supports the hypothesis of an autochthonous focus of Echinococcus multilocularis in northern Italy*. Int J Parasitol, 2009. **39**(7): p. 837-42.
80. Knapp, J., J.-M. Bart, P. Giraudoux, M.L. Glowatzki, I. Breyer, F. Raoul, P. Deplazes, G. Dusher, K. Martinek, P. Dubinsky, M.H. Guislain, F. Cliquet, T. Romig, P. Malczewski, B. Gottstein, and R. Piarroux, *Genetic diversity of the cestode Echinococcus multilocularis in red foxes at a continental scale in Europe*. PLoS Negl Trop Dis, In press.

81. Knapp, J., M.H. Guislain, J.M. Bart, F. Raoul, B. Gottstein, P. Giraudoux, and R. Piarroux, *Genetic diversity of Echinococcus multilocularis on a local scale*. Infect Genet Evol, 2008. **8**(3): p. 367-73.
82. Knapp, J., J.M. Bart, P. Giraudoux, M.L. Glowatzki, I. Breyer, F. Raoul, P. Deplazes, G. Duscher, K. Martinek, P. Dubinsky, M.H. Guislain, F. Cliquet, T. Romig, A. Malczewski, B. Gottstein, and R. Piarroux, *Genetic Diversity of the Cestode Echinococcus multilocularis in Red Foxes at a Continental Scale in Europe*. PLoS Negl Trop Dis, 2009. **3**(6): p. e452.
83. Estoup, A., P. Jarne, and J.M. Cornuet, *Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis*. Mol Ecol, 2002. **11**(9): p. 1591-604.
84. Hey, J., *The mind of the species problem*. Trends Ecol Evol, 2001. **16**(7): p. 326-329.
85. McManus, D.P., *Characterisation of taeniid cestodes by DNA analysis*. Rev Sci Tech, 1990. **9**(2): p. 489-510.
86. McManus, D.P. and J. Bowles, *Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics*. Int J Parasitol, 1996. **26**(7): p. 687-704.
87. Thompson, R.C. and A.J. Lymbery, *The nature, extent and significance of variation within the genus Echinococcus*. Adv Parasitol, 1988. **27**: p. 209-58.
88. McManus, D.P., *The molecular epidemiology of Echinococcus granulosus and cystic hydatid disease*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2002. **96 Suppl 1**: p. S151-7.
89. Gill, H.S. and B.V. Rao, *On the biology and morphology of Echinococcus granulosus (Batsch, 1786) of buffalo-dog origin*. Parasitology, 1967. **57**(4): p. 695-704.
90. Bowles, J., F. van Knapen, and D. McManus, *Cattle strain of Echinococcus granulosus and human infection*. Lancet, 1992. **339**(8805): p. 1358.
91. Bardonnnet, K., R. Piarroux, L. Dia, F. Schneegans, A. Beurdeley, V. Godot, and D.A. Vuitton, *Combined eco-epidemiological and molecular biology approaches to assess Echinococcus granulosus transmission to humans in Mauritania: occurrence of the 'camel' strain and human cystic echinococcosis*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2002. **96**(4): p. 383-6.
92. Dinkel, A., E.M. Njoroge, A. Zimmermann, M. Walz, E. Zeyhle, I.E. Elmahdi, U. Mackenstedt, and T. Romig, *A PCR system for detection of species and genotypes of the Echinococcus granulosus-complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa*. Int J Parasitol, 2004. **34**(5): p. 645-53.
93. Harandi, M.F., R.P. Hobbs, P.J. Adams, I. Mobedi, U.M. Morgan-Ryan, and R.C. Thompson, *Molecular and morphological characterization of Echinococcus granulosus of human and animal origin in Iran*. Parasitology, 2002. **125**(Pt 4): p. 367-73.
94. Kedra, A.H., Z. Swiderski, V.V. Tkach, P. Dubinsky, Z. Pawlowski, J. Stefaniak, and J. Pawlowski, *Genetic analysis of Echinococcus granulosus from humans and pigs in Poland, Slovakia and Ukraine. A multicenter study*. Acta Parasitologica 1999. **44**(4): p. 248-254
95. Pawlowski, Z. and J. Stefaniak, *The pig strain of Echinococcus granulosus in humans: a neglected issue?* Trends Parasitol, 2003. **19**(10): p. 439.

