

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

Mademoiselle Jenny Knapp

Née le 23 juin 1979 à Besançon (Doubs)

**Caractérisation et validation du marqueur microsatellite
multilocus répété en tandem EmsB pour la recherche de
polymorphisme génétique chez *Echinococcus*
multilocularis :**

Application à l'étude de la transmission du parasite en Europe

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

Soutenue le 9 juillet 2008 à Besançon devant la commission d'examen :

Jury MM.

Alexander Mathis (Directeur de Recherche, Université de Zürich)	Rapporteur
Michel Brossard (Professeur, Université de Neuchâtel)	Rapporteur
Patrick Giraudoux (Professeur, Université de Franche-Comté)	Examinateur
Bruno Gottstein (Professeur, Université de Berne)	Examinateur
Renaud Piarroux (Professeur, Université de Franche-Comté)	Directeur de thèse

*R*emerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont entourées et soutenues pendant ces années de thèse. Mes premiers remerciements iront au Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie, sur qui j'ai pu compter jusque dans la préparation de mes premiers cours, pour Jacqueline, Catherine, Florence, Alice, Nanou, Anne, Karine, Isabelle, Marie-Pierre, à ces dames de la laverie, merci à toutes !

Merci à Frédéric Grenouillet un habitué du microsat !

Merci à mes collègues de Besançon des Hauts de Chazal : Lucie « Di Vettoretti » avec qui j'ai passé ces années de thèse et pour notre année d'enseignement symbiotique, Anne-Pauline « De Bellanger » qui m'a suivie jusqu'à Boulton-aux-Bois, Anne-Cécile pour sa bravitude et nos souvenirs bretons, à Stéphanie pour avoir relu attentivement ce manuscrit d'un œil neuf, Stéphane pour son soutien logistique et rédactionnel de qualité et ma Shushu pour son aide précieuse dans la recherche de vers ardennais et doubistes, à Markus pour son soutien, à Mallory collègue et amie, pour sa bonne humeur et ces excellents conseils, pour tous les membres du Laboratoire de Kro-no-Environnement, ainsi qu'à Maëlle, Marie-Laure et Magalie du Laboratoire de Biologie Cellulaire.

Merci à toute l'équipe du Laboratoire Vétérinaire du Doubs, notamment Natacha Woronoff et Marc Hessemann de m'avoir accueillie si chaleureusement dans leur Unité.

Merci à Manue, promue à un brillant avenir, pour sa bonne humeur, en souvenir à notre périple grec, Marie-Hélène pour m'avoir permis de ne plus compter les moutons la nuit, mais les renards !

Merci au Pr. Akira Ito pour son aide passée, présente et future et pour son accueil prochain dans son laboratoire !

Merci à l'équipe de l'Institut de Parasitologie de Berne, avec qui j'ai beaucoup appris, à Elisabeth, Trudi, Philip, Daniela et ses précieux services.

Merci à Karen, Britta, Martin (DJ Echino) de l'Echino team, Maria, Christian le botaniste, à Nadia Ben Nour qui s'en sort comme une championne.

Un grand grand merci à Marie-Louise Glowatzki avec qui j'ai énormément appris sur les secrets du microsatellite et qui a toujours cru en notre projet.

A ma très très chère Maxi avec qui j'ai passé de très bons moments et pas seulement autour d'un café de star !

A Adriano qui nous a permis d'exporter nos petits pics de l'autre côté des Alpes.

Un grand Merci à Solange Bresson-Hadni qui m'a toujours soutenue et Martine Piarroux pour son aide cartographique et ses précieux conseils, avec qui j'ai travaillé pour le registre FrancEchino pendant plus de 3 années.

Un grand grand merci à Jean-Mathieu, sans qui tout ceci ne serait point ainsi et qui malgré la distance a su être toujours présent et toujours de bon conseil. Merci pour ta franchise et ton talent.

Merci à mes encadrants et conseillers scientifiques de près et... de très près : le Pr. Renaud Piarroux pour avoir encadré cette thèse, le Pr. Patrick Giraudoux et le Dr Francis Raoul pour leurs aides précieuses et leurs soutiens sans faille. Tous mes remerciements les plus sincères au Pr. Bruno

Gottstein pour m'avoir accueilli de manière royale (et helvétique) dans son Institut, pour sa gentillesse, son soutien acharné et son immense patience.

A Esteban toujours de bonne humeur et présent depuis mon DEA.

A ma grand-mère Yvette et ses 88 ans au 8/08/08, à mes tantes Michèle, Anne, Laurence et mes oncles Jean-Denis et Vincent et mes cousins Pierre et Martin et cousines Céline, Laure, Claire, Aline, Marion et Valentine.

A ma sœur qui m'a supportée dans ces dernières années, à sa relecture attentive et son aide précieuse pour la préparation de mes enseignements.

Un grand merci à mes parents de m'avoir permis de réaliser ces études et de m'avoir soutenue toutes ces années.

Publications sur le sujet

- **J. Knapp**, M.H. Guislain, J.M. Bart, F. Raoul, B. Gottstein, P. Giraudoux, R. Piarroux. Genetic diversity of *Echinococcus multilocularis* on a local scale. *Infection, Genetics and Evolution*. 2008, 8 (3): 367-373.
- **J. Knapp**, J.M. Bart, M.L. Glowatzki, A. Ito, S. Gerard, S. Maillard, R. Piarroux, B. Gottstein. Assessment of microsatellite polymorphism for improving the spatial distribution tracking of *Echinococcus multilocularis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007, 45 (9): 2943-50.
- S. Maillard, M.C. Benchikh-Elfegoun, **J. Knapp**, J.M. Bart, P. Koskei, B. Gottstein, R. Piarroux. Taxonomic position and geographical distribution of the common sheep G1 and camel G6 strains of *Echinococcus granulosus* in three African countries. *Parasitology Research*. 2007, 100: 495-503.
- M. Piarroux, 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. Vuitton, pour le réseau FrancEchino, 2006. Surveillance de l'échinococcose alvéolaire en France : bilan de cinq années d'enregistrement 2001-2005. *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire*. 2006, n°27-28/2006 : 206-208.
- J.M. Bart, **J. Knapp**, B. Gottstein, F. El-Garch, P. Giraudoux, M.L. Glowatzki, H. Bethoud, S. Maillard, R. Piarroux, 2006. EmsB, a tandem repeated multi-loci microsatellite, new tool to investigate the genetic diversity of *Echinococcus multilocularis*. *Infection, Genetic and Evolution*. 2006, 6 : 395-400.
- J.M. Bart, S. Morariu, **J. Knapp**, M.S. Ilie, M. Pitulescu, A. Anghel, I. Cosoroaba, R. Piarroux. Genetic typing of *Echinococcus granulosus* in Romania. *Parasitology Research*. 2006, 98 : 130-7.

Principales présentations orales et affichées sur le sujet

Communications orales

- **J. Knapp**, C. Simonnet, B. Sudre, M. Chirica, C. Pellegrin, D. Castaing, J.M. Bart, L. Millon, F. Grenouillet, F. Botterel, R. Piarroux. Echinococcosis due to *Echinococcus vogeli* in a jaguar hunter: diagnosis confirmation by molecular identification (**1st Three Countries Joint Meeting, French Society of Parasitology, German Society of Parasitology and Swiss Society of Tropical Medicine and Parasitology, Strasbourg, France, Juin 2007**).
- **J. Knapp**, J.M. Bart, B. Gottstein, P. Giraudoux, R. Piarroux. EmsB, a relevant microsatellite tool to track the genetic diversity of *Echinococcus multilocularis* (**22nd International Congress of Hydatidology, Athens, Grèce, mai 2007**).
- **J. Knapp**, M.-H. Guislain, J.M. Bart, F. Raoul, B. Gottstein, P. Giraudoux, M. Piarroux, R. Piarroux. *Echinococcus multilocularis* in the region of the French Ardennes: investigation of the genetic polymorphism by microsatellite targets (**22nd International Congress of Hydatidology, Athens, Grèce, mai 2007**).
- **J. Knapp**, J.M. Bart, S. Gerard, M.-L. Glowatzki, R. Piarroux, B. Gottstein. Typage génétique d'*Echinococcus multilocularis* dans différents foyers par l'analyse de l'ADN microsatellite (**Forum Jeunes Chercheurs, Besançon, France, juin 2006**).
- **J. Knapp**, J.M. Bart, M.L. Glowatzki, I. Breyer, R. Piarroux, B. Gottstein. Exploration du polymorphisme chez *Echinococcus multilocularis* en Europe, par l'analyse de cibles microsatellites. (**Société Française de Parasitologie, Besançon, France, mai 2005**).

Communications affichées

- **J. Knapp**, J.M. Bart, S. Maillard, R. Piarroux, B. Gottstein. Assessment of microsatellite polymorphism for improving the spatial distribution tracking of *Echinococcus multilocularis* (**World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Gent, Belgique, août 2007**).

- **J. Knapp**, J.M. Bart, M.H. Guislain, F. Raoul, R. Piarroux. Genetic diversity as an indicator to the activity of *Echinococcus multilocularis* on the French region of the Ardennes (**VIII International Meeting on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases, Bangkok, Thailand, décembre 2006**).

- **J. Knapp**, J.M. Bart, A. Chaloni, F. El-Garch, I. Breyer, P. Morgenthaler, B. Gottstein, R. Piarroux. Interest of microsatellite analysis to assess genetic diversity in *Echinococcus multilocularis*. (**VII International Meeting on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases, Valentia, Espagne, juillet 2004**).

- **J. Knapp**, J.M. Bart, S. Morariu, M. Pitulescu, A. Anghel, I. Cosoroaba, R. Piarroux. Le typage moléculaire au service de l'Eco-épidémiologie : étude de deux souches d'*Echinococcus granulosus* en Roumanie (**Forum Jeunes Chercheurs, Besançon, France, juin 2004**).

Liste des Figures et Tableaux

TABLEAUX

Tableau 1	Position taxonomique d' <i>Echinococcus multilocularis</i>	p 30
Tableau 2	Prévalence d' <i>E. multilocularis</i> chez le renard, le rongeur et l'homme en Europe	p 42-43
Tableau 3	Amorces des séquences étudiées et leurs caractéristiques moléculaires chez <i>E. multilocularis</i>	p 71
Tableau 4	Principales caractéristiques du panel mondial d'échantillons d' <i>E. multilocularis</i>	p 73-74
Tableau 5	Panel d'helminthes et protozoaires testés pour l'amplification de la cible EmsB	p 92
Tableau 6	Panel de vers adultes issus de la collection de renards européens	p 104
Tableau 7	Panel de cas humains et d'animaux de parcs zoologiques d'origine suisse, allemande, autrichienne et française	p 105
Tableau 8	Composition des séquences microsatellites EmsB isolées par clonage à partir des produits d'amplifications de l'échantillon CH1	p 116
Tableau 9	Panel de pré-fèces étudiées par copro-PCR ND1 et EmsB chez 9 renards du Haut-Doubs parasités par <i>E. multilocularis</i> et 3 témoins non parasités	p 135
Tableau 10	Résultats de l'analyse de fragments des microsatellites EmsJ, EmsK et NAK1	p 139

Tableau 11	Description et caractéristiques du panel de renards roux ardennais et de leurs charges parasitaires respectives	p 146
Tableau 12	Identification des mutations après séquençage du gène codant pour l'ATPase 6 déshydrogénase	p 153
Tableau 13	Effectifs des échantillons de chaque profil EmsB par sous-région européenne	p 158
Tableau 14	Localisations géographiques des 9 profils EmsB rencontrés à la fois chez les renards européens, l'homme et l'animal en captivité	p 167

FIGURES

Figure 1	Le ver <i>Echinococcus multilocularis</i> : vue d'ensemble, scolex, détails de la couronne de crochets et œuf	p 30
Figure 2	Cycle parasitaire d' <i>Echinococcus multilocularis</i> : les stades du parasite, ses différents hôtes et leur mode de contamination	p 31
Figure 3	Distribution des cas humains d'échinococcose alvéolaire en République Populaire de Chine	p 36
Figure 4	Distribution spatiale du parasite <i>E. multilocularis</i> sur le territoire européen avant 1990 et de nos jours	p 41
Figure 5	Agencement et orientation des paires d'amorces EmsB A/C, EmsB A/B, EmsB G/H et des amorces inversées EmsB A _{ext} /B _{ext} sur le fragment EmsB	p 78
Figure 6	Analyses de fragments de la cible EmsB réalisées à partir de l'ADN de <i>E. multilocularis</i> (CH1) d'origine suisse, <i>E. canadensis</i> (116) d'origine mauritanienne et <i>E. granulosus sensu stricto</i> (539) d'origine algérienne	p 79

- Figure 7** Relation entre le profil complexe EmsB obtenu par la PCR fluorescente EmsB A/C de l'échantillon CH1 et la répartition des pics EmsB isolés par clonage des produits de PCR EmsB A/C de l'échantillon CH1 **p 115**
- Figure 8** Alignement de fragments EmsB isolés par clonage et séquencés pour trois isolats (CH1 : lésion humaine suisse ; CND : lésion de rongeur canadien ; SL1 : lésion humaine, île de Saint Laurent, Alaska) **p 117**
- Figure 9** Réalisation de la sonde EmsB G/H marquée DIG (CH1-DIG) et contrôle positif (CH1), à partir de l'isolat CH1; Immunodétection de l'hybridation de la sonde EmsB G/H marquée à la digoxigénine avec l'ADN d'*E. multilocularis* digéré par les enzymes *AluI* et *PstI* **p 119**
- Figure 10** Séquençage du fragment de 110 pb et du fragment de 852 pb, tous deux obtenus lors de la conception de la sonde DIG EmsB G/H **p 120**
- Figure 11** Produits de PCR séparés sur gel d'agarose après l'amplification de l'ADN d'*E. multilocularis* par les couples d'amorces EmsB A/B et EmsB A_{ext}/B_{ext} **p 122**
- Figure 12** Comparaison entre la séquence EmsJ obtenue après amplification de l'isolat CH1 et la séquence publiée N° 4805 **p 125**
- Figure 13** Comparaison entre la séquence EmsK obtenue après amplification de l'isolat CH1 et la séquence publiée N° 18680 **p 126**
- Figure 14** Séquence N° 11811 de 2660 pb publiée par l'Institut Sanger, montrant 4 microsatellites EmsB répétés en tandem **p 127**
- Figure 15** Electrophorégrammes des analyses de fragments de la cible EmsB pour *E. multilocularis*, *E. canadensis*, *E. granulosus sensu stricto*, *E. shiquicus* et *E. vogeli* **p 130**

Figure 16	Comparaison entre les électrophorégrammes réalisés avec les automates Beckman CEQ 8000 et ABI Prism 3100	p 131
Figure 17	Test de stabilité dans le temps des profils électrophorétiques du microsatellite EmsB par l'étude de la souche d' <i>E. multilocularis</i> F AUB-2	p 134
Figure 18	Analyses de fragments de la cible EmsB comparées entre un ver <i>E. multilocularis</i> isolé (renard M5), 3 pré-fèces (M5, M7 et Gant Velage 8) et une selle prélevée sur le terrain (F23).	p 136
Figure 19	Electrophorégrammes des loci d'EmsJ (152 et 155 pb) et EmsK (248 et 250 pb)	p 140
Figure 20	Electrophorégrammes des loci NAK1 (192 à 201 pb)	p 141
Figure 21	Regroupement hiérarchique des isolats du panel mondial d' <i>E. multilocularis</i> à partir des résultats d'EmsB	p 143
Figure 22	Electrophorégrammes des analyses de fragments de la cible EmsB réalisées à partir du panel d'isolats de vers adultes des Ardennes et dendrogramme	p 147
Figure 23	Electrophorégrammes des loci NAK1 réalisés à partir des isolats de vers adultes des Ardennes	p 149
Figure 24	Dissection de 2 vers adultes d' <i>Echinococcus multilocularis</i> isolés chez le renard ardennais R05170	p 150
Figure 25	Alignement des séquences NAK1 obtenues à partir des isolats des Ardennes	p 151
Figure 26	Distribution spatiale du panel de renards européens	p 156

- Figure 27** Dendrogramme des analyses de fragments du microsatellite EmsB réalisé à partir du panel de renards européens **p 157**
- Figure 28** Distribution spatiale des assemblages de profils EmsB dans les 9 sous-régions européennes définies **p 159**
- Figure 29** Analyse de raréfaction de la richesse et analyse de raréfaction de la diversité pour chaque sous-région européenne étudiée et en fonction du nombre de renards **p 161**
- Figure 30** Comparaison des distances génétiques et géographiques par le test de Mantel **p 162**
- Figure 31** Localisation géographique des patients français, suisses et allemands, des singes suisses, du castor bernois et des renards français, suisses, allemands et autrichiens **p 164**
- Figure 32** Dendrogramme des distances génétiques entre les isolats de la collection de lésions prélevées chez les HI hommes et animaux en captivité et les profils des vers adultes des renards européens **p 166**
- Figure 33** Electrophorégrammes et exemple de distribution du profil EmsB G20 **p 168**
- Figure 34** Histogramme des fréquences des profils EmsB rencontrés dans la collection de métacestodes humains, simiesques et de castor d'Europe **p 168**

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
DIG	Digoxigénine
BET/EtBr	Bromure d'éthydiu <i>m/ethidium bromide</i>
BCIP	5-bromo-1-chloro-3-indolyl phosphate
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumine sérique bovine)
ddNTP	Didésoxyribonucléotide triphosphate
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
DO	Densité optique
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
g	Accélération due à la pesanteur à la surface de la Terre, égale à 9,81 m/s ²
GPS	Global positioning system
kb	Kilobase
M.A.	Million d'années
MH	Mueller-Hinton
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium chloride</i>
OIE	Office international des épizoonoses/Organisation mondiale de la santé animale
pb/bp	Paire de bases/ <i>Base pair</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (réaction de polymérisation en chaîne)
RFLP	<i>Random fragment length polymorphism</i> ou polymorphisme de longueur de fragments après restriction.
rpm	Rotation par minute
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SLS	<i>Sample loading solution</i>

SSC	<i>Sodium citrate, sodium chloride</i>
TBE	Tampon de tris borate EDTA
Tm	<i>Melting temperature</i> (température d'hybridation)
UPGMA	<i>Unweighted pair group method with arithmetic mean</i> (méthode de groupement par paire non pondérée sur la moyenne arithmétique)
UTM	<i>Universal transvers mercator</i>
UV	Ultra violet
V	Volt
WHO	<i>World health organisation</i> (Organisation Mondiale de la Santé)

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	25
1. PRESENTATION	27
2. CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET BIOLOGIQUES DU PARASITE ADULTE	28
3. CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET BIOLOGIQUES DU PARASITE AU STADE LARVAIRE	28
4. LE CYCLE BIOLOGIQUE DU PARASITE	29
5. LA MALADIE HUMAINE : L'ECHINOCOCCOSE ALVEOLAIRE	32
6. DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DU PARASITE	33
6.1. LA CHINE ET L'ASIE CENTRALE	33
6.2. LA FEDERATION DE RUSSIE	34
6.3. LE JAPON	37
6.4. AMERIQUE DU NORD	37
6.5. L'EUROPE.....	38
7. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET BILAN ACTUEL DE L'ETUDE DU POLYMORPHISME D'E. MULTILOCULARIS	44
7.1. TECHNIQUES BASEES SUR L'ETUDE DE L'ADN TOTAL.....	44
7.1.1. <i>La technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism ou polymorphisme de longueur de fragments)</i>	44
7.1.2. <i>L'empreinte génétique (DNA fingerprinting)</i>	45
7.2. TECHNIQUE D'AMPLIFICATION DE CIBLES D'INTERET.....	45
7.2.1. <i>La méthode PCR-SSCP (PCR-Single Strand Conformation Polymorphism ou PCR-polymorphisme de conformation de brins simples)</i>	46
7.2.2. <i>Le séquençage de fragments nucléotidiques</i>	46
7.2.3. <i>L'analyse de fragments</i>	47
7.3. LES CIBLES ETUDIEES POUR LE GENOTYPAGE D'E. MULTILOCULARIS	48
7.3.1. <i>ADN total</i>	48
7.3.2. <i>L'ADN mitochondrial et les cibles étudiées pour le génotypage d'E. multilocularis</i>	48
7.3.3. <i>L'ADN nucléaire</i>	50
7.4. APPLICATION AU DIAGNOSTIC MOLECULAIRE	54
7.4.1. <i>Détection du parasite à partir de grattages intestinaux</i>	55
7.4.2. <i>Détection de copro-ADN</i>	56
7.4.3. <i>Diagnostic parasitaire au stade larvaire chez l'homme et d'autres HI</i>	57
8. LES QUALITES DES MARQUEURS MOLECULAIRES	58
9. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE TRAVAIL	59
MATERIEL ET METHODES	63
1. SELECTION DES CIBLES MICROSATELLITES	67
1.1. REALISATION D'UNE BANQUE D'ADN GENOMIQUE A PARTIR DE PROTOSCOLEX D'E. GRANULOSUS POUR LA RECHERCHE DE CIBLES MICROSATELLITES	67
1.2. CONSTRUCTION DE LA LIBRAIRIE DE FRAGMENTS ET SELECTION DES MICROSATELLITES	69
2. CARACTERISATION DE LA CIBLE EMSB	77
2.1. CONDITIONS D'AMPLIFICATION ET DE LECTURE	77
2.2. CARACTERISATION DU MOTIF COMPLEXE	81
2.3. LOCALISATION DE LA SEQUENCE EMSB DANS LE GENOME D'E. MULTILOCULARIS	84

2.4. ESTIMATION DU NOMBRE DE COPIES DU MICROSATELLITE DE LA SEQUENCE EMSB DANS LE GENOME D' <i>E. MULTILOCULARIS</i>	87
2.5. ARRANGEMENT DU MICROSATELLITE EMSB DANS LE GENOME D' <i>E. MULTILOCULARIS</i>	87
2.6. CONFIRMATION DES RESULTATS PAR LA RECHERCHE DES CIBLES MICROSATELLITES EMSJ, EMSK, EMSB ET NAK1 DANS LE GENOME COMPLET D' <i>E. MULTILOCULARIS</i>	89
3. CARACTERISATION DE LA TECHNIQUE DE TYPAGE BASEE SUR LE POLYMORPHISME D'EMSB	90
3.1. SENSIBILITE DE L'AMPLIFICATION DE LA CIBLE EMSB	90
3.2. SPECIFICITE DE L'AMPLIFICATION DE LA CIBLE EMSB	91
3.3. REPRODUCTIBILITE ET REPETABILITE	93
3.4. STABILITE DANS LE TEMPS	93
3.5. FAISABILITE DE LA DETECTION D' <i>E. MULTILOCULARIS</i> DANS LE MATERIEL COPROLOGIQUE	94
3.5.1. <i>Panel de renards et fèces récoltées sur le terrain</i>	94
3.5.2. <i>Grattage des intestins et prélèvement du contenu rectal</i>	95
3.5.3. <i>Lecture des culots de grattage, identification morphologique et moléculaire</i>	95
3.5.4. <i>Extraction de l'ADN présent dans les pré-fèces et fèces de renard</i>	96
3.5.5. <i>Amplification et analyse des produits de PCR</i>	96
3.5.6. <i>Recherche d'inhibiteurs dans le matériel coprologique</i>	97
4. VALIDATION DE LA CIBLE EMSB : COMPARAISON DE SON POUVOIR DISCRIMINANT AVEC DES CIBLES DE NATURE MICROSATELLITE SIMPLE-LOCUS	98
4.1. PANEL D'ECHANTILLONS	98
4.2. DETERMINATION DES GENOTYPES ET ANALYSE CLADISTIQUE	99
4.2.1. <i>Les microsatellites simple-locus</i>	99
4.2.2. <i>Le microsatellite multilocus EmsB</i>	99
4.2.3. <i>L'indice de discrimination de Hunter et Gaston</i>	100
5. UTILISATION DU MICROSATELLITE EMSB DANS UNE DEMARCHE D'EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE	101
5.1. ECHELLE MICRO-LOCALE : ETUDE DE PARASITES ISOLEES DE RONGEURS D'UN MEME CHAMP	101
5.2. ECHELLE LOCALE : ETUDE DE PARASITES ISSUS DE RENARDS COLLECTES SUR 900 KM ²	102
5.3. ECHELLE CONTINENTALE : ETUDE DU PARASITE A L'ECHELLE DE L'EUROPE	102
5.3.1. <i>Localisation géographique des renards et regroupement en sous-régions</i>	106
5.3.2. <i>PCR, analyse de fragments et analyse cladistique des parasites adultes et métacestodes</i>	107
5.3.3. <i>Etude de la distribution spatiale des différents génotypes identifiés</i>	107
RESULTATS	111
1. SELECTION DES CIBLES MICROSATELLITES	113
2. CARACTERISATION MOLECULAIRE DE LA CIBLE EMSB	114
2.1. CARACTERISATION DU MOTIF COMPLEXE	114
2.2. LOCALISATION DE LA SEQUENCE EMSB DANS LE GENOME D' <i>E. MULTILOCULARIS</i>	118
2.3. AGENCEMENT DU MICROSATELLITE EMSB DANS LE GENOME D' <i>E. MULTILOCULARIS</i>	121
2.4. ESTIMATION DU NOMBRE DE COPIES DU MICROSATELLITE EMSB DANS LE GENOME D' <i>E. MULTILOCULARIS</i>	121
2.5. RECHERCHE DES MICROSATELLITES EMSJ, EMSK, NAK1 ET EMSB DANS LE GENOME D' <i>E. MULTILOCULARIS</i> PUBLIE PAR L'INSTITUT SANGER	123
3. VALIDATION DE LA TECHNIQUE DE TYPAGE BASEE SUR LE POLYMORPHISME DE LA SEQUENCE EMSB	128
3.1. LA SENSIBILITE DE L'AMPLIFICATION	128
3.2. LA SPECIFICITE DE L'AMPLIFICATION	128
3.3. REPRODUCTIBILITE ET REPETABILITE	129
3.4. STABILITE DANS LE TEMPS	132
3.5. AMPLIFICATION PAR PCR DES PRE-FECES ET FECES TERRAIN	132

4. COMPARAISON DU POUVOIR DISCRIMINANT DE DIFFERENTES CIBLES MICROSATELLITES.....	137
4.1. LES MICROSATELLITES SIMPLE-LOCUS EMSJ, EMSK ET NAK1.....	137
4.2. LE MICROSATELLITE MULTILOCUS EMSB	142
5. ETUDE DE LA DIVERSITE GENETIQUE DU PARASITE <i>E. MULTILOCULARIS</i> A DIFFERENTES ECHELLES GEOGRAPHIQUES.....	144
5.1. ECHELLE MICRO-LOCALE : ETUDE DE POPULATIONS DE PARASITES ISOLEES DE RONGEURS CAPTUREES DANS UN MEME CHAMP	144
5.2. ECHELLE LOCALE : ETUDE D'UNE POPULATION DE PARASITES HEBERGES PAR DES RENARDS DES ARDENNES FRANÇAISES	145
5.2.1. <i>Le microsatellite multilocus EmsB</i>	145
5.2.2. <i>Le microsatellite simple-locus NAK1</i>	148
5.2.3. <i>Génotypage de la cible mitochondriale ATP6</i>	152
5.3. ECHELLE CONTINENTALE : LE FOYER EUROPEEN	154
5.3.1. <i>Etude de la distribution des génotypes d'E. multilocularis dans un panel de renards européens</i> 154	
5.3.2. <i>La diversité génétique d'E. multilocularis en Europe</i>	154
5.3.3. <i>Distribution géographique de la diversité génétique</i>	160
5.4. ETUDE DE LA TRANSMISSION D' <i>E. MULTILOCULARIS</i> CHEZ L'HOMME ET L'ANIMAL DE PARCS ZOOLOGIQUES	163
 DISCUSSION - CONCLUSION.....	 171
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	 189
 GLOSSAIRE.....	 203
 ANNEXES	 209

INTRODUCTION

1. Présentation

Echinococcus multilocularis (Leuckart, 1863) est un ver plat hermaphrodite, parasite naturel au stade adulte de l'intestin grêle de canidés sauvages et au stade larvaire, du foie des rongeurs. La présence d'*E. multilocularis* chez l'homme à l'état larvaire est responsable d'une maladie nommée échinococcose alvéolaire. Sa distribution spatiale est limitée à l'hémisphère nord. Cette espèce se distingue d'*E. shiquicus*, récemment décrit en Chine (Xiao et al. 2005), d'*E. granulosus*, pour lequel la taxonomie a été récemment révisée pour décrire actuellement 5 espèces (*E. granulosus sensu stricto*, *E. felidis*, *E. canadensis*, *E. equinus* et *E. ortleppi*) (Huttner et al. 2008; Lavikainen et al. 2006; Nakao et al. 2007), responsables chez l'homme de l'hydatidose ou kyste hydatique, d'*E. vogeli* et *E. oligarthrus*, espèces sub-tropicales responsables des échinococcoses polykystiques.

La position taxonomique du parasite est donnée dans le **Tableau 1**.

2. Caractères morphologiques et biologiques du parasite adulte

Le parasite adulte mesure de 3 à 5 mm (**Figure 1**) et a une durée de vie de 3 à 4 mois (Rausch & Schiller 1954). On distingue la tête ou scolex, munie de 4 ventouses et de 2 rangées de crochets permettant la fixation à la muqueuse intestinale de l'hôte définitif (HD), le cou (tissu prolifératif) et le corps ou strobile comportant 3 à 4 anneaux appelés proglottis où sont situés les organes génitaux mâles et femelles. La reproduction sexuée a généralement lieu entre les organes mâles et femelles d'un même ver, il s'agit alors d'une autogamie. Un croisement entre deux vers adultes peut se produire (Rausch 1985). On l'appelle hétérogamie si la reproduction a lieu entre deux vers de populations distinctes et géitonogamie si les deux vers sont issus de larves provenant de la même lésion parasitaire (Lymbery et al. 1997). Cependant le croisement entre les vers apparaît comme un événement rare et est de plus indétectable dans le cas de la géitonogamie (Haag et al. 1998; Nakao et al. 2003). Après la reproduction sexuée, l'anneau terminal gravide ou cucurbitain, rempli d'œufs embryonnés (embryophores) de 30-40 μm se sépare du strobile pour être évacué avec les fèces dans l'environnement. Les œufs ainsi libérés dans le milieu extérieur (jusqu'à 200 œufs émis par segment mûr) peuvent survivre plusieurs mois lorsque les conditions sont favorables (85 à 95% d'humidité et 4 à 15°C) (Hanosset et al. 2004; Veit et al. 1995).

3. Caractères morphologiques et biologiques du parasite au stade larvaire

Le cycle se poursuit après l'ingestion des œufs par un hôte dit intermédiaire (HI). Les œufs franchissent la muqueuse intestinale et rejoignent la circulation sanguine. Après avoir atteint le foie, l'œuf se développe en une larve métacestode, qui se multiplie de manière asexuée par polyembryonie en formant de très nombreuses logettes ou alvéoles qui donne un

aspect très compact au foie parasité, semblable au pain d'épice. Il y a alors production par la membrane interne de la larve (parenchyme prolifère) de protoscolex qui se développeront par la suite en vers adultes après leur ingestion par l'HD (Hanosset et al. 2004).

4. Le cycle biologique du parasite

Il s'agit d'un cycle dixène impliquant deux types de mammifères hôtes. Les principaux HD sont le renard (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758), le chien (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758) et, dans une moindre mesure le chat (*Felis silvestris* Schreber 1775). Chez ce dernier le parasite est peu ou pas fertile (Kapel et al. 2006). Les principaux HI en Europe sont des micro-rongeurs appartenant aux genres *Arvicola* et *Microtus* (e.g. *Arvicola terrestris* Linnaeus, 1761 ; *Microtus arvalis*, Pallas, 1778) (Vuitton et al. 2003).

Le cycle d'*E. multilocularis* est présenté dans la **Figure 2**. L'HD se contamine en ingérant des protoscolex, qui après leur dévagination et leur fixation à la muqueuse intestinale se développent en vers adultes dans l'intestin grêle de l'HD. Suite à la reproduction sexuée, le dernier segment alors gravide, se détache et est éliminé dans l'environnement avec les fèces de l'HD. La colonisation d'*E. multilocularis* chez l'HD est asymptomatique. L'HI se contamine en consommant des végétaux souillés par les déjections de l'HD.

Des HI aberrants peuvent être impliqués dans le cycle du parasite comme le sanglier (Boucher et al. 2005). Le singe en captivité peut être contaminé par un apport dans son alimentation de végétaux souillés, fauchés à proximité du parc zoologique. La maladie présente alors une évolution rapide, qui entraîne le décès de l'animal (Brack et al. 1997; Deplazes & Eckert 2001; Rehmann et al. 2003).

Tableau 1 : Position taxonomique d'*Echinococcus multilocularis*.

Règne	<i>Animalia</i>
Embranchement	<i>Platyhelminthes</i>
Classe	<i>Cestoda</i>
Ordre	<i>Cyclophyllidae</i>
Famille	<i>Taeniidae</i>
Genre	<i>Echinococcus</i>
Espèce	<i>multilocularis</i>

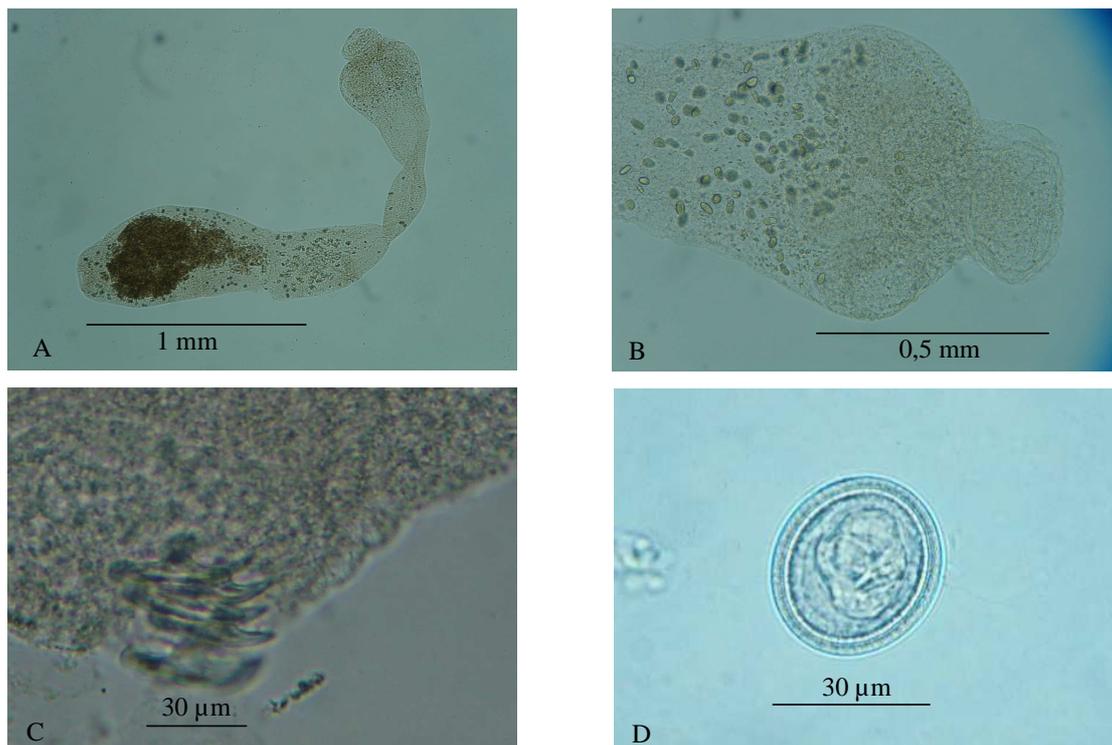


Figure 1 : Le ver *Echinococcus multilocularis* : vue d'ensemble (A), scolex (B), détails de la couronne de crochets (C) et œuf (D).

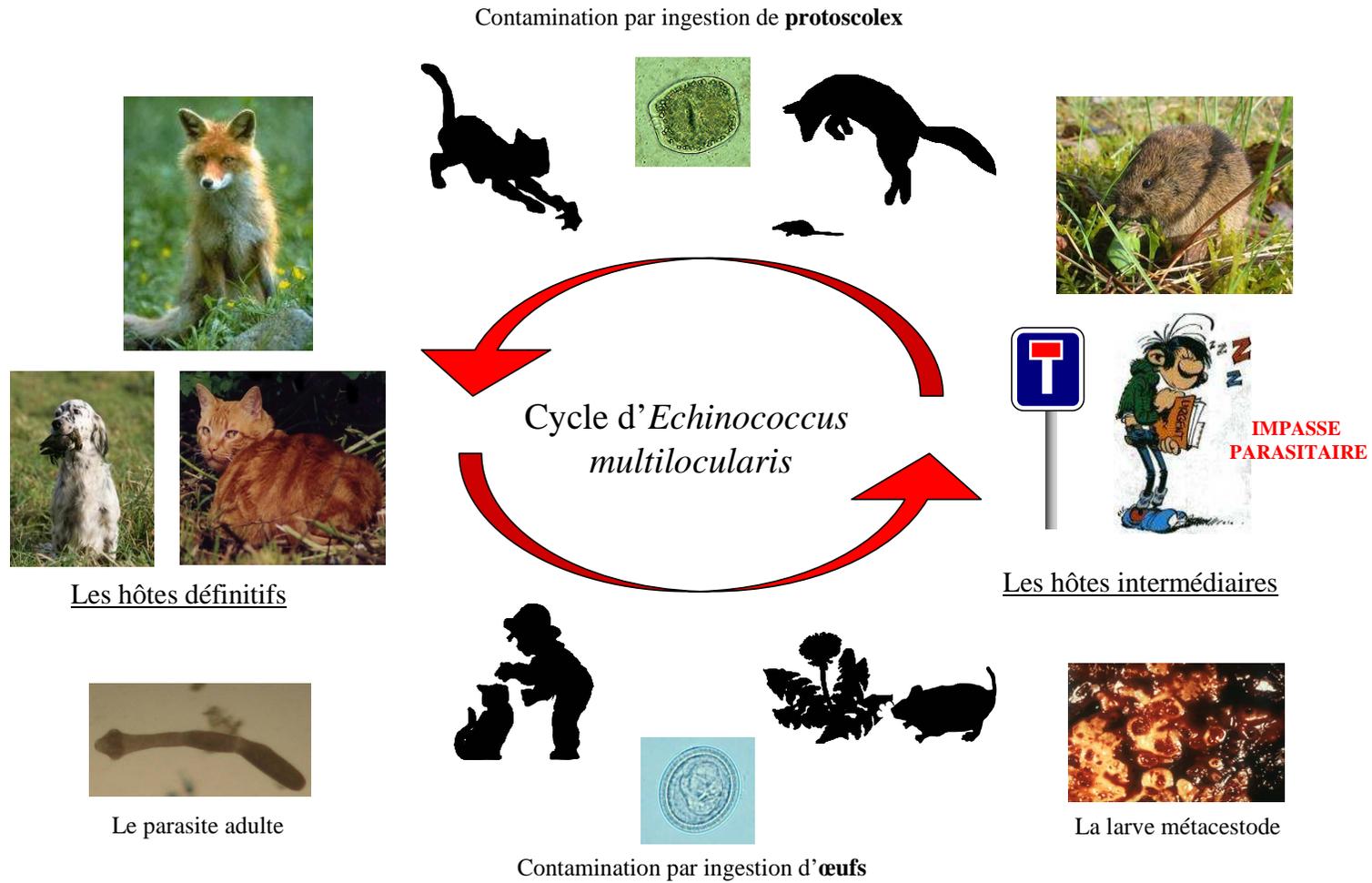


Figure 2 : Cycle du parasite *Echinococcus multilocularis* : les stades du parasite, ses différents hôtes et leur mode de contamination.

5. La maladie humaine : l'échinococcose alvéolaire

Lorsqu'il atteint l'homme, le parasite peut provoquer une maladie appelée l'échinococcose alvéolaire (EA). L'homme constitue alors une impasse parasitaire car le cycle évolutif du parasite est interrompu (**Figure 2**).

L'homme se contamine par l'ingestion d'œufs présents à la surface de végétaux (myrtille, fraise, cresson, pissenlit, etc.), déposés sur ses mains après contact avec de la terre contaminée, ou avec le pelage d'animaux sauvages et domestiques parasités. L'organe cible d'*E. multilocularis* est le foie dans 99% des cas (Eckert & Deplazes 2004; Pawlowski et al. 2002). Le parasite se développe généralement sans signe clinique particulier. Les premiers symptômes de la maladie sont souvent décrits 10 à 15 ans après la contamination. Le patient présente alors une asthénie, des douleurs abdominales hautes, une hépatomégalie palpable, et dans les cas d'atteinte du système biliaire, un ictère. Le diagnostic se fera grâce aux explorations radiographiques et sérologiques. La confirmation se fait par l'examen anatomopathologique, après une laparotomie exploratrice ou une biopsie (Bresson-Hadni et al. 2005). L'identification du parasite par biologie moléculaire constitue une méthode très fiable mais encore peu utilisée. Cette méthode présente un intérêt particulier face au diagnostic des formes atypiques de la maladie.

Lorsque le diagnostic biologique d'échinococcose alvéolaire est établi, un traitement médicamenteux à base d'albendazole est généralement prescrit. Cette molécule est parasitostatique, stoppant l'évolution du parasite sans toutefois le détruire. Cette thérapie est dans la plupart des cas administrée à vie. La chirurgie (hépatectomie partielle ou transplantation) a longtemps été considérée comme la seule solution thérapeutique satisfaisante. Quand elle apparaît possible, elle reste l'un des traitements de choix de l'échinococcose alvéolaire. On parle désormais d'une approche thérapeutique médicochirurgicale (Bresson-Hadni et al. 2005). Sans traitement adapté, une échinococcose entraîne le décès du patient dans les 15 ans pour près de 100% des cas (Ammann & Eckert 1996; Charbonnet et al. 2004).

La survenue de la parasitose chez l'homme et l'animal repose sur des événements de rencontre et de compatibilité, parfaitement illustrés par le concept de filtres développé par

Claude Combes en 1995 (Combes 1995). L'hôte et le parasite doivent coexister dans la même aire géographique et y être en contact. C'est le filtre de rencontre. Une fois absorbé, le parasite doit pouvoir se développer correctement dans l'organisme de l'hôte pour poursuivre son évolution. C'est le filtre de compatibilité. Celui-ci serait lié vraisemblablement à une baisse de l'immunité (immunodépression) (Vuitton et al. 2006) et sans doute également à la susceptibilité génétique de l'hôte (Eiermann et al. 1998).