96. Bowles, J., D. Blair, and D.P. McManus, *Molecular genetic characterization of the cervid strain ('northern form') of Echinococcus granulosus*. Parasitology, 1994. **109** (Pt 2): p. 215-21.
97. Rausch, R., *Echinococcus granulosus : Biology and Ecology*, in *Compendium on Cystic Echinococcosis in Africa and in Middle Eastern countries with special reference to Morocco*, F.L. Andersen, H. Ouhelli, and M. Kachani, Editors. 1997, Brigham Young University Print services: Provo, USA. p. 18-53.
98. McManus, D.P., L. Zhang, L.J. Castrodale, T.H. Le, M. Pearson, and D. Blair, *Short report: molecular genetic characterization of an unusually severe case of hydatid disease in Alaska caused by the cervid strain of Echinococcus granulosus*. Am J Trop Med Hyg, 2002. **67**(3): p. 296-8.
99. Scott, J.C., J. Stefaniak, Z.S. Pawlowski, and D.P. McManus, *Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of Echinococcus granulosus*. Parasitology, 1997. **114** (Pt 1): p. 37-43.
100. Huttner, M., M. Nakao, T. Wassermann, L. Siefert, J.D. Boomker, A. Dinkel, Y. Sako, U. Mackenstedt, T. Romig, and A. Ito, *Genetic characterization and phylogenetic position of Echinococcus felidis (Cestoda: Taeniidae) from the African lion*. Int J Parasitol, 2008. **38**(7): p. 861-8.
101. Moks, E., I. Jogisalu, H. Valdmann, and U. Saarma, *First report of Echinococcus granulosus G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of 'genotypes' G5-G10*. Parasitology, 2008: p. 1-8.
102. Huttner, M., M. Nakao, T. Wassermann, L. Siefert, J.D. Boomker, A. Dinkel, Y. Sako, U. Mackenstedt, T. Romig, and A. Ito, *Genetic characterization and phylogenetic position of Echinococcus felidis (Cestoda: Taeniidae) from the African lion*. Int J Parasitol, 2007.
103. Haag, K.L., A.M. Araujo, B. Gottstein, and A. Zaha, *Selection, recombination and history in a parasitic flatworm (Echinococcus) inferred from nucleotide sequences*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1998. **93**(5): p. 695-702.
104. Obwaller, A., R. Schneider, J. Walochnik, B. Gollackner, A. Deutz, K. Janitschke, H. Aspöck, and H. Auer, *Echinococcus granulosus strain differentiation based on sequence heterogeneity in mitochondrial genes of cytochrome c oxidase-1 and NADH dehydrogenase-1*. Parasitology, 2004. **128**(Pt 5): p. 569-75.
105. Lanotte, G., J.A. Rioux, R. Maazoun, N. Pasteur, F. Pratlong, and J. Lepart, *[The application of a numerical method to the taxonomy of the genus Leishmania Ross, 1903.--The recognition of 146 original lines in the Old World. Use of allozymic characters. Epidemiological and phyletic significance (author'transl)]*. Ann Parasitol Hum Comp, 1981. **56**(6): p. 575-91.
106. Sadjjadi, S.M., *Present situation of echinococcosis in the Middle East and Arabic North Africa*. Parasitol Int, 2006. **55** Suppl: p. S197-202.
107. Bardonnet, K., M.C. Benchikh-Elfegoun, J.M. Bart, S. Harraga, N. Hannache, S. Haddad, H. Dumon, D.A. Vuitton, and R. Piarroux, *Cystic echinococcosis in Algeria: cattle act as reservoirs of a sheep strain and may contribute to human contamination*. Vet Parasitol, 2003. **116**(1): p. 35-44.
108. Azab, M.E., S.A. Bishara, H. Helmy, N.M. Oteifa, L.M. El-Hoseiny, R.M. Ramzy, and M.A. Ahmed, *Molecular characterization of Egyptian human and animal*