6. Distribution géographique du parasite

E. multilocularis est une espèce dont la distribution est restreinte à l'hémisphère nord. A l'heure actuelle, quatre grands foyers endémiques ont été décrits : la Chine, le Japon, l'Amérique du Nord et l'Europe. Si le parasite est présent fréquemment chez les animaux sauvages, le risque de survenue de cas humains est très variable selon les foyers (Eckert et al. 2001b).

6.1. La Chine et l'Asie Centrale

La présence d'un important foyer endémique a récemment été décelée en République Populaire de Chine. Trois foyers principaux sont décrits actuellement (**Figure 3**). Ils sont situés au Nord-Ouest du pays, (région autonome ouïghour du Xinjiang), au Centre (provinces du Qinghai, du Tibet, du Gansu, du Sichuan et du Ningxia) et au Nord Est (provinces de la Mongolie Intérieure et du Heilongjiang) (Craig 2006). Les premiers cas humains ont été décrits dès les années 1950, alors que les premières découvertes du parasite chez l'animal ne datent que des années 1980. Des taux de prévalence pouvant atteindre 15 % de la population humaine ont été décrits dans certaines zones rurales au sein de ces principaux foyers (Craig et al. 1992; Craig et al. 2000; Vuitton et al. 2003). Un large panel d'hôtes intermédiaires et définitifs est impliqué dans le cycle du parasite en Chine (Craig et al. 1992; Eckert et al. 2001a; Vuitton et al. 2003). Les HD décrits sont le renard roux (*Vulpes vulpes*), le renard tibétain (*Vulpes ferrilata*), le renard corsac (*V. corsac*), le chien domestique (*Canis familiaris*)

et le loup (*Canis lupus*). Le rôle du chien domestique est fortement suspecté dans la transmission humaine du fait de sa proximité avec l'homme (Craig et al. 1992; Giraudoux et al. 2006). Un large panel d'HI est impliqué dans le cycle d'*E. multilocularis* : micro-mammifères (différents *Microtus*), lièvres (*Lepus* spp.), gerbilles (*Meriones* spp.) et pikas (*Ochotona* spp.) (Giraudoux et al. 2006; Vuitton et al. 2003).

La contamination de l'homme dans le foyer chinois serait liée à une multiplicité de facteurs incluant en particulier certaines pratiques agricoles favorisant la prolifération des hôtes (déforestation/reforestation), un mode de vie rural et le fait de posséder un chien (Craig et al. 2000; Giraudoux et al. 2006).

Une nouvelle espèce d'*Echinococcus* a été récemment décrite en Chine dans le Comté de Shiqu, sur le plateau tibétain (Xiao et al. 2005). Cette nouvelle espèce appelée *E. shiuiensis* impliquerait le renard tibétain et le pika dans son cycle de vie. D'un point de vue morphologique, le parasite serait très proche d'*E. multilocularis*, mais distinct par la taille de ses crochets, le nombre de proglottis et la position de ses pores génitaux. L'étude de l'ADN mitochondrial a permis d'en faire une espèce à part entière. Cependant, aucun cas d'échinococcose humaine causée par cette espèce n'a encore été identifié (Xiao et al. 2006).

Enfin, en Asie Centrale, la présence d'*E. multilocularis* a été récemment décrite sur le territoire du Kazakhstan et des taux de prévalence humaine allant de 1 à 10/100 000 ont été rapportés (Shaikenov 2006; Vuitton et al. 2003).

6.2. La fédération de Russie

Le territoire de l'ancienne URSS compte 33 régions endémiques pour *E. multilocularis* (Bessonov 2002). Huit hôtes définitifs ont été décrits, principalement représentés par le renard roux, le renard polaire (*Alopex lagopus*) et le chien ainsi que plus de 30 hôtes intermédiaires comme le campagnol, la gerbille, le lemming, le rat musqué et la souris. En Sibérie les prévalences chez l'HD sont comprises entre 25,6 et 76,2 % chez le renard polaire et entre 22 et 29,3 % chez le renard roux. Chez le campagnol des taux de

prévalence de plus de 46 % ont été décrits dans cette région. Les cas d'échinococcose alvéolaire humaine sont décrits de manière prédominante dans les régions du Yakutia, du Chuckotka, du Kamchatka (partie Est de la fédération) et de l'Altaï. Entre 1955 et 1986, plus de 900 cas humains ont été documentés dans la fédération de Russie (Bessonov 2002). Des campagnes de dépistage par techniques immunologiques ont été menées dans les années 1960 sur plusieurs dizaines de milliers de prélèvements et selon les régions entre 0,2 et 14,7 % des sujets ont présentés un résultat positif aux différents tests sérologiques appliqués (Bessonov 2002).

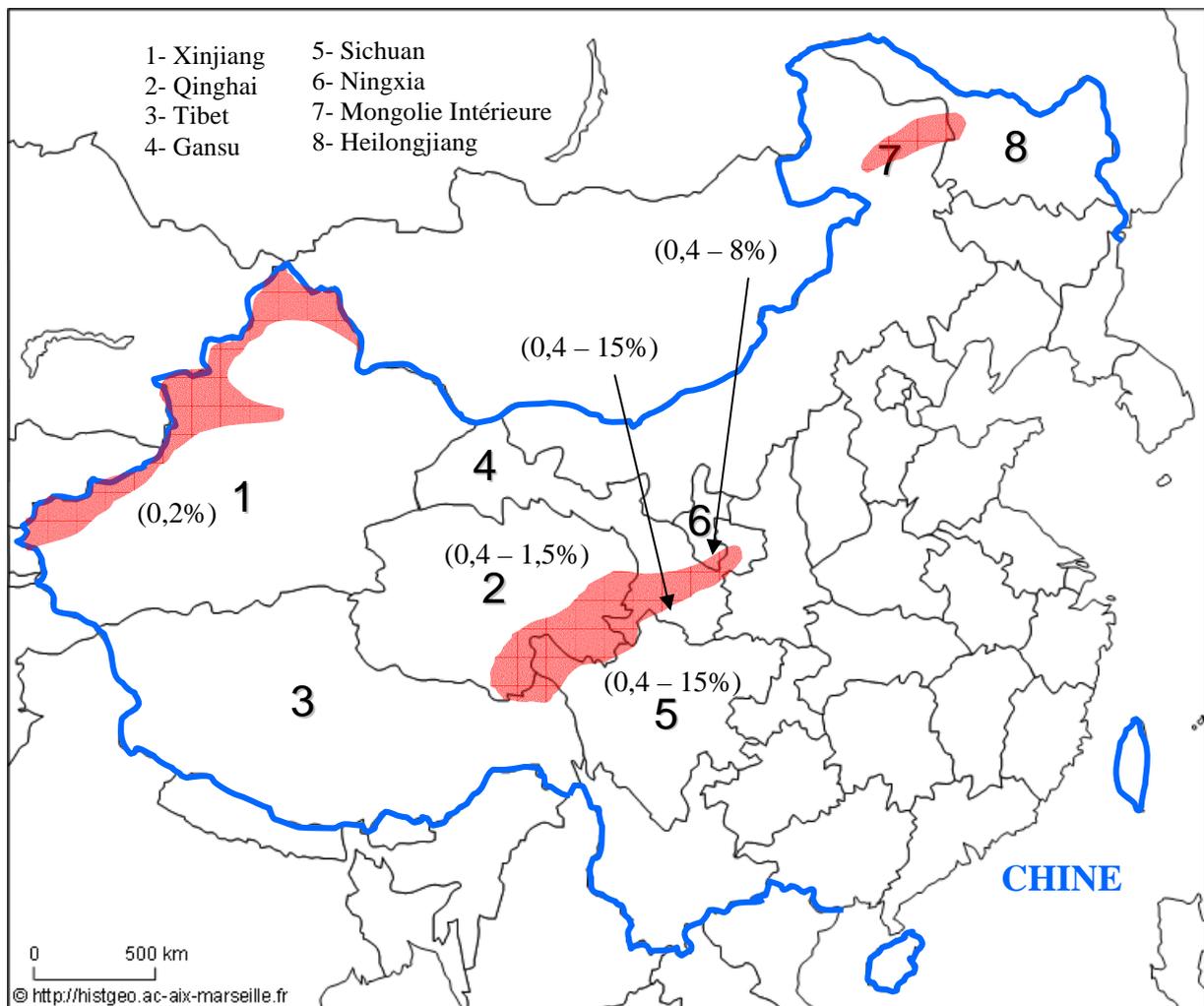


Figure 3 : Distribution des cas humains d'échinococcose alvéolaire en République Populaire de Chine (ombrés rouges). Données de prévalences humaines entre parenthèses. D'après Craig et al. 2006.

6.3. Le Japon

E. multilocularis aurait été introduit au Japon entre 1924 et 1926 sur l'île Rebun depuis les îles Kourile russes (Kamiya et al. 2007). Des renards roux ont été introduits sur l'île lors de campagnes d'éradication visant le campagnol de Sundevall (*Clethrionomys rufocanus* Sundevall 1846). La presque totalité de l'île d'Hokkaido, au Nord du Japon est actuellement reconnue comme endémique (Kamiya et al. 2007). Entre 1985 et 1997, 373 patients ont été opérés d'une lésion due à *E. multilocularis* (Kamiya et al. 2007). Quelques cas ont été diagnostiqués en dehors de la zone d'endémie, faisant suspecter la présence du parasite dans d'autres sites (Doi et al. 2000). Des campagnes de lutttes contre les hôtes du parasite, conduites après la découverte des premiers cas humains avaient éliminé pour un temps le parasite d'Hokkaido. Cependant en 1966, l'introduction naturelle ou accidentelle d'hôtes définitifs infectés a entraîné le retour du parasite sur l'île (Kamiya et al. 2007).

Actuellement le renard roux, mais également le chien présentent des taux de prévalence de 10 à 30% (Kamiya et al. 2003; Morishima et al. 2006). Le chat et le chien viverrin (*Nyctereutes procyonoides*) constituent aussi des hôtes potentiels (Eckert et al. 2001b). Les espèces de rongeurs impliquées dans le cycle sont principalement le campagnol de Sundevall ou plus rarement le rat (*Rattus norvegicus*) (Ito et al. 1996; Okamoto et al. 1992).

6.4. Amérique du Nord

Le parasite est décrit au Canada (provinces de l'Alberta, du Saskatchewan et du Manitoba), dans le nord de la partie centrale des Etats-Unis d'Amérique (états du Dakota du Nord et du Sud, de l'Iowa, du Minnesota et du Montana) (Eckert et al. 2000) et en Alaska (la zone des Toundras sur le continent). En Amérique du Nord, la présence d'*E. multilocularis* chez le renard roux a été observée en 1964 dans le Dakota du Nord, puis le parasite a été isolé dans les états voisins, à la fois chez différents canidés sauvages et chez les rongeurs. Des prévalences de 75 % ont été décrites dans le Dakota du Sud chez le renard roux et le coyote

(Hildreth et al. 2000) et de plus de 70 % chez le renard dans le Dakota du Nord (Rausch & Richards 1971). Des taux plus faibles ont été décrits dans le Minnesota (5 %) (Leiby et al. 1970).

Le parasite semble occuper un vaste espace s'étendant depuis l'état du Montana jusqu'à l'Ohio. Cependant seuls deux cas humains ont été rapportés sur le continent nord-américain, en 1937 et en 1977 (Eckert et al. 2000). Une étude sérologique a été menée chez 115 trappeurs du Sud Dakota. Par la technique ELISA, aucun des sujets de l'étude ne présentaient de sérologie positive (Hildreth et al. 2000).

Le parasite a également été décrit dans le détroit de Béring, notamment sur l'île de Saint Laurent (Alaska) (Rausch & Schiller 1954; Rausch et al. 1990) où le cycle est entretenu par le renard polaire et le chien de traîneau, ainsi que par différents rongeurs comme le campagnol des toundras (*Microtus oeconomus*) et le campagnol boréal (*Clethrionomys rutilus*) (Rausch et al. 1990). Dans cette seule île, 53 cas humains ont été diagnostiqués entre 1947 et 1990 pour seulement un millier d'habitants (Schantz et al. 1995).

Rausch et Schiller ont décrit en 1954 l'espèce *E. multilocularis sibiricensis* (Vogel, 1957) sur les îles du détroit de Béring, qui se distingue morphologiquement de la souche dite eurasiennne *E. multilocularis multilocularis* par des crochets plus petits. (Eckert & Thompson 1988; Rausch & Schiller 1954). Les deux souches d'*E. multilocularis* auraient divergées après la submersion du détroit de Béring (Lymbery 1995).

6.5. L'Europe

Le foyer historique européen est localisé au nord de l'Arc Alpin. Il comprend l'est et le centre de la France, le sud de l'Allemagne (Bavière), la Suisse et la partie tyrolienne de l'Autriche (Eckert et al. 2000). Au tournant des années 1990, la présence du parasite a été décrite plus à l'est et au sud de Europe (**Figure 4**). Dix-huit pays européens sont actuellement documentés sur la présence d'*E. multilocularis* (**Tableau 2**). Toutefois le foyer historique présente encore actuellement les taux d'incidence humaine les plus élevés (Kern et al. 2003; Piarroux et al. 2006; Schweiger et al. 2007).

Actuellement, le parasite occupe un espace continu s'étendant, d'Ouest en Est, depuis les Ardennes françaises (Guislain et al. 2007) à la région montagneuse des Tatras (Dubinsky et al. 2006; Snabel et al. 2006) et, du Nord au Sud, du Danemark (Saeed et al. 2006) aux Alpes italiennes (Casulli et al. 2005).

En Europe, le cycle du parasite est principalement entretenu d'une part, par le renard roux et le campagnol terrestre (*Arvicola terrestris*) et le campagnol des champs (*Microtus arvalis*). D'autre part les animaux domestiques (chiens et chats) sont sporadiquement touchés mais ne semblent pas jouer un rôle majeur dans le cycle de vie du cestode (Jenkins et al. 2005). Par ailleurs, la présence du renard dans les zones urbaines, récemment décrite et étudiée dans différentes villes suisses (Deplazes et al. 2004; Fischer et al. 2005; Hofer et al. 2000), allemandes (Romig et al. 2006) et françaises (Robardet et al. 2008) pourrait augmenter les risques de contamination humaine et impliquer plus étroitement les animaux domestiques dans la transmission du parasite (Deplazes et al. 2004). D'autres HD comme le chien viverrin, originaire de l'est de l'Asie et introduit récemment en Allemagne et en Pologne (Machnicka-Rowinska et al. 2002), où encore le rat musqué (*Ondatra zibethicus*) (Hanosset et al. 2008) pourraient constituer des réservoirs supplémentaires pour le parasite. Le loup, le lynx, le chat sauvage et le chat domestique semblent jouer un rôle mineur en Europe (Kapel et al. 2006; Martinek et al. 2001). Des études épidémiologiques ont montré que la survenue de la maladie chez l'homme en Europe était corrélée à la pratique d'une activité en rapport avec la nature (agriculture, chasse, cueillette, etc.) et au fait de posséder un chien (Piarroux et al. 2006).

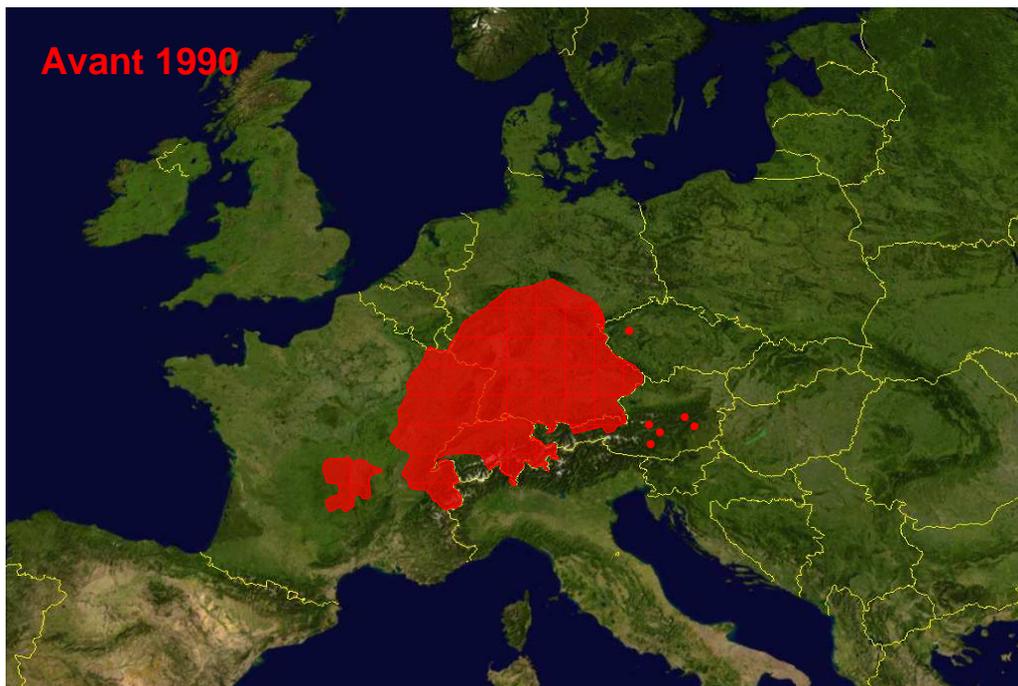
L'activité humaine peut également être à l'origine de l'apparition de nouveaux foyers parasitaires. Par exemple, sur les îles de l'archipel du Svalbard, dans la mer de Barents (Norvège), la présence concomitante de renards polaires porteurs du parasite et d'un rongeur (*Microtus rossiameridionalis*) importé de manière accidentelle depuis la Russie dans les années 1960 a permis le développement d'un cycle parasite sur un territoire jusque là indemne. Ainsi, le parasite a pu être identifié pour la première fois sur ces îles en 1999 (Henttonen et al. 2001). Dans les années 2000 sur la côte du Grumant, de fortes prévalences du parasite ont été observées chez le renard polaire (60 % de fèces de renards positives à *E. multilocularis*) et le rongeur (51 % de rongeurs positifs) (Fuglei et al. 2008; Henttonen et al. 2001), exposant en particulier les touristes à un risque de contamination important.

D'un point de vue épidémiologique, la distribution spatiale d'*E. multilocularis* en Europe semble avoir évolué depuis la fin des années quatre-vingt. Des études montrent que le parasite est actuellement identifié dans des zones jusqu'alors considérées comme indemnes. En Europe de l'est, le parasite n'a été décrit qu'à partir des années quatre-vingt dix, lors d'études menées sur la faune helminthique (Bruzinskaite et al. 2007; Snabel et al. 2006). Des cas humains sont maintenant décrits depuis peu dans cette partie de l'Europe, évoquant une vague de progression du parasite. En Hollande, le développement d'un modèle mathématique a permis d'étudier l'extension spatiale du parasite dans une nouvelle zone d'endémie. D'après les données de prévalence recueillies dans le sud du pays, le front de migration du parasite vers le nord a été estimé par ce modèle à 2,7 km de progression par an (Takumi et al. 2008).

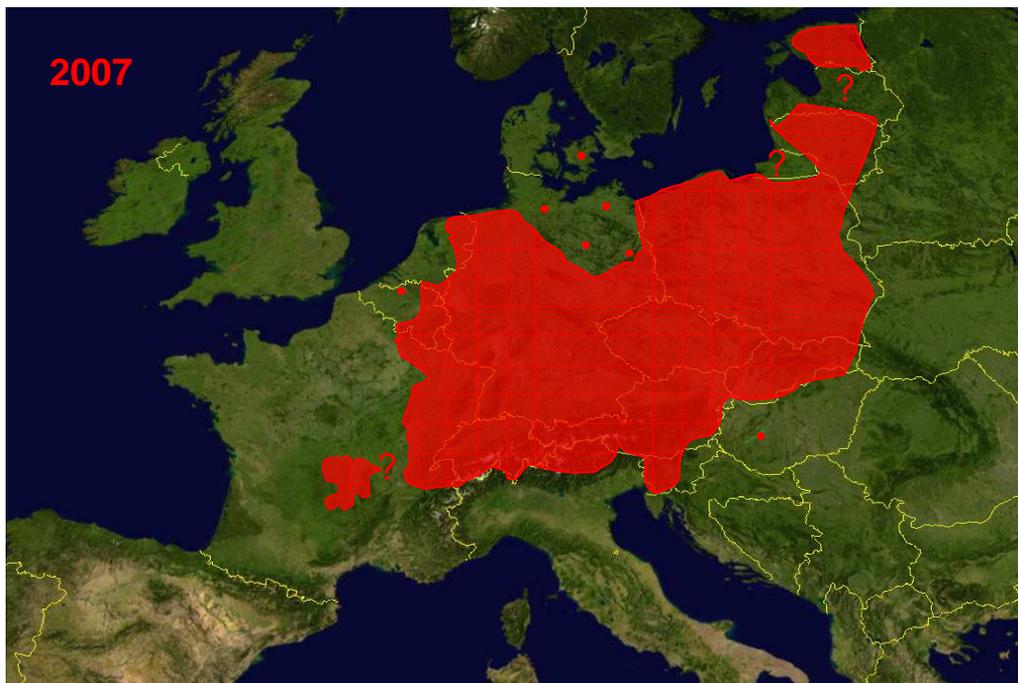
Cependant, le nombre de cas humains ne connaît pas pour l'heure d'augmentation drastique, excepté en Suisse où Alexander Schweiger et ses collaborateurs viennent de signaler un récent accroissement du nombre de diagnostics de cas humains (Schweiger et al. 2007). La présence du parasite en milieu urbain et la proximité avec l'homme de la faune sauvage parasitée suscite une attention particulière (Deplazes et al. 2004).