- Echinococcus granulosus* isolates by RAPD-PCR technique. J Egypt Soc Parasitol, 2004. **34**(1): p. 83-96.
109. McManus, D.P. and A.K. Rishi, *Genetic heterogeneity within Echinococcus granulosus: isolates from different hosts and geographical areas characterized with DNA probes*. Parasitology, 1989. **99 Pt 1**: p. 17-29.
 110. Tashani, O.A., L.H. Zhang, B. Boufana, A. Jegi, and D.P. McManus, *Epidemiology and strain characteristics of Echinococcus granulosus in the Benghazi area of eastern Libya*. Ann Trop Med Parasitol, 2002. **96**(4): p. 369-81.
 111. Wachira, T.M., J. Bowles, E. Zeyhle, and D.P. McManus, *Molecular examination of the sympatry and distribution of sheep and camel strains of Echinococcus granulosus in Kenya*. Am J Trop Med Hyg, 1993. **48**(4): p. 473-9.
 112. Giraudoux, P., P.S. Craig, P. Delattre, G. Bao, B. Bartholomot, S. Harraga, J.P. Quere, F. Raoul, Y. Wang, D. Shi, and D.A. Vuitton, *Interactions between landscape changes and host communities can regulate Echinococcus multilocularis transmission*. Parasitology, 2003. **127 Suppl**: p. S121-31.
 113. Campbell, G., H.H. Garcia, M. Nakao, A. Ito, and P.S. Craig, *Genetic variation in Taenia solium*. Parasitol Int, 2006. **55 Suppl**: p. S121-6.
 114. Bart, J.M., M. Abdukader, Y.L. Zhang, R.Y. Lin, Y.H. Wang, M. Nakao, A. Ito, P.S. Craig, R. Piarroux, D.A. Vuitton, and H. Wen, *Genotyping of human cystic echinococcosis in Xinjiang, PR China*. Parasitology, 2006. **133**(Pt 5): p. 571-9.
 115. Schantz, P.M., H. Wang, J. Qiu, F.J. Liu, E. Saito, A. Emshoff, A. Ito, J.M. Roberts, and C. Delker, *Echinococcosis on the Tibetan Plateau: prevalence and risk factors for cystic and alveolar echinococcosis in Tibetan populations in Qinghai Province, China*. Parasitology, 2003. **127 Suppl**: p. S109-20.
 116. Hunter, P.R. and M.A. Gaston, *Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity*. J Clin Microbiol, 1988. **26**(11): p. 2465-6.
 117. Saarma, U., I. Jogisalu, E. Moks, A. Varcasia, A. Lavikainen, A. Oksanen, S. Simsek, V. Andresiuk, G. Denegri, L.M. Gonzalez, E. Ferrer, T. Garate, L. Rinaldi, and P. Maravilla, *A novel phylogeny for the genus Echinococcus, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence*. Parasitology, 2009. **136**(3): p. 317-28.
 118. Xiao, N., M. Nakao, J. Qiu, C.M. Budke, P. Giraudoux, P.S. Craig, and A. Ito, *Dual infection of animal hosts with different Echinococcus species in the eastern Qinghai-Tibet plateau region of China*. Am J Trop Med Hyg, 2006. **75**(2): p. 292-4.
 119. Yang, Y.R., X.Z. Liu, D.A. Vuitton, B. Bartholomot, Y.H. Wang, A. Ito, P.S. Craig, and D.P. McManus, *Simultaneous alveolar and cystic echinococcosis of the liver*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2006. **100**(6): p. 597-600.
 120. Thompson, R.C. and D.P. McManus, *Towards a taxonomic revision of the genus Echinococcus*. Trends Parasitol, 2002. **18**(10): p. 452-7.
 121. Thompson, R.C., A.C. Boxell, B.J. Ralston, C.C. Constantine, R.P. Hobbs, T. Shury, and M.E. Olson, *Molecular and morphological characterization of Echinococcus in cervids from North America*. Parasitology, 2006. **132**(Pt 3): p. 439-47.
 122. McManus, D.P. and R.C. Thompson, *Molecular epidemiology of cystic echinococcosis*. Parasitology, 2003. **127 Suppl**: p. S37-51.

2. LEXIQUE

ADN (Acide Désoxyribonucléique) : Support de l'information génétique, il est présent dans le noyau et les mitochondries de toute cellule animale. Formé de deux chaînes (brins) associées par complémentarité (liaisons hydrogènes), il se compose d'éléments de base nommés nucléotides, dont la séquence est propre à chaque individu.

ADN (ou ARN) polymérase : Enzyme capable de synthétiser un brin d'ADN (ou d'ARN) à partir d'un autre par complémentarité (matrice). Elle nécessite pour cela une courte séquence de nucléotides, l'amorce, qui ira spécifier la région du brin matrice à dupliquer (par hybridation complémentaire sur celui-ci) et qui, comme son nom l'indique, servira d'amorce au nouveau brin. A parti de cette amorce, la polymérase reconstituera la séquence du brin matrice en incorporant progressivement les nucléotides complémentaires.

Adulte : Stade de développement sexuellement mature (capable de produire des gamètes).

Agent pathogène : Agent mécanique, physique, chimique, biologique, comportemental ou social dont la présence, l'excès ou l'insuffisance peut occasionner une ou plusieurs perturbations chez un organisme.

Allèles : Différentes versions d'un même gène.