Deux hypothèses peuvent être avancées vis-à-vis de la progression constatée du parasite en Europe. Il pourrait s'agir de l'émergence récente du parasite depuis le foyer historique vers des zones jusqu'alors indemnes ; le foyer ancien alimenterait le foyer nouveau, dans un système de transmission du parasite du type « continent-île ». En terme de diversité génétique, le groupe colonisateur ne portant qu'une part de l'information génétique du foyer ancien, un déséquilibre de diversité génétique pourrait être observé entre les deux zones (Templeton 2008). Une seconde hypothèse est fondée sur l'idée que le parasite était déjà présent en Europe dans le réservoir sauvage avant la mise en évidence des cas chez l'homme, mais que ces cas humains seraient restés non détectés du fait de la méconnaissance de la maladie. La diversité génétique observée serait alors de répartition plus homogène dans le foyer Européen. Jusqu'à présent, le manque d'outils de détection performants, allié au manque de suivi épidémiologique dans les zones où le parasite n'était pas ou peu connu a pu aboutir à une sous estimation de la fréquence de la maladie.

Le développement d'outils permettant de réaliser des études épidémiologiques en Europe apparaît alors d'intérêt majeur pour mieux comprendre la circulation du parasite dans ce foyer. Une démarche de génotypage pourrait être employée pour étudier la diversité génétique d'*E. multilocularis* dans des zones de hautes et de basses endémies, dans le but de mieux appréhender sa distribution spatiale.



A



B

Figure 4 : Distribution spatiale du parasite *E. multilocularis* sur le territoire européen avant 1990 (A), d'après (Eckert et al. 2001b) et de nos jours (B) d'après les données récentes de la littérature (voir Tableau 2).

Tableau 2 : Prévalence d'*E. multilocularis* chez le renard, le rongeur et l'homme en Europe.

Pays et régions	Périodes étudiées	Prévalences chez le renard (positive/obs)	Rongeurs	Cas humains	Références
Belgique					
Nord	1996-1999	1,7 (4/237)			(Vervaeke et al. 2003)
Wallonie	1998-2002	20,2 (143/709)			(Losson et al. 2003)
"	2003-2004	24,55 (243/990)			(Hanosset et al. 2008)
"	"		0,16 (2/1249) ^a		"
"	"		11,18 (192/1718) ^b		"
Ensemble du pays	1996-2002	16,1 (164/1018)			(Vervaeke et al. 2006)
Ensemble du pays	1996-2000			3	(Kern et al. 2003)
Pays-Bas					
Groningen	1996-1997	1,8 (5/272)			(van der Giessen et al. 1999)
Limburg (Sud)	1998-2000	9,4 (10/106)			(van der Giessen et al. 2004)
	2002-2003	8,15 (15/184)			(Vervaeke et al. 2006)
Danemark					
	1997-2002	0,3 (3/1040)			(Saeed et al. 2006)
Luxembourg					
	1990-1992	5,1 (13/255)			(Eckert et al. 2001b)
France					
Lorraine	1983-1987	21,8 (112/513)			(Aubert et al. 1987)
ville de Nancy (centre et périphérie)	2004-2006	30 (38/127)			(Robardet et al. 2008)
Doubs	1998-1999	63,6 (13/22)			(Raoul et al. 2001)
"	2007	61,4 (35/58)			(com. perso)
Haute-Savoie	1990	23 (34/150)			(Petavy et al. 1990)
Jura	1981	8,3 (7/84)			(Hanosset et al. 2004)
Alsace	1985	4 (30/120)			"
Cantal	1988	15 (23/149)			"
Ardennes	2003-2005	53 (79/149)			(Guislain et al. 2008)
Ensemble du pays	<1980-2005			258	(Piarroux et al. 2006)
Allemagne					
<i>Nord et Est</i>					
Schleswig-Holstein	1990-1994	0,4 (3/699)			(Nebel 1996)
Mecklenburg-Vorp.	1991-1994	0,6 (21/3576)			(Eckert et al. 2001b)
Brandenbourg	1992-1994	4,1 (267/6529)			"
Saxe-Anhalt	1992-1996	0,6 (21/3344)			"
<i>Nord-ouest</i>					
Basse-Saxe	1991-1997	13,1 (706/5365)			"
Rhénanie-duNord-Westphalie	1993-1998	28,3 (117/414)			(Eckert et al. 2001b); (EurEchinoReg 1999)
<i>Centre</i>					
Hesse	1989-1990	29 (47/162)			(Ballek et al. 1992)
Thuringe	1990-1995	18,3 (1631/8923)			(Worbes 1992)
<i>Sud-ouest et Sud</i>					
Rhénanie-Palatinat	1996-1997	29,7 (340/1145)			(Jonas & Dräger 1998)
Sarre	1994-1995	19,9 (50/251)			(Eckert et al. 2001b)
Bade-Wurtemberg	1995-1998	37 (2225/6013)			(EurEchinoReg 1999)
Stuttgart ville	1995	16,8 (83/492)			(Romig et al. 1999)
Bavière	1988-1994	28 (1128/3969)			(Nothdurft et al. 1995)
Ensemble du pays	<1980-2000			132	(Kern et al. 2003)
Suisse					
Zürich ville	1996-1998	44,3 (168/388)			(Hofer et al. 2000)

Pays et régions	Périodes étudiées	Prévalences chez le renard (positive/obs)	Rongeurs	Cas humains	Références
(péri-urban)	1996-2001	62,9 (582 obs)			(Hegglin et al. 2007)
(périphérie)	"	39,5			"
(zone urbaine)	"	16,5			"
7 cantons (Ouest CH)	1990-1995	30,1 (1142/3793)			(Brossard et al. 2007)
Canton de Fribourg	1992-1993	47 (34/73)			(Gottstein et al. 1996)
"	1993-1994	56 (13/23)			"
"	1993		39 (11/28) ^a		"
"	1994		11 (5/44) ^a		"
"	1994		10 (2/20) ^a		"
Ensemble du pays	1956-2005			494	(Schweiger et al. 2007)
Liechtenstein	1990-1992	34,9 (45/129)			(Eckert et al. 2001b)
Autriche					(EurEchinoReg 1999); (Eckert et al. 2001b)
(5/9 états fédéraux)	1989-1998	7,8 (294/3778)			
Vorarlberg	1991	34,8 (115/332)			(Prosl & Schmid 1991)
Ensemble du pays	1892-1990			170	(Auer & Aspöck 1991)
"	<1980-2000			54	(Kern et al. 2003)
Tchéquie					(Eckert et al. 2001b); (Pavlašek 1998)
5/5 régions	1994-1998	14 (214/1528)			
15 districts/4 régions	1994-1996	10,6 (87/824)			(Pavlašek et al. 1997)
	1998	14 (214/1528)			(Pavlašek 1998)
	1979			1	(Slais et al. 1979)
Slovaquie					
Est et ouest	1998	10,7 (6/56)			(Dubinsky et al. 1999)
Ensemble du pays	2001-2004	35 (149/426)			(Dubinsky et al. 2006)
	2005			6	(Snabel et al. 2006)
Pologne	1993-1998	2,6 (76/2951)			(Malczewski et al. 1999)
Nord-est	"	11,8 (36/306)			"
Nord-ouest	"	2,2 (36/1620)			"
Sud-est	"	0,4 (1/254)			"
Sud-ouest	"	0,4 (3/771)			"
18/43 districts	1995	1 (2/20)			(Malczewski et al. 1995)
Ensemble du pays	1986-2000			14	(Kern et al. 2003)
Grèce	1996-2000			1	(Kern et al. 2003)
Hongrie	2002	5 (5/100)			(Sreter et al. 2003)
	2008			1	(Horvath et al. 2008)
Estonie	2003		29,4 (5/17) ^a		(Moks et al. 2005)
Lituanie	1999-2001		20 (1/5) ^a		(Mazeika et al. 2003)
	2001-2004	57,7 (118/206)			(Bruzinskaite et al. 2007)
	1997-2006			80	"
Italie					
Trentin Haut Adige	2001-2004	9,96 (24/241)			(Casulli et al. 2005)
Norvège					
Svalbard	2000	20 (7/35)			(Fuglei et al. 2008)
	2004	60 (135/224)			"
	1999		20,11(36/179) ^a		(Henttonen et al. 2001)
	2000		51 (23/45) ^a		"
Slovénie					
Sud et nord-est	2001-2005			9/1263 ^c	(Logar et al. 2007)

^arongeurs et insectivores ; ^brat musqué (*Ondatra zibethicus*) ; ^csérologies

7. Techniques de biologie moléculaire et bilan actuel de l'étude du polymorphisme d'*E. multilocularis*

Différentes techniques de biologie moléculaire ont été employées pour étudier la diversité génétique du parasite. Elles prennent pour cible l'ADN total du parasite, l'ADN mitochondrial (ADNmt), majoritairement codant et l'ADN nucléaire codant et non codant. Certaines de ces cibles sont également utilisées pour détecter la présence d'*E. multilocularis* à la surface de la muqueuse intestinale de l'HD, dans les prélèvements de fèces et pour identifier l'étiologie d'une lésion humaine.

7.1. Techniques basées sur l'étude de l'ADN total

7.1.1. La technique RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou polymorphisme de longueur de fragments)

La technique RFLP consiste à étudier le polymorphisme de longueur des fragments d'ADN obtenus après digestion enzymatique. Les produits de digestion de l'ADN sont séparés par migration électrophorétique selon leur taille exprimée en paire de bases (pb). Cette approche peu onéreuse permet d'étudier un grand nombre d'échantillons. Cette technique peut être combinée à une amplification par PCR (PCR-RFLP), associant l'amplification d'une cible donnée à la séparation dans un champ électrique des fragments après une digestion enzymatique.

7.1.2. L’empreinte génétique (*DNA fingerprinting*)

La méthode d’empreinte génétique ou DNA fingerprinting débute par la réalisation d’une digestion enzymatique de l’ADN. Les fragments ainsi obtenus sont séparés par migration électrophorétique et transférés sur une membrane du type nitrocellulose par la technique de Southern blotting (Southern 1975). Une hybridation est réalisée en présence de sondes marquées de di ou tri-nucléotides répétés en tandem. L’utilisation de cette sonde oligonucléotidique de type VNTR (*variable number of tandem repeats* ou répétitions en tandem en nombres variables) ou encore ADN minisatellite, permet de détecter des régions hypervariables de l’ADN constituées de répétitions simples chez la plupart des organismes eucaryotes (Jeffreys et al. 1985a, b).

Les profils de bandes obtenus après la révélation et l’analyse de l’hybridation sont spécifiques d’un individu donné. Ils sont appelés « empreintes génétiques ». La réalisation de cette technique et sa reproductibilité exige une standardisation stricte. La multitude des bandes générées rend l’analyse complexe et nécessite l’emploi de logiciels de lecture adaptés.

Ces techniques de biologie moléculaire basées sur l’ADN total nécessitent de séparer l’ADN du parasite de celui de l’hôte. En effet, lors de l’étude de lésions tissulaires l’ADN de l’hôte et celui du pathogène sont extraits ensemble. La faible reproductibilité entre laboratoires rend ces outils d’utilisation délicate. Ils ont néanmoins permis d’étudier le polymorphisme de *E. multilocularis* et *E. granulosus* au-delà des comparaisons morphologiques, longtemps utilisées pour différencier les organismes entre eux. La PCR a remplacé progressivement ces techniques.

7.2. Technique d’amplification de cibles d’intérêt

L’ensemble des techniques d’amplification de l’ADN repose sur la méthode de polymérisation en chaîne ou PCR, basée sur certaines caractéristiques de la réplication de

l'ADN et qui permet d'obtenir un grand nombre de copies d'un fragment donné. La sensibilité de la technique peut être augmentée en réalisant deux PCR successives, lors d'une PCR nichée ou *Nested-PCR*.

7.2.1. La méthode PCR-SSCP (*PCR-Single Strand Conformation Polymorphism* ou PCR-polymorphisme de conformation de brins simples)

Après la réaction en chaîne de polymérisation d'une cible d'ADN donnée, les produits d'amplification sont séparés dans un champ électrique en fonction de leur taille et de leur conformation, et détectés en présence d'un intercalant de l'ADN comme le bromure d'éthidium. Les fragments sont alors dénaturés et l'ADN se présente sous la forme de simples brins. Les profils de PCR-SSCP sont observés après révélation des bandes sur le gel aux ultraviolets. L'ADN doit apparaître sur le gel de migration sous la forme d'une bande unique. Dans le cas de mutations, les profils peuvent présenter plusieurs bandes. Les substitutions peuvent être confirmées par le séquençage de chaque bande du profil, après leur isolement sur gel d'agarose (Orita et al. 1989). La sensibilité de la méthode dans la détection de mutations pour des séquences de moins de 350 pb est de 95 à 100 % (Lessa & Applebaum 1993; Sheffield et al. 1993). Cette technique permet de sélectionner les isolats nécessitant un séquençage.

7.2.2. Le séquençage de fragments nucléotidiques

La technique de séquençage consiste en la reconstitution de la succession nucléotidique d'un fragment d'ADN donné. La méthode de Sanger ou *Chain termination method* (Sanger et al. 1977) repose sur la réalisation de l'équivalent d'une PCR en présence de dNTP classiques, de ddNTP marqués et d'une seule amorce oligonucléotidique. Cette PCR a pour matrice les produits d'une première PCR ciblée sur le fragment à étudier. Les ddNTP sont marqués par un fluorochrome spécifique d'une base donnée et présentent un groupement hydroxyle à l'extrémité 3'. L'ADN polymérase incorpore de manière aléatoire des nucléotides marqués et non marqués. L'élongation est stoppée lorsqu'un ddNTP est ajouté au fragment en cours d'élongation. Celui-ci empêche la formation de la liaison phosphodiester, arrêtant la synthèse du brin. Tous les fragments synthétisés sont

séparés par électrophorèse dans un champ électrique, en fonction de leur taille. Une lecture par colorimétrie détecte les fluorochromes et permet de reconstituer la succession des nucléotides de la séquence. Cette technique peut être couplée à un clonage des produits de PCR avant le séquençage pour augmenter encore le nombre de copies de la séquence cible à étudier. La technique de clonage repose sur l'incorporation des fragments d'intérêt dans un plasmide. Ce dernier est ensuite introduit dans une bactérie rendue compétente. Le fragment est alors copié à l'identique par une colonie bactérienne.

Le pyroséquençage est une technique récemment développée, qui a apporté une simplification notable pour le séquençage de l'ADN (Ronaghi et al. 1996). Cette technique se base sur l'incorporation par l'ADN polymérase des nucléotides les uns après les autres. L'incorporation d'un nucléotide provoque la libération d'un pyrophosphate (PPi). Une ATPsulphurylase transforme le PPi en ATP, qui est alors couplé à une luciférine. La luciférase produit une oxyluciférine et un signal lumineux est généré. Ce signal est capté et reproduit sous forme d'un pic sur le pyrogramme, reconstituant la succession de nucléotides du fragment à étudier.

7.2.3. L'analyse de fragments

La technique d'analyse de fragments ou analyse de taille des fragments amplifiés par PCR fluorescente repose sur l'étude de fragments d'ADN nucléaires de motifs répétés en tandem (1 à 6 nucléotides). Cette classe d'ADN nucléaire répétitif est appelée ADN microsatellite. 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 (Wilder & Hollocher 2001). L'une des deux amorces est marquée par un fluorochrome spécifique. Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse dans un champ électrique 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. La position des signaux de fluorescence est calibrée à partir du marqueur de poids moléculaire permettant de déterminer la taille en paire de bases des fragments amplifiés. Pour une cible simple-locus, un ou deux signaux ou pics de fluorescence peuvent être détectés. Lorsqu'un seul pic est détecté on parle alors d'un profil « homozygote » et quand 2 pics sont observés, d'un profil « hétérozygote ».

Cette technique simple est couramment utilisée en recherche de filiation, en test de paternité ou en médecine légale (Bulter 2007). Un grand nombre de cibles peuvent être amplifiées simultanément, c'est l'amplification en multiplex. Une dizaine de cibles présentant des conditions d'amplifications similaires et des fragments amplifiés de tailles différentes peuvent être lues sur un même électrophorégramme.

7.3. Les cibles étudiées pour le génotypage d'*E. multilocularis*

7.3.1. ADN total

La technique d'empreinte génétique a été employée pour étudier la diversité génétique d'isolats d'*E. multilocularis* de l'île endémique d'Hokkaido au Japon (n = 5) et de l'île de Saint Laurent en Alaska (n = 1), prélevés sur des hôtes intermédiaires différents (campagnol roussâtre, cochon, rat de Norvège et campagnol des Toundras) (Okamoto et al. 2007). La sonde (CAC)₅ a été hybridée à l'ADN digérée par deux enzymes. Cette sonde présente un taux de mutation chez l'homme de 0,001 par fragment d'ADN et par gamète (Nurnberg et al. 1989). Une grande homogénéité parmi les profils de fingerprinting a été observée chez les isolats japonais, alors qu'un profil légèrement différent a été trouvé pour l'isolat de l'île de Saint Laurent, indiquant une origine génétique proche entre les parasites de ces deux foyers.

7.3.2. L'ADN mitochondrial et les cibles étudiées pour le génotypage d'*E. multilocularis*

Chez les métazoaires, une mitochondrie possède son propre génome. C'est un ADN circulaire, haploïde, présent en de nombreuses copies dans la cellule. L'ADN mitochondrial (ADNmt) étant transmis par la partie femelle, il n'existe pas de recombinaison possible pour ce génome et la transmission du patrimoine génétique d'une génération à la suivante se fait de manière clonale. L'intérêt majeur de l'étude de l'ADNmt en génétique des populations est le caractère évolutif rapide de ce type d'ADN, par rapport à l'ADN nucléaire codant. D'après l'étude de l'ADNmt chez différents primates (homme, singe rhésus et babouin) un taux de

0,02 substitution par paire de bases et par million d'années a été décrit (Brown et al. 1979). D'autre part le grand nombre de copies de l'ADNmt confère une haute sensibilité à la PCR et permet d'obtenir des amplifications à partir de faibles quantités de matériel génétique.

Le génome mitochondrial d'*E. multilocularis* a été totalement séquencé par Fukunaga en 1998 (N° d'accès GenBank : AB018440) à partir de lésions parasitaires prélevées chez le campagnol de Sundevall (*Clethrionomys rufocanus*), originaire de l'île d'Hokkaido. Il comprend 13738 paires de bases et comprend 36 gènes, dont 12 codants pour des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative (ATPase sous-unité 6 (*ATP6*), cytochrome *b* (*Cyb*), cytochrome oxydase *c* sous-unités 1 à 3 (*Cox1-3*) et la NADH deshydrogénase sous-unités 1 à 6 et 4L (*ND1-6* et *4L*), 2 codants pour la synthèse d'ARN ribosomiaux et 22 codants pour la synthèse d'ARN de transfert. Les gènes sont arrangés de manière compacte sans intron et avec peu de nucléotides intergéniques. Ces gènes sont tous transcrits dans le même sens. Deux régions non codantes ont été décrites (Nakao et al. 2002b).

Le taux d'évolution relativement rapide de l'ADNmt en fait un outil de choix pour les études phylogénétiques. Du fait de son caractère haploïde, les génotypes sont appelés haplotypes.

Parmi les gènes de l'ADNmt, les séquences nucléotidiques des trois gènes *cox1*, *nd1* et *atp6* sont couramment étudiées pour le génotypage du parasite (Kedra et al. 2000; McManus 2006; Okamoto et al. 2007; Yang et al. 2005).

Deux haplotypes M1 et M2 ont été décrits chez *E. multilocularis*, comprenant respectivement 2 nucléotides différents pour une partie de la séquence Cox1 de 366 pb, et 2 nucléotides différents pour une partie de la séquence ND1 de 471 pb, (Bowles et al. 1992; Bowles & McManus 1993). L'haplotype M1 a été décrit pour des isolats d'Alaska, de Chine, d'Amérique du Nord (Bowles et al. 1992 ; Bowles & McManus 1993), de Suisse, de l'île de Saint Laurent, du Canada, du Japon, de France et d'Allemagne (Haag et al. 1997). Le variant M2 a été initialement trouvé chez un isolat allemand (Bowles et al. 1992). Des micro-variants supplémentaires ont été décrits en Pologne chez des vers adultes de renards, par l'étude de la cible ND1 (Kedra et al. 2000), et en France (lésion chez le sanglier) et en Slovaquie (vers adultes de renards) par l'étude de Cox1 (Boucher et al. 2005; Snabel et al. 2006). Cependant l'existence de ces variants ne peut pas être expliquée par l'isolement géographique. En effet des échantillons polonais et japonais peuvent présenter la même séquence M1 et apparaître plus proches génétiquement que certains isolats originaires de régions voisines.

L'étude de la cible ATP6 a permis de mettre en évidence d'importantes variations chez deux isolats chinois provenant d'une lésion humaine (province du Ningxia) et d'un rongeur (province du Gansu) présentant respectivement 5 et 2 nucléotides différents de l'haplotype M1 (Yang et al. 2005).

L'étude de l'ADN mitochondrial chez *E. multilocularis* révèle un polymorphisme différent selon la cible étudiée. La cible ATP6 semble être la plus polymorphe parmi les gènes mitochondriaux étudiés sur un panel d'helminthes (Nakao et al. 2007).

Le niveau d'information génétique apporté par l'étude de l'ADNmt reste limité et ne permet pas son emploi pour le génotypage d'isolats à une échelle géographique locale ou régionale. En revanche, son emploi en diagnostic permet de détecter spécifiquement le parasite quelque soit son origine géographique.

7.3.3. L'ADN nucléaire

Le génome nucléaire d'*Echinococcus multilocularis* est diploïde et comprend 9 paires de chromosomes ($2n = 18$) (Rausch & Rausch 1981). Le génome du parasite a été récemment séquencé à partir de l'isolat allemand H59 (<http://www.sanger.ac.uk/Projects/Echinococcus/>) et a été estimé par cytométrie de flux à 270 millions de paires de bases. Cette banque de données réunit des régions codantes et non codantes de l'ADN du parasite. Le séquençage du génome du parasite a été réalisé par la technique de pyroséquençage.

7.3.3.1. Les cibles d'ADN nucléaires simple-locus

Les séquences nucléotidiques du gène codant pour l'antigène B (AgB/1) et des introns non-codants ActII et Hbx2 (da Silva et al. 1993; Vispo & Ehrlich 1994) ont été étudiées par la technique de PCR-SSCP (Haag et al. 1997), sur un panel de souches provenant de différents foyers de l'hémisphère nord (Suisse, France, Alaska (Ile Saint Laurent), Canada et Japon). Seule la cible non-codante Hbx2 a permis de détecter une délétion et une transversion dans la séquence étudiée. Ces mutations ont conduit à distinguer les isolats de l'Ile de Saint Laurent (Alaska) du reste du panel.

L'étude de cibles nucléaires a permis de déterminer le temps de divergence de l'espèce *E. multilocularis* par comparaison à *E. granulosus*. En considérant que le taux de substitution est

constant chez une espèce donnée et que la population de parasites connaît une expansion après la colonisation d'un nouvel hôte, la diversité en nucléotides peut être employée comme un indicateur du temps de divergence (Rogers & Jorde 1995). Ce temps peut être calculé par la formule $T = \pi/2\lambda$ où π est la diversité en nucléotides et λ la moyenne du taux de substitution par million d'années, estimée pour les cibles introns à $\lambda = 3,7.10^{-9}$ (Nei 1987). D'après l'étude des cibles ActII et Hbx2, la séparation d'*E. multilocularis multilocularis* et d'*E. multilocularis sibiricensis* daterait de 0,1 M.A., alors que la divergence entre *E. granulosus sensu stricto* et *E. canadensis* daterait de 0,6 M.A. (Haag et al. 1997).

7.3.3.2. L'ADN nucléaire multilocus

7.3.3.2.1. L'ADN ribosomal

L'ADN ribosomal (ADNr) des eucaryotes fait partie de la famille des multigènes. Il est composé de séquences d'unités répétées en tandem. Chaque unité comprend les gènes codants les sous-unités ribosomales 18S, 5,8S et 28S. Des séquences appelées espaceurs ou régions inter-géniques séparent ces parties codantes. Du point de vue évolutif ces unités répétées se dupliquent de manière coordonnée au sein d'une même espèce, provoquant une homogénéisation entre séquences inter-géniques et de manière indépendante entre espèces. Ce processus, appelé évolution concertée conduit à la détection de caractères homologues entre les individus d'une même espèce et de variations entre espèces différentes (Gerbi 1986).

L'étude des deux régions inter-géniques ITS-1 et ITS-2 (*Internal Transcribed Spacer*) a permis d'étudier la diversité génétique du genre *Echinococcus*. Pour *E. multilocularis*, la comparaison de séquences ITS-1 entre un isolat d'Alaska et un isolat eurasiatique a mis en évidence une variation de composition nucléotidique de 11,8% (110/935 pb), alors que la comparaison de ces séquences ITS-1 pour des isolats d'*E. granulosus* montrait une variation de 13,8% (van Herwerden et al. 2000). D'après Gasser, chez *Echinococcus* les mécanismes d'évolution de ces unités répétées n'aurait pas le même processus que celui décrit chez certains invertébrés (Gasser et al. 1998). La présence des unités répétées d'ADNr à différents loci du génome du parasite pourrait conduire à l'évolution par divergence de ces séquences qui ne seraient alors pas sujettes au processus d'homogénéisation et conduirait à l'appariation de variants chez les différentes espèces. Cependant, cette étude a été menée sur seulement 2

isolats, ce qui peut mettre en doute la crédibilité de ces résultats. En effet, cette étude contraste avec d'autres investigations portant sur les cibles ITS-1 et ITS-2. Un panel de 13 échantillons d'Allemagne (n = 9), du Japon (n = 1) et d'Alaska (n = 3) a été étudié par le séquençage des cibles ITS-1 et ITS-2 (Rinder et al. 1997). Seule une substitution A/G a été détectée (1/1295 pb) entre, d'une part les échantillons allemands et Japonais et d'autre part les isolats d'Alaska. Le résultat pourrait appuyer la distinction faite par Rausch et Schiller entre *E. multilocularis sibiricensis* d'Amérique du Nord et *E. multilocularis multilocularis* d'origine eurasiatique (Rausch & Schiller 1954).

Une étude par PCR-RFLP de la séquence ITS-2, portant sur de nombreux cestodes de différentes origines géographiques, dont 5 appartenaient à *E. multilocularis* (Allemagne, n = 1 ; Suisse, n = 3 ; Ile de Saint Laurent (Alaska, Etats-Unis), n = 1) a révélé une grande homogénéité de séquences entre les différentes espèces (Gasser & Chilton 1995).

7.3.3.2.2. L'ADN microsatellite

Les microsatellites sont des séquences d'ADN nucléaire, composées de motifs répétés en tandem de 1 à 6 nucléotides. La présence de microsatellites a été retrouvée chez la plupart des organismes étudiés et ceux-ci semblent être distribués de manière assez uniforme dans le génome eucaryote. Les microsatellites sont des séquences d'évolution généralement neutre qui peuvent occuper une grande proportion du génome, essentiellement des organismes eucaryotes. Chez l'homme les microsatellites représentent 3 % du génome et plus d'un million de loci. Des motifs de 1 à 6 nucléotides évoluent dans le temps en extension ou en contraction. Le nombre minimal de motifs répétés pour considérer un microsatellite reste de définition difficile. La connaissance des mécanismes conduisant à la naissance d'un microsatellite ainsi que le taux de mutation est un caractère essentiel à connaître pour l'étude de ces séquences. La genèse d'une séquence microsatellite résulte essentiellement dans l'apparition d'erreurs lors de leur duplication par l'ADN polymérase. Si l'on considère la séquence suivante GTATGT, la substitution de A par G produit la séquence GTGTGT, alors considérée comme un microsatellite de motif GT, répété 3 fois et le futur siège de l'expansion d'un microsatellite. Différents mécanismes permettraient l'extension du microsatellite. Lors de l'élongation, l'apparition de boucles au niveau du brin néoformé peut conduire à l'insertion d'unités supplémentaires et au décalage du cadre de lecture. L'apparition de boucles sur le brin matrice est possible mais les mécanismes de réparation élimineraient la mutation. Des

pauses lors de la réplication peuvent être observées, elles conduisent à la formation des bandes de bégayements visibles sur un électrophorégramme, généralement plus courtes que l'allèle principal. Leur taille est alors un multiple de l'unité répétée. Cependant les processus mutationnels sont hétérogènes selon les loci, les motifs répétés et les organismes considérés. Ceci pourrait être expliqué par la localisation du microsatellite dans l'ADN (sous représentation dans les régions codantes et au niveau des télomères), l'existence de gène de transversion à leur proximité, de points de mutation ou de recombinaison. Plus le motif répété est complexe plus le taux de mutation sera important. Les séquences flanquantes influenceraient également l'apparition des mutations dans les séquences microsatellites (Ellegren 2004).

Le grand intérêt de l'étude de l'ADN microsatellite réside dans le haut polymorphisme de ces séquences, qui peuvent varier d'un individu à un autre. En effet le taux de mutation par génération de ce type d'ADN est particulièrement important. Selon les organismes, le taux de mutation serait de 6.10^{-6} événements par locus et par génération chez *Drosophila* sp., pour atteindre un taux de 0,02 chez *Escherichia coli* (Hancock 1999).

Le gène U1 ARNsn – impliqué dans l'épissage de l'ARN – appartient à la famille des gènes multilocus. Il est répété en tandem dans l'ADN des eucaryotes et espacé par des séquences microsatellites de motifs pentamériques (GCGAG) répétées en tandem une cinquantaine de fois dans le génome. Ces séquences microsatellites, espaceurs du gène U1 ARNsn ont été étudiées chez *E. multilocularis* (Bretagne et al. 1996; Bretagne et al. 1991). Elles présentent un polymorphisme dû à un nombre de répétitions variable du motif pentamérique. Une amplification par PCR, suivie d'une analyse de taille permet d'étudier les profils électrophorétiques de ce microsatellite multilocus. Plusieurs pics ou allèles sont alors détectés sur l'électrophorégramme. L'étude menée par Bretagne et al. (1996) a porté sur un panel de 41 échantillons (lésions métacestodes et vers adultes) provenant d'Europe (n = 30), d'Amérique du Nord (Alaska et Montana) (n = 8) et du Japon (n = 3). Trois profils ont été décrits. Un profil A représentait les échantillons européens, un profil B a été trouvé en commun entre les échantillons japonais et d'Alaska et un profil C retrouvé parmi les échantillons nord-américains. Ces résultats soulignent l'intérêt de l'étude des séquences microsatellites dans la recherche de polymorphisme chez *E. multilocularis* et permettent de mettre en évidence l'existence de liens génétiques plausibles entre les parasites d'Alaska et du

Japon. Cependant l'étude de ce microsatellite multilocus n'a pas permis d'établir une discrimination entre des isolats provenant d'un même foyer.

La diversité génétique du parasite dans le foyer de l'île d'Hokkaido a été étudiée à l'aide de séquences microsatellites caractérisées à partir d'une banque d'ADN génomique d'*E. multilocularis*. Deux microsatellites simple-locus ont été étudiés : EMms1 (N° d'accès Genbank AB100031) et EMms2 (AB100032) (Nakao et al. 2003). Ces microsatellites dits simple-locus, car uniques dans le génome d'*E. multilocularis* présentaient des motifs de trinuécléotides, cinq pour EMms1 [(CAC)_k (CGC)_l (CAC)_m (TAC)_n (TAT)_o] et un pour EMms2 [(CAC)_p]. Un panel de 104 échantillons, provenant de 13 renards autopsiés (8 vers isolés par renard) a mis en évidence quatre allèles pour EMms1 et 2 allèles pour EMms2. Des vers au profil identique ont été observés chez des renards différents, alors que des infections mixtes, comprenant au moins 2 génotypes co-existant chez un même hôte ont été mises en évidence chez 5 renards. Ce phénomène peut être expliqué par une intense activité de chasse de rongeurs parasités et à l'accumulation de vers de génotypes différents. Des taux d'hétérozygotie ont été observés à 10,6 % et 7,7 % respectivement pour EMms1 et EMms2, évoquant une possible recombinaison génétique entre des parasites de génotypes distincts. Enfin, cette étude menée dans le foyer endémique d'Hokkaido n'a pas permis d'établir de corrélation entre les fréquences alléliques observées et la localisation géographique des isolats.

7.4. Application au diagnostic moléculaire

L'étude des cibles d'ADN nucléaires et mitochondriales peut également être appliquée à la recherche du parasite dans différents prélèvements biologiques et permettre son identification en complément du diagnostic morphologique (OIE 2004).

La détection moléculaire du parasite dans le matériel biologique issu du grattage intestinal du renard (Deplazes & Eckert 1996) ou dans le matériel coprologique (Dinkel et al. 1998; Monnier et al. 1996) a été récemment développée pour mettre au point des techniques de

détection spécifiques du parasite, en vue de réaliser des programmes de contrôle efficaces (Mathis & Deplazes 2006). En effet la simplicité et le gain de temps qu'offre ce diagnostic en font un complément ou une alternative au diagnostic morphologique (Thompson & McManus 2001) et immunologique (Fraser et al. 2002).

Le copro-diagnostic se base sur la reconnaissance d'œufs de ténias très semblables morphologiquement. L'autopsie quant à elle est fastidieuse, nécessite des mesures d'hygiène strictes et est consommatrice de temps. L'amélioration de la sensibilité des techniques de détection et la possibilité d'une alternative à l'autopsie passe donc par le développement d'outils moléculaires hautement sensibles et spécifiques (Craig et al. 2003).

Les techniques sérologiques (e.g. ELISA), ne sont pas détaillées ici. Il est à noter que ces techniques peuvent constituer un test de dépistage en amont de la démarche de diagnostic moléculaire, particulièrement pour des études portant sur un grand nombre d'échantillons collectés dans des zones de basses endémies (Craig et al. 2003; Mathis & Deplazes 2006).

7.4.1. Détection du parasite à partir de grattages intestinaux

Cette démarche diagnostique est réalisée dans le but d'étudier la faune helminthique présente chez les carnivores sauvages et d'évaluer les charges parasitaires par comptage des individus. Ces analyses procurent des données permettant d'évaluer les risques de contamination pour l'homme.

Le diagnostic d'espèce parasitaire après autopsie est encore très largement basé sur les critères morphologiques (WHO/OIE 2001). Néanmoins, la biologie moléculaire apporte une solution efficace en terme d'identification.

L'étude de la séquence nucléaire pAL1 (Vogel et al. 1990) a permis de mettre en évidence deux cibles d'intérêt pour le diagnostic du parasite et d'autres cestodes (Gottstein & Mowatt 1991). Les amorces BG1 et BG2, définies à partir de la séquence pAL1 amplifiaient un fragment de 2,6 kb spécifique d'*E. multilocularis*, de 0,55 kb pour *Taenia saginata* et de 0,6 kb pour *T. taeniformis*, mais aucune amplification n'a été possible pour *E. granulosus*. La séquence BG1/2 semble être très conservée chez *E. multilocularis*, quelle que soit la provenance géographique des isolats. Les amorces BG1 et BG3 ont permis une amplification spécifique du genre *Echinococcus* avec un fragment détecté de 0,3 kb. De plus, des isolats

suisses et d'Alaska présentaient des séquences nucléotidiques identiques. La sensibilité de ces cibles a été définie à 50 pg d'ADN. L'intérêt de ces cibles est majeur pour (1) l'identification chez le patient du parasite issu d'une pièce opératoire et pour lequel se pose un problème de diagnostic, (2) le diagnostic chez le rongeur pour des études épidémiologiques et (3) la confirmation de l'identification de vers adultes prélevés sur la muqueuse intestinale de l'HD.

7.4.2. Détection de copro-ADN

La détection de l'ADN du parasite dans les fèces de carnivores permet d'évaluer la contamination environnementale et le risque de transmission au rongeur et à l'homme.

La séquence U1 ARNsn a été utilisée pour détecter l'ADN de l'œuf du parasite dans les fèces de l'HD (Bretagne et al. 1993). Sa haute sensibilité (1 œuf détecté dans 4 g de fèces) et sa haute spécificité (100 %, pas d'amplification chez les autres ténias) en font un outil de choix pour le copro-diagnostic du parasite.

La séquence du gène mitochondrial codant pour la sous-unité ribosomale ARNr 12S a été étudiée par PCR-nichée en vue d'augmenter la sensibilité de la technique (Dinkel et al. 1998). La spécificité atteignait là aussi 100% avec une sensibilité identique (1 œuf détecté). Cette méthode a été optimisée pour être réalisée dans un seul tube réactionnel (van der Giessen et al. 1999).

Une PCR multiplex a été élaborée à partir des cibles mitochondriales ND1, Cox1 et de la séquence codant pour la petite sous-unité de l'ARNr *rrnS*. Cette technique a été mise au point pour détecter la présence mixte de différents œufs de ténias, dont *E. multilocularis* dans les fèces de carnivores (chien domestique et chien viverrin) (Trachsel et al. 2007). Des amorces spécifiques de la classe des Cestodes, des espèces *E. multilocularis* et *E. granulosus*, ainsi que du genre *Taenia* spp. ont été conçues pour permettre l'amplification de fragments de tailles spécifiques. Après séparation électrophorétique, les produits d'amplification de l'ADN d'*E. multilocularis* ont été nettement distingués de l'ADN de *Taenia* spp. et d'*E. granulosus*.

Une étude portant sur le gène mitochondrial codant pour l'ARNr 12S a comparé la sensibilité de la méthode de copro-PCR avec l'estimation de la charge parasitaire du renard après

autopsie (Dinkel et al. 1998). La sensibilité de la copro-PCR a été testée sur le contenu rectal de 250 renards allemands. La charge parasitaire influait nettement sur la sensibilité de la méthode de corpo-diagnostic (1-10 vers : 78% de sensibilité ; >1000 vers : 100% de sensibilité).

Ces techniques permettent la mise en œuvre d'études à grande échelle, incluant une quantité importante d'échantillons à traiter. L'étape la plus délicate de cette approche réside dans l'extraction de l'ADN à partir de matériel comprenant de nombreux inhibiteurs de la PCR (Moreira 1998). Le perfectionnement des trousse commercialisées pour l'extraction de l'ADN à partir de matériel fécal a permis d'améliorer cette démarche diagnostique (Mathis & Deplazes 2006).

7.4.3. Diagnostic parasitaire au stade larvaire chez l'homme et d'autres HI

Le diagnostic peut être fait à partir de matériel parasitaire issu de pièces opératoires humaines pour lesquelles l'examen anatomopathologique pose un problème (lésions extra-hépatiques ou atypiques) ou avec un tableau clinique difficile (diagnostic immunologique négatif). Le diagnostic moléculaire peut avoir une place de choix dans la détection du parasite et ne nécessite que de faibles quantités d'ADN. L'identification moléculaire du parasite à partir de cibles nucléaires et mitochondriales est aussi une étape décisive dans l'évaluation du mode de circulation d'*E. multilocularis* atteignant l'homme (Ito et al. 2007), par la recherche de variants génétiques.

Lors d'études rétrospectives sur le matériel parasitaire fixé à l'aide de paraffine, l'ADNmt apparaît comme un marqueur pertinent pour la détection du parasite. Lors d'une extraction d'ADN totale, ce matériel étant disponible en de très nombreuses copies, la détection de l'ADNmt est alors possible même sur du matériel génétique altéré (Schneider et al. 2007). Cette qualité pourrait être également retrouvée pour l'ADN microsatellite multilocus comme on l'a vu pour la cible U1 ARNs (Bretagne et al. 1996).

8. Les qualités des marqueurs moléculaires

Le choix de l'outil moléculaire est un élément déterminant dans la détection et l'identification d'un agent pathogène. Un marqueur moléculaire doit alors présenter différentes qualités : **sensibilité** (détection à partir de faibles quantités d'ADN), **spécificité** (amplification de l'ADN de l'espèce ciblée, pas de réactions d'amplification croisées avec d'autres espèces, qui réside essentiellement dans le choix de la cible et des amorces définies pour son amplification), **reproductibilité** (son analyse doit pouvoir être réitérée dans d'autres laboratoires), **répétabilité** (un même opérateur doit obtenir les mêmes résultats lors d'expériences espacées dans le temps), **pouvoir discriminant** (polymorphisme de la séquence d'ADN adapté au génotypage de l'organisme étudié et à la question posée) **stabilité dans le temps** (horloge moléculaire de la cible compatible avec des études spatio-temporelles).