Amorce : Lorsqu'elle se fixe de manière spécifique à un brin d'ADN ou d'ARN, cette courte séquence nucléotidique en permet la duplication, par complémentarité, grâce à l'ADN (ou ARN) polymérase.

Analyse de fragments : Méthode d'analyse basée sur la mesure de la taille d'un fragment d'ADN par migration électrophorétique.

Autofécondation : Fécondation des gamètes femelles d'un individu par ses propres gamètes mâles.

Clade : Taxon strictement monophylétique, c'est-à-dire contenant un ancêtre et tous ses descendants.

Cycle biologique d'un parasite : Déroulement des étapes nécessaires au développement de ce parasite, d'une génération à une autre. Certaines étapes peuvent être libres.

Dendrogramme : Succession d'embranchements illustrant les liens de parenté ou de ressemblance entre des taxons.

Distance génétique : Calculée à partir des variabilités entre deux séquences génétiques, cette valeur permet d'en mesurer l'éloignement. Avec le temps, elle peut soit diminuer (convergence), soit augmenter (divergence).

Distance phénétique : Cette valeur permet de quantifier les ressemblances et dissemblances entre deux profils électrophorétiques, sans considération pour leur cause génétique.

Electrophorèse : Technique moléculaire permettant de séparer chaque élément d'un mélange moléculaire (ADN, ARN ou protéine). Le mélange est d'abord déposé sur un gel poreux (agarose ou acrylamide) puis soumis à un champ électrique constant. En fonction de leur composition, ces éléments peuvent présenter des profils de migration spécifiques permettant leur discrimination.

Endémique : Se dit d'une zone géographique lorsque la maladie considérée est présente de manière constante.

Épidémiologie : Science étudiant la fréquence et l'impact des problèmes de santé au sein d'une population et les facteurs qui les conditionnent.

Eradication d'une maladie parasitaire : Réduction des prévalences de cette maladie au point où l'absence de transmission (ou du parasite) se pérennise à l'intérieur d'une zone géographique donnée.

Espèce : Unité de base de la classification biologique. Ensemble constitué d'individus capables de se reproduire entre eux et de produire ainsi, une descendance viable et fertile. Chaque organisme vivant se caractérise par une appellation binomiale spécifique (*Genre espèce*).

Eucaryote : Organisme vivant dont la principale caractéristique est la présence d'un noyau au sein de chacune des cellules qui le composent.

Fécondation (reproduction) croisée : Fécondation des gamètes femelles d'un individu par les gamètes mâles d'un autre individu.

Foyer : Zone géographique endémique pour une maladie.

Hermaphrodite : Capable de produire des gamètes male et femelle.

Homologie : Désigne un caractère similaire chez deux espèces distinctes mais hérité d'un même ancêtre commun.

Homoplasie : Désigne un caractère similaire chez deux espèces distinctes mais non hérité d'un ancêtre commun.

Hôte définitif : Hôte qui héberge la forme adulte du parasite et dans lequel a lieu la reproduction sexuée.

Hôte intermédiaire : Hôte qui héberge la forme larvaire du parasite et dans lequel a lieu la reproduction asexuée.

Gamètes : Cellules germinales qui lors de la fécondation (autofécondation ou fécondation croisée) fusionnent pour former un zygote/œuf.

Gène : Unité fonctionnelle et structurelle de l'information génétique. Chaque gène occupe sur un chromosome donné un emplacement précis et invariant (locus).

Génome : Ensemble du matériel génétique d'un individu. Il peut être présent en une seule version (haploïde (n)) ou en deux (diploïde (2n)). En cas d'homozygotie, les deux versions sont identiques

(allèles identiques) et en cas d'hétérozygotie, elles sont différentes (allèles différents). Les eucaryotes possèdent deux génomes, le nucléaire (confiné dans le noyau) ou le mitochondrial (confiné dans la mitochondrie).

Génotype : Ensemble des allèles d'un individu.

Homozygotes - hétérozygotes : Chez un organisme diploïde (2n), il existe deux versions ou allèles pour chacun de ses gènes. Si ces deux allèles sont identiques, l'individu est dit homozygote pour le gène considéré, sinon il est dit hétérozygote.

Incidence : Pour une maladie, nombre de nouveaux cas survenus dans une population exposée, pendant une période donnée.

Infection : Pénétration dans un organisme d'une entité étrangère capable de s'y multiplier et de produire de nouvelles entités identiques.

Kyste : Cavité remplie de liquide et isolée des tissus voisins par une paroi.

Locus : Pour un gène, il s'agit de sa localisation chromosomique, toujours précise et invariante.