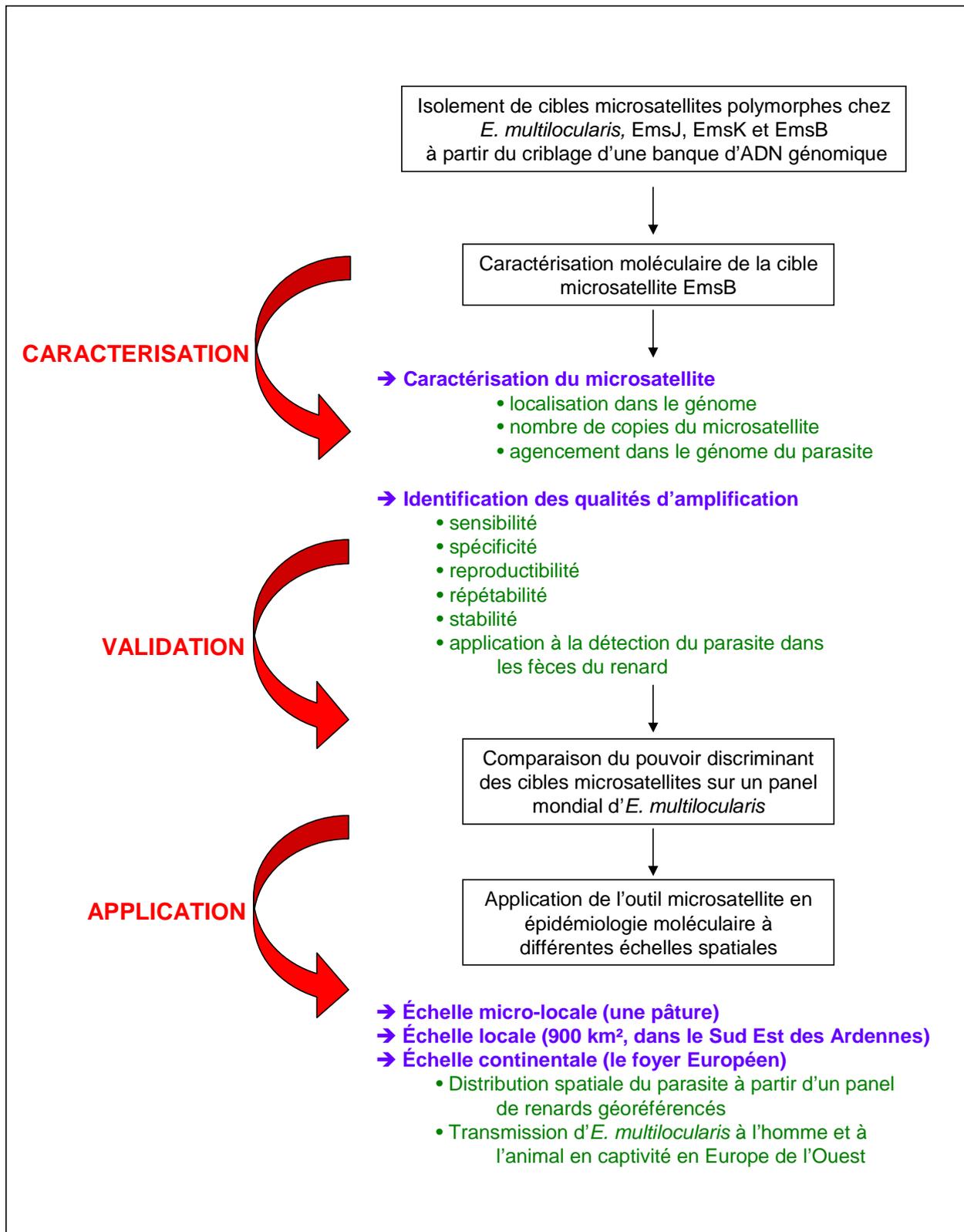
9. Problématique et objectifs de travail

Cet ensemble de séquences d'ADN étudiées et de techniques de biologie moléculaire déployées pour le génotypage d'*E. multilocularis* ne permet en réalité de n'atteindre qu'un faible niveau d'information génétique chez cette espèce. L'étude de la distribution spatiale du parasite et la compréhension des facteurs ayant conduit à cette disparité épidémiologique entre les foyers endémiques de l'hémisphère nord, nécessite de disposer d'outils moléculaires de pouvoir discriminant supérieur. Jusqu'à présent, seules les séquences microsatellites ont présenté le plus grand pouvoir discriminant. C'est pourquoi elles ont été retenues dans notre étude pour définir de nouvelles cibles permettant d'atteindre un niveau de discrimination suffisant pour décrire la diversité génétique du parasite à différentes échelles spatiales.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont été menés dans le but de caractériser et de valider des outils de biologie moléculaire nécessaires à l'étude de la diversité génétique chez *E. multilocularis*, réunissant toutes les qualités décrites plus haut. La recherche de marqueurs génétiques à haut pouvoir discriminant a été débutée dans le cadre des travaux de thèse du Dr Jean-Mathieu Bart sur l'ADN microsatellite. Ce travail lui fait directement suite. Une banque d'ADN génomique a été réalisée à partir du parasite *E. granulosus* pour rechercher de nouvelles cibles microsatellites. Les microsatellites caractérisés ont été testés sur le parasite *E. multilocularis*. Trois d'entre eux, nommés EmsJ, EmsK et EmsB ont présenté un important polymorphisme. EmsB a été caractérisé comme une cible multilocus. Ce microsatellite présentait un profil électrophorétique complexe, qui a été caractérisé au cours de ce présent travail. Son application pour le génotypage d'*E. multilocularis* a alors été considérée. Cet outil a été appliqué à l'étude du foyer européen à différentes échelles géographiques pour décrire la dynamique spatiale du parasite et son mode de dispersion.

Ces travaux de thèse ont conduit à la publication de trois articles dans des revues internationales. Ces publications sont disponibles dans les **Annexes** de ce mémoire. Un quatrième article est actuellement en cours de préparation.

MATERIEL et METHODES



Présentation de la méthodologie

1. Sélection des cibles microsatellites

En amont de ce travail de thèse, une banque d'ADN génomique avait été réalisée. Le but de ce travail était de définir de nouvelles cibles microsatellites exploitables pour l'étude de la diversité génétique du cestode *E. multilocularis*. A l'issue du criblage de la banque d'ADN génomique, 17 microsatellites avaient été isolés. L'étude du polymorphisme de chacune des cibles chez *E. multilocularis* a permis de mettre en évidence 3 marqueurs intéressants : EmsJ, EmsK, présentant des profils électrophorétiques simples (1 ou 2 allèles trouvés en analyse de fragments) et considérés comme des microsatellites simple-locus, et EmsB présentant en analyse de fragments un profil électrophorétique complexe, constitué de plusieurs pics de fluorescence, séparés de 2 pb chacun.

Les différentes étapes ayant conduit à l'identification de ces nouveaux microsatellites sont résumées ci-dessous. Pour plus de détails, il est possible de se référer à la Thèse de J.M. Bart (Bart 2004).

1.1. Réalisation d'une banque d'ADN génomique à partir de protoscolex d'*E. granulosus* pour la recherche de cibles microsatellites

L'ADN génomique a été extrait à partir de protoscolex d'*E. granulosus sensu stricto* (souche G1) pour éviter une contamination de l'extrait par l'ADN de l'hôte. Le protocole d'extraction est présenté dans l'**encadré 1**.

Encadré 1 : Protocole d'extraction de l'ADN du parasite :

L'ADN total du parasite est extrait grâce à la trousse d'extraction High Pure PCR Preparation (Roche, Mannheim, Allemagne).

Après isolation de la lésion ou du ver adulte gravide, 25 à 50 mg de tissu parasitaire ou le cestode entier sont incubés 1 h à 55 °C en présence de 200 µl de tampon de lyse tissulaire et 40 µl de protéinase K, puis pendant 10 min à 72 °C en présence de 100 µl de tampon de liaison. La préparation est mélangée à 100 µl de solution d'isopropanol, puis transférée dans une colonne à filtre en silice, combinée à un tube collecteur. Une première centrifugation (1 min à 8000 rpm ou 6800 g) est effectuée pour écarter les solutions précédemment utilisées. L'ADN est alors retenu dans la colonne de silice ; 5 µl de solution IRB (*Inhibition Removal Buffer*) permettant l'élimination d'inhibiteurs de PCR sont déposés sur la colonne avant centrifugation (1 min à 8000 rpm). Deux étapes de lavage sont réalisées avec 500 µl de tampon de lavage, suivies à chaque fois d'une centrifugation (1 min à 8000 rpm). Pour retirer les résidus de solution de lavage, une centrifugation de 10 s à vitesse maximale est réalisée. Les colonnes sont installées sur des tubes de 1,5 ml. L'ADN ainsi purifié est récupéré par une centrifugation (1 min à 8000 rpm) après ajout de 200 µl de solution d'élution préchauffée à 70 °C. L'ADN est stocké à -20 °C jusqu'à utilisation.

1.2. Construction de la bibliothèque de fragments et sélection des microsatellites

Une quantité de 1 µg d'ADN génomique a été digérée par l'enzyme de restriction *Sau3A*. Les fragments d'ADN ont été clonés dans le vecteur plasmidique pUC18 (Yanisch-Perron et al. 1985), lui-même inséré ensuite par transformation dans des bactéries compétentes. Les colonies bactériennes positives, obtenues sur milieu de culture Mueller-Hinton (MH) ont été repiquées, repérées par un code inscrit sur la boîte de culture et conservées à 4 °C pour la suite de la démarche de criblage.

Les colonies positives, comprenant des plasmides recombinés (voir protocole de clonage dans l'**encadré 5**) ont été transférées sur une membrane de nylon. Une hybridation a été réalisée à 45°C dans une solution DIG Easy Hyb, en présence d'une solution de sondes d'oligonucléotides en quantité équivalente [(TC)₁₀, (TG)₁₀, (CAC)₅CA, CT(CCT)₅, CT(ATCT)₆ et (TGTA)₆TG], préparée à l'aide de la trousse DIG Oligonucleotide Tailing (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne). La détection a été réalisée grâce à un anticorps anti-DIG et à un marquage non radioactif au NBT/BCIP, d'après les recommandations du fournisseur (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne).

Les colonies correspondant aux signaux d'hybridation les plus intenses ont été reprises et mises en suspension dans 1 ml d'eau distillée. Cinq microlitres de la solution ont été utilisés comme matrice pour une PCR avec les amorces M13 r/f, présentes sur le plasmide de part et d'autre de la zone de ligature de l'insert. La PCR a été réalisée comme indiquée dans l'**encadré 2** et le **Tableau 3**. Les produits de PCR ont été séquencés en utilisant ces mêmes amorces (voir protocole de séquençage **encadré 3**).

Les fragments contenant au moins 5 répétitions ont été analysés de manière plus approfondie et des couples d'amorces ont été définis dans les régions flanquantes des microsatellites en utilisant le logiciel Primer3 (Rozen & Skaletsky 2000).

A l'issue de ce criblage, 17 microsatellites ont été sélectionnés. Le polymorphisme de chaque cible a été testé sur 2 isolats d'*E. granulosus sensu lato* (isolats *E. granulosus sensu stricto* 539, d'origine algérienne et *E. canadensis* 116, d'origine mauritanienne) et 10 isolats d'*E. multilocularis* (CH1, CH5, 32A, 33F, 36CH, 39CH, 40CH, 41CH, SL1 et CND) (voir **Tableau 4**). Trois microsatellites ont été sélectionnés car présentant un polymorphisme chez *E. multilocularis* : EmsJ (N° GenBank AY680845) de motif répété (CT)_r, EmsK (AY680857) de motif répété (CA)_s, et EmsB (AY680860) présentant 2 motifs répétés (CA)_i(GA)_j.

Tableau 3 : Amorces de séquences étudiées et leurs caractéristiques moléculaires chez *E. multilocularis*

Cibles	Amorces	Séquences des amorces	Taille (pb)	Répétitions	Tm (°C)	Origine de la description
	EmsB A*	5'-GTGTGGATGAGTGTGCCATC-3'	209-241	(CA) _i (GA) _j		(AY680860)
	EmsB C	5'-CCACCTTCCCTACTGCAATC-3'				
EmsB	EmsB Aext	5'-GATGGCACACTCATCCACAC-3'	1 k et 0,2 k		60	au laboratoire
	EmsB Bext	5'-TCACCCCTTTCTTCCTCTT-3'				
	EmsB G	5'-GAGTGCAGTTAGTGTCACTGG-3'	100			au laboratoire
	EmsB H	5'-GATGAGTGTGCCATCCA-3'				
EmsJ	EmsJ A*	5'-GAACGCGCTAACCGATTG-3'	152-155	(CT) _r	54	(AY680845)
	EmsJ B	5'-TTAGGAATGGGAAGGTGTGC-3'				
EmsK	EmsK A*	5'-CAGCTCAAAAGAACCCGAAG-3'	248-250	(CA) _s	54	(AY680857)
	EmsK B	5'-CCAAACTTCCGCTCACTCTG-3'				
NAK1	NAK1 A*	5'-GGTAGCCAATGCTGTGGTTT-3'	189-201	(CAC) _r (CGC) _i (CAC) _m (TAC) _n (TAT) _o	60	Nakao et al., 2003 (AB100031)
	NAK1 B	5'-GCGAGGTCACGCAAATGTAT-3'				
M13	M13f	5'-GTAAAACGACGCCAG-3'	165 (plasmide sans l'insert)	/	55	Trousse TOPO TA cloning (Invitrogen)
	M13r	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'				
ATP6	atp6Em/F	5'-GGTTATTGTGAATGATTTGGTTC-3'	512	/	60	(à partir de AB018440)
	atp6Em/R	5'-AATGATCAATCGAAAAATCCAA-3'				
NAD1	NAD1 A	5'-AGATTCGTAAGGGGGCTAATA-3'	486	/	45	Nakao et al., 2002 (AB018440)
	NAD1 B	5'-ACCACTAACTAATTCCTTTC-5'				
BG1/3	BG 1	5'-TCATTCTGGTCACTCATTGTTACC-3'	300	/	56	Gottstein et al., 1992
	BG 3	5'-AGTAGATATTGGAGGGTACTTGGG-3'				

*amorce marquée par un fluorochrome

Encadré 2 : Protocole d'amplification par PCR :

La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permet d'obtenir une très grande quantité de copies de séquences d'ADN. Elle est utilisée ici pour l'étude du polymorphisme d'*E. multilocularis*. La réaction de PCR nécessite la présence de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP), d'amorces sens et anti-sens, définissant les extrémités du fragment à amplifier, ainsi que de l'ADN polymérase, catalysant l'incorporation des nucléotides au brin en cours de synthèse. Cette technique comprend 3 étapes : la dénaturation (94°C, 30 s), l'hybridation (température selon l'amorce (T_m), 30 s) et l'élongation (72°C, de 30 s à 1 min).

Les réactions de PCR sont réalisées dans un volume final de 25 μ l. Le mélange réactionnel contient 50 μ M d'ADN extrait du parasite, 1 mM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP et dTTP), 12,5 μ M d'amorce sens marquée par un fluorochrome pour les cibles microsatellites (PCR fluorescente) ou 20 μ M d'amorce sens pour les autres cibles, 20 μ M d'amorce anti-sens, 0,5 U d'ADN Polymérase (REDTaq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) au Laboratoire de Parasitologie de Besançon (France), AmpliTaq DNA Polymerase et AmpliTaq GOLD DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA) à l'Institut de Parasitologie de Berne (Suisse)). Les programmes d'amplification se déroulent sur un thermocycleur de type Biometra thermocycleur (Whatman Biometra, Goettingen, Allemagne). Les couples d'amorces utilisés, la température d'hybridation des amorces (T_m) et les tailles des fragments attendus pour chaque cible sont détaillés dans le Tableau 3. Les produits de PCR sont stockés à 4 °C jusqu'à utilisation.

Les produits de PCR sont séparés selon leur taille en paire de bases (pb) sur un gel d'agarose 1,5 % (100 V, 1 h) en présence d'un marqueur de poids moléculaire (PM) (Ladder Bio Fidal 50 bp DNA GeneRuler, Fermentas Inc., Glen Burnie, MD) et révélés après marquage au BET et lecture aux UV pour confirmer l'amplification correcte du fragment étudié.

Tableau 4 : Principales caractéristiques du panel mondial d'échantillons d'*E. multilocularis*. Chaque isolat est donné avec son numéro de code, l'abréviation de l'origine géographique et l'animal hôte (petite lettre pour l'hôte intermédiaire, r: rongeur; h: homme; m: singe (pour *monkey*), et en lettre capitale pour l'hôte définitif, F: renard (pour *fox*)).

Code isolat	Espèce d'hôte	Origine géographique	Année d'isolement
1AL-r	<i>Microtus oeconomus</i>	Alaska (St Lawrence Island)	1996
2AL-r	<i>Microtus oeconomus</i>	Alaska (St Lawrence Island)	1996
3AL-r	<i>Microtus oeconomus</i>	Alaska (St Lawrence Island)	1996
4AL-r	<i>Microtus oeconomus</i>	Alaska (St Lawrence Island)	1996
5AL-r	<i>Microtus oeconomus</i>	Alaska (St Lawrence Island)	1996
6AL-r	<i>Microtus oeconomus</i>	Alaska (St Lawrence Island)	1996
7AL-r	<i>Microtus oeconomus</i>	Alaska (St Lawrence Island)	1996
10AL-r	<i>Microtus oeconomus</i>	Alaska (St Lawrence Island)	1996
11AL-r	<i>Microtus oeconomus</i>	Alaska (St Lawrence Island)	1996
13AL-r	<i>Microtus oeconomus</i>	Alaska (St Lawrence Island)	1996
27AL-h	Homme	Alaska (St Lawrence Island)	1996
38AL-h	Homme	Alaska	1996
SL1-h	Homme	Alaska (St Lawrence Island)	1996
CND-r	Rongeur	Canada	ND ^a
2PRC-r	<i>Microtus limnophilus</i>	Chine (Tibet)	2001
5PRC-r	<i>Microtus limnophilus</i>	Chine (Tibet)	2002
6PRC-r	<i>Microtus limnophilus</i>	Chine (Tibet)	2002
7PRC-r	<i>Microtus limnophilus</i>	Chine (Tibet)	2002
9PRC-r	<i>Cricetulus kamensis</i>	Chine (Tibet)	2002
26J-h	Homme	Japon	ND ^a
E1J-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Japon (Hokkaido)	2005
I3J-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Japon (Hokkaido)	2005
M4J-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Japon (Hokkaido)	2005
N5J-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Japon (Hokkaido)	2005
O4J-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Japon (Hokkaido)	2005
33F-h	Homme	France	ND ^a
R04131-1F-F	<i>Vulpes vulpes</i>	France (Ardenes)	2004
14CH-r	<i>Arvicola terrestris</i>	Suisse (Fribourg)	1995
15CH-r	<i>Arvicola terrestris</i>	Suisse (Fribourg)	1995
16CH-r	<i>Arvicola terrestris</i>	Suisse (Fribourg)	1995
17CH-r	<i>Arvicola terrestris</i>	Suisse (Fribourg)	1995
18CH-r	<i>Arvicola terrestris</i>	Suisse (Fribourg)	1995
19CH-r	<i>Arvicola terrestris</i>	Suisse (Fribourg)	1995
20CH-r	<i>Arvicola terrestris</i>	Suisse (Fribourg)	1995
21CH-r	<i>Arvicola terrestris</i>	Suisse (Fribourg)	1995
22CH-r	<i>Arvicola terrestris</i>	Suisse (Fribourg)	1995
23CH-r	<i>Arvicola terrestris</i>	Suisse (Fribourg)	1995
24CH-r	<i>Arvicola terrestris</i>	Suisse (Fribourg)	1995
36CH-h	Homme	Suisse	1982
37CH-h	Homme	Suisse	1990
39CH-h	Homme	Suisse	1980
40CH-h	Homme	Suisse	1994

Code isolat	Espèce d'hôte	Origine géographique	Année d'isolement
29CH-s	Macaque	Suisse (Zoo de Bâle)	1997
31CH-m	Macaque	Suisse (Zoo de Bâle)	2003
34CH-m	Macaque	Suisse (Zoo de Zürich)	1991
42CH-m	Singe Vervet	Suisse (Zoo de Zürich)	1989
43CH-m	Singe Vervet	Suisse (Zoo de Zürich)	1990
45CH-m	Ouistiti	Suisse (Zoo de Lausanne)	2003
3CH-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Suisse	2001-2003
52CH-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Suisse	2001-2003
64CH-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Suisse	2001-2003
35D-h	Homme	Allemagne	ND ^a
101D-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Allemagne	2001-2003
116D-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Allemagne	2001-2003
121D-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Allemagne	2001-2003
126D-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Allemagne	2001-2003
141D-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Allemagne	2001-2003
32A-h	Homme	Autriche	1986
209A-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Autriche	2001-2003
278A-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Autriche	2001-2003
287A-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Autriche	2001-2003
302PL-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Pologne	2001-2003
310PL-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Pologne	2001-2003
315PL-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Pologne	2001-2003
392PL-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Pologne	2001-2003
525CZ-F	<i>Vulpes vulpes</i>	République Tchèque	2001-2003
535CZ-F	<i>Vulpes vulpes</i>	République Tchèque	2001-2003
559CZ-F	<i>Vulpes vulpes</i>	République Tchèque	2001-2003
425SK-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Slovaquie	2001-2003
435SK-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Slovaquie	2001-2003
480SK-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Slovaquie	2001-2003
402NL-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Pays-Bas	2001-2003
420NL-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Pays-Bas	2001-2003
500	<i>Meriones unguiculatus</i>	France ^b	Mars 1991
501	<i>Meriones unguiculatus</i>	France ^b	Mai 1991
502	<i>Meriones unguiculatus</i>	France ^b	Février 1992

^a ND, non documenté.

^b Isolats de la souche F AUB-2 maintenue *in vivo* au laboratoire par des passages successifs chez *Meriones unguiculatus*.

Encadré 3 : Protocole de séquençage :

La technique de séquençage permet de connaître la succession de nucléotides composant une séquence d'ADN. Son obtention repose sur la méthode Sanger ou *chain termination method* (Sanger et al. 1977). Une réaction de PCR est réalisée en présence de dNTP et de ddNTP (didésoxyribonucléotides triphosphates), ces derniers étant marqués par un fluorochrome et tronqués du groupement hydroxyle en 3'. L'ADN polymérase incorpore de manière aléatoire des nucléotides classiques et des nucléotides marqués. L'élongation est stoppée lorsqu'un ddNTP est ajouté au fragment en cours d'élongation. Tous les fragments synthétisés sont séparés en fonction de leur taille, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Une lecture par colorimétrie détecte chaque fragment marqué par un fluorochrome spécifique pour chacune des 4 bases de l'ADN et un logiciel reconstitue la succession des nucléotides de la séquence.

Une PCR classique est réalisée dans un premier temps et les produits sont purifiés grâce à la trousse ExoSAP-IT (Amersham pharmacia biotech Europe, Orsay, France), comprenant deux enzymes : l'Exonucléase I et la Shrimp Alkaline Phosphatase qui dégradent les amorces en excès et l'ADN simple brin et hydrolysent les dNTP non incorporés. Les enzymes étant actives à 37 °C, le mélange est réalisé dans la glace ; 2 µl d'ExoSAP-IT sont ajoutés à 5 µl de produit de PCR. Le mélange est alors placé dans un thermocycleur pour un programme réactionnel de 15 min à 37 °C et 15 min à 80 °C pour désactiver le couple d'enzymes.

Dans un tube réactionnel et pour un volume final de 10 µl, 3,5 µl de matrice d'ADN (produits de PCR purifiés) sont additionnés à 2,5 µl d'une seule amorce (20 µM) et 2 µl de prémix, comprenant le tampon, les dNTP, les ddNTP et l'ADN polymérase (DTCS Quick Start Master Mix, Beckman Coulter, Fullerton, CA). Le programme de PCR de séquençage compte 40 cycles, comprenant 3 étapes : 20 s à 96 °C, 20 s à 50 °C et 4 min à 60 °C. Les produits de séquençage sont stockés à -20°C avant l'étape de purification.

Les produits sont purifiés par précipitation à l'éthanol. Sont ajoutés aux 10 µl de produits de séquençage 2 µl de la solution acétate-EDTA, 0,5 µl de glycogène, permettant la visualisation du culot d'ADN après l'étape de précipitation réalisée avec 40 µl d'éthanol 95 % (v/v). Le mélange est agité vigoureusement à l'aide d'un vortex, puis placé 15 min dans la glace. Après une première centrifugation, (15 min à 13000 rpm ou 10000 g), le surnageant est retiré à l'aide d'une pompe à vide. Une seconde centrifugation (5 min à 13000 rpm) est effectuée après l'ajout de 100 µl d'éthanol 70 % (v/v). Le surnageant est retiré comme précédemment. Les résidus d'alcool sont évaporés à l'aide d'une pompe à vide couplée à une centrifugeuse de type Speed Vac (ThermoSavant, New York, NYC) pendant 2 min. Les échantillons ainsi séchés sont conservés à 4 °C pour une période maximale de 15 jours.

Les produits de séquençage purifiés sont remis en suspension dans 40 µl de formamide désionisé (solution SLS). L'automate Beckman CEQ 8000 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) est utilisé pour réaliser la migration des produits de séquençage. Suite à la migration des produits, des électrophorégrammes sont obtenus grâce au logiciel Genetic Analysis System 8.0.5. Chaque pic de fluorescence est converti en nucléotide par le logiciel, permettant de reconstituer la séquence nucléotidique.

Pour une cible donnée, les électrophorégrammes obtenus avec une amorce sont comparés avec ceux de l'amorce complémentaire grâce au logiciel BioEdit (Hall 1999) de manière à lever toute ambiguïté due à la technique (e.g. deux bases présentes à la même position sur l'électrophorégramme).

Le séquençage est utilisé pour (i) caractériser le polymorphisme de taille des fragments microsatellites et pour (ii) identifier l'ADN amplifié des organismes étudiés en comparant les séquences ainsi obtenues avec la base de données génétiques GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2. Caractérisation de la cible

EmsB

2.1. Conditions d'amplification et de lecture

Le microsatellite EmsB a été amplifié par PCR en utilisant les amorces EmsB A/C (**Figure 5**) selon le protocole indiqué dans l'**encadré 2** et les conditions exposées dans le **Tableau 3**. Les produits de PCR ont été étudiés par analyse de fragments (voir protocole dans l'**encadré 4**). La séparation des produits de PCR par migration sur un gel de polyacrylamide et la lecture des signaux de fluorescence ont été réalisées dans deux laboratoires différents, sur les automates ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA) au Département de Recherches Cliniques de Berne (Suisse) et Beckman CEQ 8000 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) au Laboratoire de Biochimie de Besançon (France). Pour chaque appareil, des profils électrophorétiques ont été obtenus grâce au logiciel Genotyper 3.7 pour l'automate Applied Biosystems et Genetic Analysis System 8.0.5 pour l'automate Beckman Coulter.

Les profils électrophorétiques d'EmsB sont constitués de séries de pics de fluorescence espacés de 2 pb. Les premiers résultats d'analyse de fragments de la cible EmsB obtenus après l'isolement des microsatellites sont exposés dans la **Figure 6**. La taille en pb de chaque pic de fluorescence du profil est relevée, ainsi que la hauteur de chaque pic (dans l'unité de fluorescence des automates). Afin de s'affranchir des variations d'amplitude des pics d'une manipulation à l'autre, la hauteur de chaque pic est ensuite recalculée en effectuant le rapport entre la hauteur du pic et la somme de l'ensemble des hauteurs des pics composant le profil électrophorétique. La somme des pics pondérés est égale à 1.

Lors du séquençage, le fragment microsatellite EmsB était lue indifféremment (CA)_i (GA)_j ou (CT)_j (GT)_i selon l'amorce EmsB A ou C utilisée.

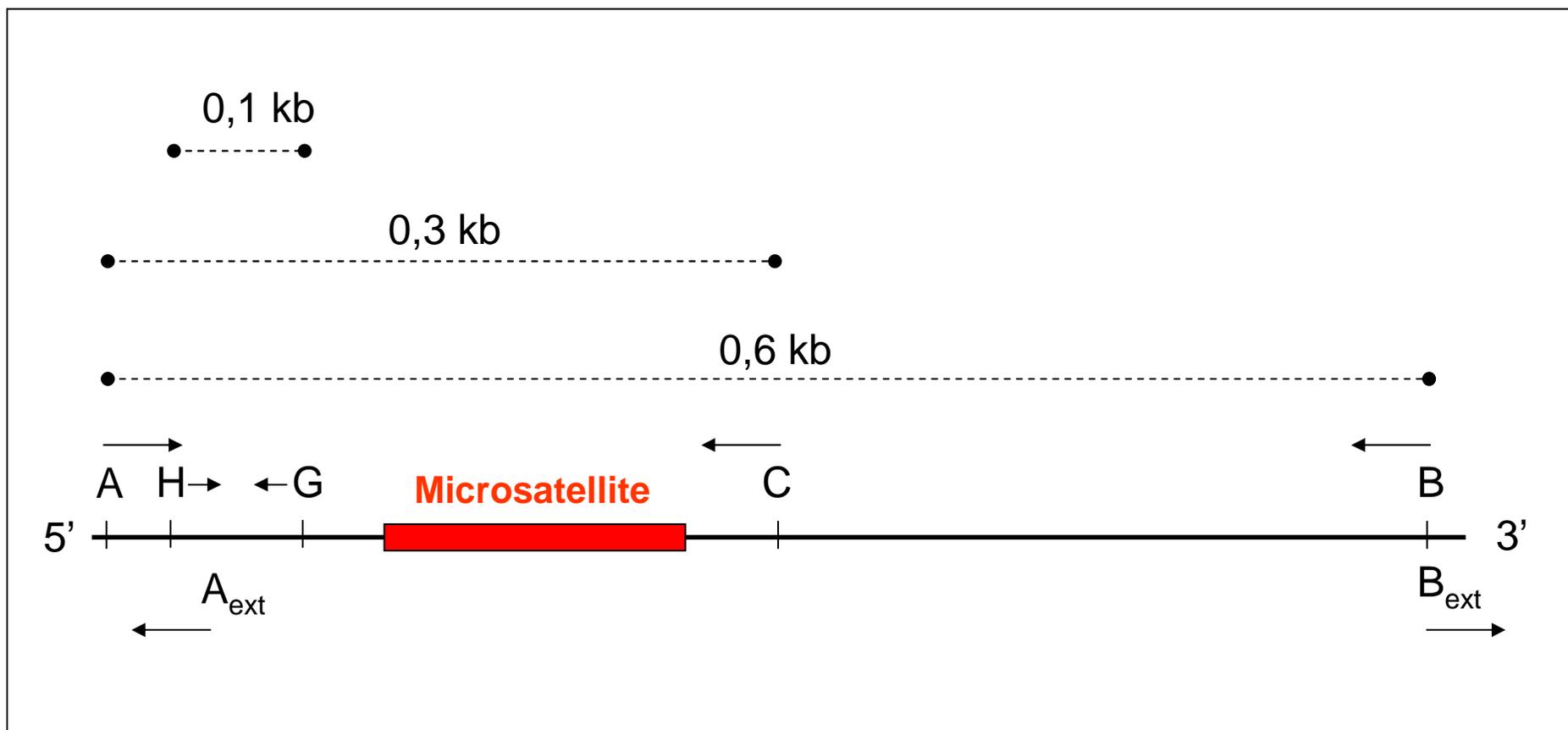


Figure 5 : Agencement et orientation des paires d'amorces EmsB A/C, EmsB A/B, EmsB G/H et les amorces inversées EmsB A_{ext}/B_{ext} sur le fragment EmsB

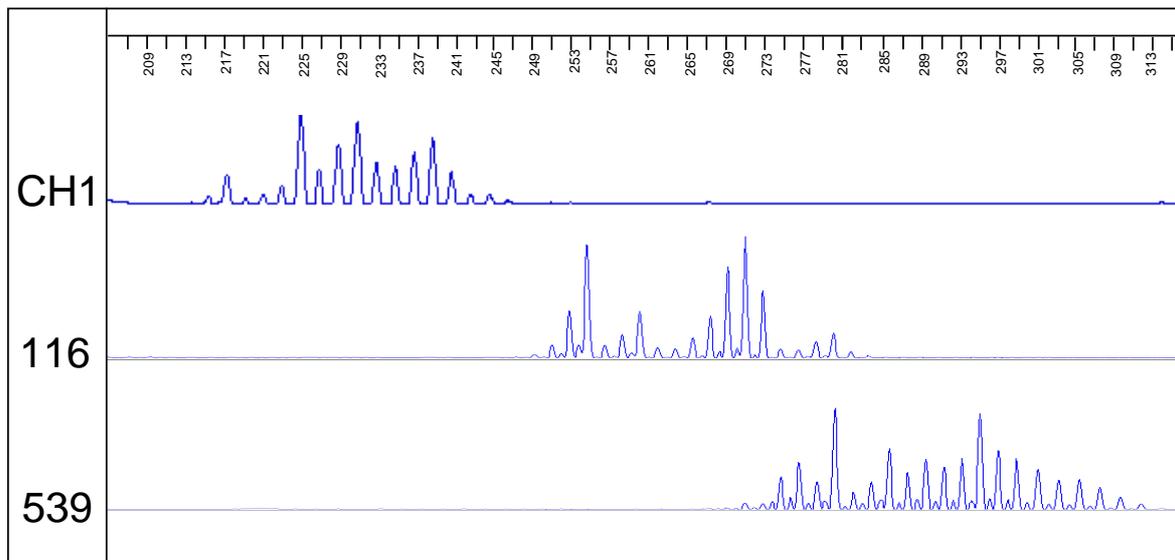


Figure 6 : Analyses de fragments de la cible EmsB réalisées à partir de l'ADN de *E. multilocularis* (CH1), d'origine suisse, *E. canadensis* (116), d'origine mauritanienne et *E. granulosus sensu stricto* (539), d'origine algérienne, grâce à l'automate ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Encadré 4 : Protocole d'analyse de fragments pour l'étude de l'ADN microsatellite :

Les microsatellites étant constitués de motifs répétés caractérisés lors de l'étape de criblage de la banque d'ADN, le polymorphisme de taille des fragments amplifiés est étudié pour déduire le nombre de répétitions de ces motifs.

Dans une plaque de 96 puits à fond conique, 0,5 µl de chaque produit de PCR marqué (l'amorce fluorescente étant incorporée lors de l'amplification) est ajouté à 40 µl de formamide désionisé (solution SLS) et à 0,5 µl de marqueur de poids moléculaire. Cette plaque, ainsi que le tampon de séparation des produits de PCR sont installés dans un séquenceur automatique, de type ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA) ou Beckman CEQ 8000 (Beckman Coulter, Fullerton, CA), selon le lieu d'expérimentation. Le tampon de séparation a été utilisé dans le but de linéariser et de dénaturer l'ADN en simple brin pour faciliter sa migration. Les fragments sont séparés et lus par l'automate en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et détectés par colorimétrie grâce à la présence du fluorochrome de l'amorce incorporé lors de la PCR. Par calibration avec le marqueur de taille présent lors de la migration, la position du signal de fluorescence sur le gel de migration permet de connaître la taille du fragment amplifié.

2.2. Caractérisation du motif complexe

La caractérisation du microsatellite EmsB avait été effectuée avant la publication du génome d'*E. multilocularis* par l'Institut Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/Projects/Helminths/>). Les expériences suivantes ont alors été menées dans une démarche originale afin de définir la nature du profil électrophorétique complexe de la cible EmsB, déterminer la localisation du microsatellite dans l'ADN, estimer le nombre de copies du microsatellite et comprendre leur arrangement dans le génome du parasite. Cette caractérisation a par la suite été vérifiée à partir de la publication du génome d'*E. multilocularis* en 2008.

La signification des pics composant les profils électrophorétiques du microsatellite EmsB a été étudiée en isolant chaque pic du profil par clonage (voir la description du protocole de clonage dans l'**encadré 5**). Une amplification par PCR de la cible EmsB A/C a été réalisée sur l'isolat suisse CH1. Les produits de PCR ont été purifiés sur colonne de silice avec la trousse QIAquick PCR purification (Qiagen SA, Courtaboeuf, France) et séparés par clonage, en insérant chaque fragment dans des plasmides. Ces derniers ont été ensuite incorporés dans des bactéries *Escherichia coli* rendues compétentes. Une PCR M13 r/f a été réalisée pour vérifier la présence de l'insert (voir protocole de la PCR dans l'**encadré 2** et les détails des amorces dans le **Tableau 3**). Une nouvelle PCR fluorescente EmsB A/C a été réalisée à partir des différentes colonies bactériennes et l'insert a été étudié par analyse de taille de fragments (protocole dans l'**encadré 4**) et séquençage (protocole dans l'**encadré 3**).

Le microsatellite EmsB était constitué de 2 motifs $(CA)_i (GA)_j$. En conséquence, des fragments détectés avec la même taille en analyse de fragments pourraient présenter un polymorphisme non détectable par cette technique. Ce phénomène appelé homoplasie, ou polymorphisme caché, a été étudié par séquençage des fragments EmsB de même taille pour les isolats CH1, CND et SL1 (voir **Tableau 4**).

Encadré 5 : Protocole de clonage de l'ADN :

La technique de clonage est employée ici pour isoler les produits de PCR *via* un vecteur plasmidique qui est ensuite inséré dans des bactéries. Ce vecteur présente un gène de résistance à un antibiotique, l'ampicilline et, au niveau d'un site de restriction le gène *lacZ* codant pour l'enzyme β -galactosidase, dont le substrat libéré prend une couleur bleue quand il est dégradé. Lorsqu'un fragment d'ADN est inséré dans le vecteur, ce gène n'est plus fonctionnel. Les colonies bactériennes blanches sont alors considérées comme positives, car contenant le fragment d'intérêt. La multiplication de ces bactéries permet l'obtention à l'identique d'un grand nombre de copies de l'insert.

- Préparation de l'insert :

Une amplification par PCR comme précédemment décrite (**encadré 2**) est réalisée sur une cible donnée. Les produits de PCR sont purifiés sur colonne pour éliminer les nucléotides et amorces en excès dans le milieu réactionnel à l'aide de la trousse QIAquick PCR purification (Qiagen SA, Courtaboeuf, France), selon les recommandations du fournisseur.

- Préparation de cellules compétentes :

Les bactéries *Escherichia coli* DH5 α sont mises en culture pendant 24 h dans une solution de milieu nutritif Mueller-Hinton (MH) liquide à 37 °C. La culture est ensuite diluée au 1/100 dans un milieu MH liquide, en présence de sulfate de magnésium de ($MgSO_4$) à 20 mM. La densité optique (DO) de la solution réactionnelle est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Les bactéries sont mises en culture lorsque la mesure de la DO_{590} est comprise entre 0,4 et 0,6 (obtenue après 2 à 3 h de culture). Une première centrifugation est réalisée (5000 g, 10 min à 4 °C) pour récupérer les bactéries. Le culot est remis en suspension dans une solution contenant du chlorure de rubidium (RbCl) à 100 mM, permettant par voie chimique de rendre les bactéries compétentes, en créant dans la paroi bactérienne des pores transitoires. Une nouvelle centrifugation est réalisée comme précédemment. Le culot est remis en suspension dans une solution de RbCl à 10 mM.

La préparation aliquotée est conservée à -80 °C.

-Digestion plasmidique et ligature :

Un microlitre de plasmide circulaire pUC18 (Yanisch-Perron et al. 1985), contenant le gène de résistance à l'ampicilline est digéré par 1 µl d'enzyme *SmaI*. Cette enzyme coupe le vecteur en bouts francs, au niveau du gène *lacZ*, codant pour la β-galactosidase. La préparation est incubée 24 h. Le vecteur est quantifié et sa concentration est ajustée à 20 ng/µl. Une déphosphorylation est réalisée pour permettre l'incorporation des inserts. Une séparation des produits de digestion par électrophorèse est réalisée pour vérifier la présence d'une bande à 2,7 kb correspondant à la taille du plasmide. Une étape de ligature permet l'incorporation de l'insert dans le plasmide. Pour cela, 10 µl d'insert (15 ng/µl) sont incubés pendant 12 h, en présence de 1 µl de vecteur (20 ng/µl), 1 µl de tampon de l'enzyme, 15 µl d'eau distillée et 1 µl de ligase T4 DNA Ligase (TA Cloning, Invitrogen, Hollande).

- Transformation bactérienne

Les bactéries sont mises au contact de 5 µl de produits de ligature, puis placées 30 min dans la glace. Un choc thermique rend les bactéries compétentes. Ce choc thermique consiste en un passage rapide de 42 °C dans un bain-marie à 4 °C dans la glace pendant 2 min. Chaque produit de transformation est additionné de 1 ml de milieu de culture cœur-cerveille et incubé 1 h 30 à 37 °C sous agitation permanente. Les milieux de culture solides sont préparés avec 300 ml de milieu MH préchauffé, 150 µl d'antibiotique ampicilline (0,1 g/ml) et 40 µl de X-gal (40 mg/ml), substrat de l'enzyme β-galactosidase ; 50 et 100 µl de produits de transformation sont étalés de manière homogène à la surface du milieu de culture. Les bactéries sont mises en culture durant 24 h à 37 °C.

- Analyse des produits de clonage

Les colonies blanches sont prélevées à l'aide d'un cure-dent puis diluées dans 200 µl d'eau distillée stérile et stockées à -20 °C. L'étude de l'insert est réalisée par PCR en utilisant directement la suspension bactérienne chauffée au préalable 3 min à 94 °C. Les amorces M15 r/f sont utilisées pour vérifier la présence du fragment inséré dans le plasmide (**Tableau 3**). Ces séquences amorces sont présentes sur le plasmide de part et d'autre du site de restriction de telle sorte que l'insert soit totalement amplifié.

2.3. Localisation de la séquence EmsB dans le génome d'*E. multilocularis*

La place du microsatellite EmsB dans le génome du parasite a été recherchée en utilisant une sonde marquée, reconnaissant spécifiquement le microsatellite dans l'ADN total du parasite. La démarche nécessitait la digestion de l'ADN total par des enzymes de restriction. Les produits de digestion ont été séparés par électrophorèse, puis transférés sur une membrane filtre par la technique de Southern blotting (Southern 1975). La sonde complémentaire marquée a été mise au contact de la membrane et l'hybridation a été révélée par immuno-détection.

Le but de cette démarche était d'établir si les copies du microsatellite étaient présentes sur un même fragment d'ADN ou réparties dans le génome d'*E. multilocularis*.

- Préparation de la sonde

Une sonde marquée à la digoxigénine (DIG) a été préparée en réalisant une PCR à partir de l'échantillon CH1, avec les amorces EmsB G/H (**Figure 5**). Ces amorces sont localisées dans une des régions flanquant le microsatellite. La trousse Roche (PCR DIG Probe Synthesis, Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) a été utilisée dans les proportions suivantes : pour un volume final de 50 µl, 400 ng d'ADN ont été ajoutés à la solution tampon 1X, les amorces EmsB G et H (20 µM chacune), la solution de nucléotides dUTP-DIG (1mM chacun) et 0,5 U d'ADN de polymérase haute fidélité d'amplification (Expand High Fidelity, Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne). Une PCR EmsB G/H non marquée a été réalisée pour obtenir le témoin positif de l'amplification, comme expliqué dans l'**encadré 2**.

Les produits de PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % - TBE 0,5X (100 V), puis ont été marqués au BET et révélés aux UV.

La séquence nucléotidique de la sonde a été vérifiée par séquençage (voir protocole de séquençage dans l'**encadré 3**) pour valider la spécificité de l'hybridation.

- Digestion enzymatique

Une carte de restriction a été établie à partir de la séquence EmsB de l'échantillon CH1, à l'aide du logiciel Restriction Mapper disponible en ligne (<http://www.restrictionmapper.org/>). Deux enzymes de restriction ne présentant pas de site de coupure dans la séquence EmsB A/C ont été choisies. L'ADN total des isolats CH1, CND (**Tableau 4**), *Taenia crassiceps* et *Ascaris lumbricoides* (**Tableau 5**) a été digéré séparément par les enzymes *AluI* et *PstI*. Dans un volume final de 20 µl, 5 µg d'ADN ont été ajoutés à 2 U d'enzyme. Le mélange a été placé 2 h à 37 °C et conservé à -20 °C.