Maladie : D'ordre génétique, métabolique, physiologique ou moteur, désigne une perturbation non compensée d'une ou plusieurs fonctions d'un organisme vivant. Etat morbide causé par la présence d'un agent pathogène touchant une population sensible et donc l'expression clinique est variable.

Métacestode : Pour les cestodes, ensemble des stades larvaires entre l'oncosphère et l'adulte. Hébergé par un hôte intermédiaire. Chez les échinocoques, le stade métacestode, unique, produit des adultes juvéniles (protoscolex).

Microsatellite : Séquence d'ADN nucléaire constituée de courts motifs répétés en tandem (2 à 5 nucléotides) qui lui confèrent un important polymorphisme. La fonction de ces microsatellites reste encore inconnue à ce jour.

Mutation : Désigne tout type de modification structurelle du génome. Toute mutation génère du polymorphisme génétique.

Nucléotide : Molécule composée d'une base azotée, d'un sucre et d'un groupement phosphate. Constituant élémentaire des acides nucléiques, leur séquence en leur sein est propre à chaque individu.

Oncosphère : Stade embryonnaire du métacestode. Chez les échinocoques, il est muni de 6 crochets (embryon hexacanthé) et plusieurs enveloppes le protègent.

Œuf : Structure issue de la fécondation de deux gamètes. Chez les échinocoques, il peut se développer en métacestode au sein d'un hôte intermédiaire susceptible.

Parasite : Désigne un organisme qui subvient à ses besoins aux dépens d'un autre organisme.

Pathogène : Qui occasionne une symptomatologie.

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) : Technique moléculaire permettant d'amplifier de manière exponentielle des fragments spécifiques d'ADN.

Période latente : Intervalle de temps s'écoulant entre la contamination d'un organisme par la forme infectante d'un autre organisme et l'apparition de symptômes en réponse à celle-ci.

Période prépatente : Intervalle de temps s'écoulant entre la contamination d'un organisme par la forme infectante d'un autre organisme et l'émission par celle-ci d'œufs, de larves ou de segments ovigères.

Phénotype : Expression du génotype, le phénotype peut être modifié par l'environnement.

Polymorphisme : Variation entre individus.

Population : entité biologique formée d'un groupe d'individus de la même espèce, vivant dans un même endroit et au même moment.

Prévalence : Nombre de personnes souffrant d'une maladie par rapport à la population totale.

Proglottis : Segments formant le corps du parasite (strobile).

Protoscolex : Chez les échinocoques, structure microscopique formée par bourgeonnement de la membrane germinative. Adulte juvénile dont les crochets ne sont pas totalement développés.

Recombinaison : En général dans une cellule diploïde ou partiellement diploïde, est qualifié de recombinaison tout processus produisant de nouvelles combinaisons de gènes ou de chromosomes.

Répétabilité : Capacité d'un outil à fournir les mêmes résultats lorsqu'il est utilisé sur les mêmes échantillons, plusieurs fois de suite.

Reproductibilité : Capacité d'un test ou d'un outil à produire les mêmes résultats lorsqu'il est utilisé sur les mêmes échantillons, dans des laboratoires différents.

Réservoir : Ecosystème indispensable pour assurer la survie d'un agent infectieux.

Scolex : Extrémité antérieure des cestodes, munie de ventouse et/ou de crochets.

Sensibilité : Capacité d'un outil à fournir des résultats à partir d'échantillons de concentrations plus ou moins importantes.

Séquençage d'ADN : Technique moléculaire permettant de reconstituer la composition nucléotidique d'un fragment d'ADN.

Souche : Variant qui diffère significativement des autres groupes de la même espèce.

Spéciation : Formation à partir de deux nouvelles espèces ou plus à partir d'une seule, ancestrale. Ces nouvelles espèces sont devenues incapables d'échanger des gènes entre elles (isolement reproductif).

Spécificité : Capacité à ne pas réaliser une action lorsque les conditions nécessaires ne sont pas remplies.

Spectre d'hôte : Ensemble des hôtes susceptibles de participer au cycle biologique d'un parasite.

Strobile : Ensemble des segments (proglottis) qui forment le corps du parasite.

Sympatrique : Se dit d'espèces ou de souches différentes occupant la même aire géographique.

Taxon : Unité de base en taxonomie, le taxon est un groupe d'individus reconnus comme étant semblables. Il peut être monophylétique lorsqu'il regroupe un ancêtre commun et tous ses descendants (clade) ou paraphylétique lorsque ce n'est pas le cas.

Zoonose : Maladie d'origine animale, potentiellement transmissible à l'homme.

Fin