- Séparation des produits de digestion et transfert par Southern Blotting

Les produits de digestion ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % - TBE 0,5 % (100 V), en présence du standard de taille ADN λ HindIII (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) et révélés aux UV après marquage au BET. Les produits ont été transférés sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-N, Amersham Life Science Inc, Arlington Heights, IL) d'après la technique de Southern blotting à l'aide d'une pompe à vide (5 Hg pendant 90 min). Le gel contenant les fragments séparés a été recouvert d'une solution NaOH 0,4 M, puis pendant 10 min d'une solution SSC 2X. Le bon déroulement du transfert sur la membrane a été contrôlé par l'absence d'ADN visible sur le gel d'agarose initial, par révélation aux UV après un nouveau bain de BET. Une étape de fixation de la membrane de nitrocellulose a ensuite été réalisée sous vide à 80 °C pendant 30 min.

- Pré-hybridation

La membrane a été placée dans un tube à hybridation, en rotation (10 rpm) dans un four du type Mini Oven (Céro Labo, France) pendant 2 h à 68 °C en présence d'une solution de pré-hybridation (100 ml de SSC 5X, SDS 0,02 et DIG Nucleic Acid Detection 1 % (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne)).

- Dénaturation de la sonde

La sonde marquée DIG a été dénaturée 5 min à 95 °C (5 µl de sonde et 200 µl de solution d'hybridation identique à la solution de pré-hybridation), puis placée dans la glace.

- Hybridation et révélation

La solution de pré-hybridation a été remplacée par 10 ml de solution d'hybridation ajoutée au 205 μ l de la solution contenant la sonde dénaturée. La membrane a été incubée à 68 °C pendant 12 h, sous rotation permanente (10 rpm).

La solution d'hybridation a été retirée et conservée à -20 °C. Celle-ci était chauffée 10 min à 68 °C pour une nouvelle utilisation.

La membrane a été placée dans une solution de SSC 2X, SDS 0,1 % à température ambiante (2 x 5 min). Un bain de solution SSC 0,2X, SDS 0,1 % a ensuite été effectué (2 x 20 min).

La membrane a été lavée dans une solution de Tris HCl à 0,1 M, NaCl à 0,15 M et pH 7,5 pendant 1 min sous agitation douce, puis dans 50 ml de solution de blocage Tris HCl, NaCl, DIG Nucleic Acid Detection 1 % pendant 30 min.

La solution d'anticorps (Anti-Digoxigenin, Roche Diagnostics) a été diluée au 1/5000 dans la solution de blocage.

La membrane a été placée 30 min dans la solution d'anticorps, puis lavée 2 x 15 min dans la solution de lavage et 2 min dans la solution de tampon de détection Tris HCl 0,1 M, NaCl 0,1M, pH 9,6 pour équilibrer la membrane.

Dans l'obscurité 10 ml de solution de détection, contenant 200 μ l de solution de NBT/BCIP (NBT/BCIP Solution Stock, Roche Diagnostics, Allemagne) préchauffée à 37 °C et 10 ml de tampon de détection ont été versés sur la membrane. Les bandes du marqueur de taille ADN λ HindIII et les bandes d'hybridation devaient apparaître après 1 à 2 h d'incubation.

2.4. Estimation du nombre de copies du microsatellite de la séquence EmsB dans le génome d'*E. multilocularis*

Le nombre de copies du microsatellite EmsB dans le génome d'*E. multilocularis* a été estimé par la technique de PCR quantitative, à partir d'une gamme d'ADN. La réaction de PCR a été réalisée à l'aide de la trousse FastStart Master SYBR Green I LightCycler (Roche Diagnostics, Penzberg, Allemagne) et l'analyse quantitative grâce à l'appareil LightCycler (Roche Diagnostics). L'efficacité de la PCR (E) a été déterminée grâce à l'équation $E = 10^{(-1/\text{pente})}$. La méthode consiste à comparer le nombre de copies du fragment EmsB A/C dans le génome du parasite à une solution contenant un nombre connu de copies de EmsB, insérées dans un plasmide recombinant (Gourlain et al. 2003; Whelan et al. 2003). Dans ce but, une gamme de plasmides (1 à 10^8 copies) a été amplifiée avec les amorces EmsB A/C. Le nombre de copies d'EmsB dans le génome de l'échantillon CH1 a ainsi été estimé par comparaison à la valeur du cycle seuil ou point d'inflexion (*Crossing point*).

2.5. Arrangement du microsatellite EmsB dans le génome d'*E. multilocularis*

L'hypothèse d'un arrangement des séquences microsatellites EmsB en tandem, regroupés sur un même fragment du génome plutôt que de manière dispersée chez *E. multilocularis* a été avancée. Pour le démontrer, un couple d'amorces EmsB A/B a été

construit dans le sens inverse 3'-5' par rapport au couple initial (EmsB A_{ext}/B_{ext}) (**Tableau 3**). La localisation et l'orientation de ces amorces sont schématisées dans la **Figure 5**. Une amplification a été effectuée pour les couples d'amorces EmsB A/B, EmsB A_{ext}/B_{ext}. Pour les amorces externes, la PCR a été réalisée avec un temps d'élongation de 5 min.

2.6. Confirmation des résultats par la recherche des cibles microsatellites EmsJ, EmsK, EmsB et NAK1 dans le génome complet d'*E. multilocularis*

Les précédents travaux pour la caractérisation de la cible EmsB ont été confrontés *a posteriori* au génome complet d'*E. multilocularis*, récemment séquencé et publié par l'Institut Sanger. Les deux autres microsatellites EmsJ et EmsK, qui avaient été retenus après le criblage de la banque d'ADN et considérés comme des microsatellites simple-locus ont aussi été recherchés dans la base de données. Une séquence pour chacune des cibles microsatellite EmsJ, EmsK et EmsB, issue de l'amplification de l'isolat CH1, a été comparée au génome publié et soumis à un alignement de séquences. La séquence publiée par Minoru Nakao (N° Genbank AB100031), issue de l'amplification de la cible EMms1 (renommée ici NAK1) et considérée comme simple-locus a également été comparée au génome complet.

3. Caractérisation de la technique de typage basée sur le polymorphisme d'EmsB

Les différentes qualités d'un marqueur moléculaire ont été évaluées pour la cible EmsB au niveau de la sensibilité, de la spécificité, de la reproductibilité, de la répétabilité et de la stabilité dans le temps de l'amplification d'EmsB. Les qualités de la cible ont ensuite été testées sur le matériel coprologique de renards parasités et des fèces collectées dans la zone d'abattage des renards pour évaluer la faisabilité de la détection du parasite sur le terrain par le marqueur EmsB.

3.1. Sensibilité de l'amplification de la cible EmsB

Pour évaluer la sensibilité de la cible EmsB, les conditions de PCR décrites précédemment (**Encadré 2**) ont été réalisées en présence d'un gradient d'ADN décroissant allant de 1 ng à 1 fg pour déterminer la quantité minimale d'ADN nécessaire à l'amplification du microsatellite.

3.2. Spécificité de l'amplification de la cible EmsB

L'amplification de la cible EmsB a été testée sur l'ADN extrait d'un prélèvement de muscle et un de foie sain d'un renard, obtenus lors d'une autopsie, d'un prélèvement de tissu hépatique humain et un de souris. Un panel de cestodes (10 isolats *Echinococcus* spp., 7 *Taenia* spp., 1 *Moniezia benedeni*, 2 *Anoplocephala* spp. et 2 *Mesocestoides corti*), de nématodes (1 isolat pour chaque espèce : *Toxocara* sp., *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, *Setaria equina*, *Ollulanus tricuspis* et *Anisakis simplex*) et de protozoaires (1 isolat de *Toxoplasma* sp. et *Haemonidius contortus*) (**Tableau 5**) ont également été testés.

L'amplification d'EmsB a été réalisée à partir de 10 à 50 ng d'ADN de chaque échantillon.

Tableau 5 : Panel d'helminthes et protozoaires testés pour l'amplification la cible EmsB.

Panel de parasites	Code DNAthèque	Année	Classe
<i>Echinococcus vogeli</i>	p2	1988	cestode
<i>Echinococcus vogeli</i> , Colombie	n21	ND ^a	cestode
<i>Echinococcus granulosus</i> (cheval)	p6	1987	cestode
<i>Echinococcus granulosus</i> (castor)	n6	2000	cestode
<i>Echinococcus granulosus</i> , Mauritanie	M110-G6	2003	cestode
<i>Echinococcus granulosus</i> , Algérie	A314-G1	2003	cestode
<i>Echinococcus granulosus</i> , Ethiopie	E35-G1	ND ^a	cestode
<i>Echinococcus multilocularis</i> KF5	n22	1999	cestode
<i>Echinococcus multilocularis</i> (souris)	n25	1996	cestode
<i>Echinococcus shiquicus</i>	06QH02	2006	cestode
<i>Taenia saginata</i>	p3	ND ^a	cestode
<i>Taenia saginata</i>	p9	1990	cestode
<i>Taenia saginata</i>	p10	1985	cestode
<i>Taenia taeniformis</i>	p8	1988	cestode
<i>Taenia crassiceps</i>	T1 (MOR13)	2007	cestode
<i>Taenia pisiformis</i>	n13	1996	cestode
<i>Taenia ovis cysticescus</i>	n7	1983	cestode
<i>Moniezia benedeni</i>	n3	1995	cestode
<i>Anoplocephala perfoliata</i>	n12	1996	cestode
<i>Anoplocephala magna</i> juvénile	n15	1996	cestode
<i>Mesocestoides corti</i>	n14	2006	cestode
<i>Mesocestoides corti</i> native	n19	2005	cestode
<i>Toxocara</i> sp.	n17	1999	nématode
<i>Enterobius vermicularis</i>	n4	ND ^a	nématode
<i>Ascaris lumbricoides</i>	p7	1990	nématode
<i>Ascaris suum</i> native	n20	ND ^a	nématode
<i>Setaria equina</i>	n9	2006	nématode
<i>Ollulanus tricuspis</i>	n10	2005	nématode
<i>Anisakis simplex</i>	n11	1993	nématode
<i>Toxoplasma</i> sp.	p4	1996	protozoaire
<i>Haemonchus contortus</i>	n16	1994	protozoaire

^aND : non documenté

3.3. Reproductibilité et répétabilité

Le test de reproductibilité de l'amplification d'EmsB a été réalisé entre deux laboratoires, à l'Institut de Parasitologie de Berne (Suisse) et au Laboratoire de Parasitologie de Besançon (France), en utilisant respectivement les automates ABI Prism 3100 et Beckman CEQ 8000. Trois échantillons ont été choisis aléatoirement parmi un panel mondial d'*E. multilocularis* : 1AL, 31CH et 116D (Cf. détails dans **Tableau 4**). Les isolats ont été étudiés par PCR et analyse de fragments dans les conditions des deux lieux d'expérimentation. Le coefficient de corrélation de Pearson a été calculé à partir des deux profils électrophorétiques pondérés, obtenus entre les deux laboratoires et ceci pour chacun des 3 échantillons.

La répétabilité de l'amplification a été testée entre les deux automates sur un même échantillon, choisi au hasard parmi le panel mondial : 302PL. Cinq réactions de PCR ont été réalisées dans des tubes réactionnels différents. Les analyses de fragments ont été réalisées respectivement sur les deux automates ABI Prism 3100 et CEQ 8000. La déviation standard (σ) a été déterminée pour chaque appareil à partir des distances euclidiennes calculées entre les 5 profils pondérés.

3.4. Stabilité dans le temps

Pour permettre la détection et la comparaison de variants dans un espace géographique et une échelle de temps donnée, il est nécessaire que la cible étudiée présente une certaine stabilité temporelle. Celle-ci dépend de l'horloge moléculaire du marqueur (temps d'apparition des mutations dans la séquence cible). Cette qualité a été évaluée à partir de la souche d'*E. multilocularis* F AUB-2, maintenue pendant 7 mois par des inoculations successives de métacestodes dans la cavité péritonéale de différentes gerbilles (*Meriones unguiculatus*) (Eckert et al. 1983). Trois isolats ont été étudiés : 500, 501 et 502 (**Tableau 4**).

3.5. Faisabilité de la détection d'*E. multilocularis* dans le matériel coprologique

Nous avons ensuite souhaité évaluer la sensibilité de la méthode d'amplification de l'ADN du parasite par la cible EmsB dans des conditions plus proches des celles retrouvées dans la nature, comme dans les fèces de renards contaminés où l'ADN du parasite est mélangé avec l'ADN de l'hôte et en tenant compte de la présence possible d'inhibiteurs d'amplification retrouvés dans le matériel coprologique. Pour ce faire, la sensibilité du microsatellite EmsB a été testée sur une collection de contenus rectaux prélevés après l'autopsie de renards parasités, de charge parasitaire connue et de fèces issues d'une collecte sur le terrain.

3.5.1. Panel de renards et fèces récoltées sur le terrain

Un panel de 62 renards a été constitué après leur abattage par des professionnels de l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage entre mars et mai 2007 sur les cantons de Maîche et Morteau (Département du Doubs, France).

Les individus ont été autopsiés au Laboratoire Vétérinaire du Doubs (LVD 25). Les intestins des renards ont été placés individuellement dans des sacs et maintenus 3 semaines à -80 °C, pour la décontamination des prélèvements selon les recommandations de l'OIE (OIE 2004). Les intestins ont été décongelés 24 h avant d'être manipulés.

Entre juillet et août 2007, 31 fèces (codées F1 à F31) ont été récoltées sur les sites d'abattage des renards (fèces terrain). Les échantillons ont été décontaminés dans les mêmes conditions que pour les échantillons de contenu rectal.

3.5.2. Grattage des intestins et prélèvement du contenu rectal

La charge parasitaire des renards a été évaluée après autopsie et prélèvement des parasites à la surface de la muqueuse intestinale. Ces prélèvements ont été effectués par la technique de sédimentation et comptage (méthode SCT ou *Sedimentation and Counting Technique*) (Raoul et al. 2001).

Les intestins isolés et décontaminés ont été déroulés et disposés sur le plan opératoire pour être séparés en 5 à 6 morceaux. Les segments intestinaux ont été ouverts longitudinalement et étalés pour enlever les macroéléments présents (os de rongeurs, parasites macroscopiquement visibles, débris végétaux, etc.). Le contenu rectal (pré-fèces) a été placé dans des flacons d'examen de 100 ml pour être stocké à -20 °C jusqu'à utilisation.

Les segments intestinaux examinés ont été placés dans un récipient d'1,5 l, rempli au $\frac{3}{4}$ d'eau. Le contenu du récipient a été agité énergiquement pendant 10 à 20 secondes. Chaque morceau a été passé entre deux doigts pour permettre un grattage délicat des villosités intestinales. La solution de grattage a été décantée pendant 1 h. Le surnageant a été retiré en vidant délicatement le récipient. Pour enlever les macroéléments restant, le culot a été passé sur un tamis (mailles de 2 mm) et la solution a été recueillie dans un récipient conique gradué. La solution a été décantée à 4 °C pendant 1 h. Le surnageant a été retiré et après mesure du volume, le culot a été placé dans des flacons d'examen de 100 ml, pour être conservé à -20 °C.

3.5.3. Lecture des culots de grattage, identification morphologique et moléculaire

La prévalence du parasite chez le renard du Haut-Doubs (cantons de Maïche et Morteau) a été évaluée par comptage des individus dans le culot de grattage intestinal. Les parasites étaient identifiés à l'espèce *E. multilocularis* selon les critères mentionnés dans le manuel du WHO/OIE (WHO/OIE 2001). Pour une première lecture, 9 ml de solution de culot ont été placés dans une boîte de pétri carrée de 12 cm de côté. Des repères avaient été préalablement faits au fond de la boîte pour faciliter la lecture. Sous la loupe binoculaire, les vers adultes entiers ont été recherchés en inspectant attentivement la fraction du volume du

culot. Les individus (entiers ou scolex) ont été dénombrés. Si après estimation, le nombre de parasites dépassait 100 individus dans le volume total, seule une fraction de 10 % du culot était lue. Une extrapolation au volume total était faite. Si les individus étaient peu nombreux (< 10 individus dans ce premier volume examiné), le culot était lu dans son intégralité.

Après l'identification morphologique du parasite, une confirmation par biologie moléculaire a été réalisée. Pour chaque renard, un ver a été étudié par séquençage de la cible ND1 et par analyse de fragments pour la cible EmsB (voir les protocoles d'extraction de l'ADN du ver adulte, de PCR, de séquençage et d'analyse de fragments dans les **encadrés 1, 2, 3 et 4**).

3.5.4. Extraction de l'ADN présent dans les pré-fèces et fèces de renard

L'ADN présent dans les prélèvements coprologiques a été extrait grâce à une trousse d'extraction d'ADN, spécifique de ce type de prélèvements, permettant une élimination efficace des inhibiteurs et une concentration du matériel génétique.

Environ 200 mg de fèces ont été traités à l'aide de la trousse QIAamp DNA Stool Mini (Qiagen, Hilden, Allemagne) pour l'extraction de l'ADN présent dans les échantillons coprologiques, d'après les recommandations du fournisseur. Ce mode d'extraction a été choisi pour la facilité de son exécution, la rapidité de la méthode et l'étape de concentration chimique des inhibiteurs permettant de les éliminer efficacement (comprimés InhibitEX, Qiagen, Hilden, Allemagne). L'ADN extrait a été placé à -20 °C jusqu'à utilisation pour la PCR.

3.5.5. Amplification et analyse des produits de PCR

L'ADN des pré-fèces et des fèces terrain a été amplifié pour la cible mitochondriale ND1 et la cible microsatellite EmsB (voir protocole d'amplification dans l'**encadré 2** et le **Tableau 3**).

La cible BG1/3 a été étudiée en complément de la cible ND1 pour le panel de fèces terrains. Les réactions de PCR ont été réalisées en présence de albumine sérique bovine (BSA pour *Bovine Serum Albumin*) à 0,1 µg/µl de volume final, dans le but d'améliorer le rendement de la PCR (Mathis & Deplazes 2006).

Les cibles ND1 et BG1/3 ont été séquencées d'après la méthode Sanger (**Encadré 3**). Les séquences nucléotidiques ont été comparées à la base de données GenBank.

La cible EmsB a été étudiée par analyse de taille de fragments (**Encadré 4**).

3.5.6. Recherche d'inhibiteurs dans le matériel coprologique

Dans le cas d'un résultat de PCR négatif, la présence d'inhibiteurs de PCR a été recherchée en réalisant une PCR en présence à la fois de l'extrait de fèces trouvé négatif et d'ADN d'*E. multilocularis* (voir conditions de PCR dans l'**encadré 2**).

4. Validation de la cible EmsB : comparaison de son pouvoir discriminant avec des cibles de nature microsatellite simple- locus

L'étape de validation de la cible EmsB devait reposer sur la comparaison de son pouvoir discriminant avec d'autres cibles de même nature pour déterminer les limites de son utilisation en génotypage.

4.1. Panel d'échantillons

Un panel de 76 isolats provenant d'Europe, de Chine, du Japon et d'Amérique du Nord a été sélectionné pour déterminer le pouvoir discriminant des cibles microsatellites EmsJ, EmsK, EmsB et NAK1. La description des isolats est disponible dans le **Tableau 4**.

4.2. Détermination des génotypes et analyse cladistique

4.2.1. Les microsatellites simple-locus

Trois cibles ont été utilisées pour évaluer le pouvoir discriminant des microsatellites simple-locus. Il s'agissait de EmsJ et EmsK précédemment isolés au laboratoire et NAK1 une cible issue de la littérature. Cette cible comporte une séquence microsatellite complexe, composée de 5 motifs de trinuécléotides répétés en tandem $(CAC)_k (CGC)_l (CAC)_m (TAC)_n (TAT)_o$ (**Tableau 3**) (Nakao et al. 2003).

Les cibles d'ADN microsatellite présentant un profil simple en analyse de fragments (1 ou deux bandes ou pics de fluorescence) ont été décrites en termes de génotypes « homozygotes » (1 bande) ou « hétérozygotes » (2 bandes) en fonction de la taille (exprimée en pb) du ou des fragments amplifiés par PCR fluorescente et visualisés sur l'électrophorégramme.

4.2.2. Le microsatellite multilocus EmsB

Les profils électrophorétiques de la cible microsatellite multilocus EmsB ont été étudiés par l'analyse de regroupement hiérarchique, les liaisons existant entre les isolats étant visualisées sur un dendrogramme. La distance euclidienne entre les isolats a été calculée par la méthode des liens moyens ou UPGMA (Legendre & Legendre 1998). La force de liaison des groupes constitués a été testée par une série de réitérations ou *bootstrap* égale à 1000, donnant un score aux branches du dendrogramme (Shimodaira 2002, 2004). Les analyses ont été réalisées grâce au logiciel R version 2.6.1 (R-Development-Core-Team 2005). Les calculs de réitérations ont été effectués grâce au package *pvc* (Suzuki & Shimodaira 2005). Pour définir les limites du regroupement et établir des assemblages de profils génétiques, la valeur seuil de distance génétique, précédemment définie à partir de la souche F AUB-2 (cf. **Tableau 4**) a été ajoutée à l'analyse. Le seuil de distance génétique a été établi en rajoutant la

valeur de trois déviations standard à la moyenne des distances génétiques observée entre les 3 isolats de cette souche, pour éviter la sur-discrimination des isolats.

4.2.3. L'indice de discrimination de Hunter et Gaston

Le pouvoir discriminant de chaque cible microsatellite a été testé grâce à l'indice de discrimination de Simpson (Simpson 1949), modifié par Hunter et Gaston (Hunter & Gaston 1988). Cet indice noté D se base sur la probabilité que deux échantillons non liés appartiennent à deux groupes différents. Un marqueur moléculaire présente un pouvoir discriminant fort quand la valeur observée est plus proche de 1 que de 0. L'équation suivante décrit cet indice :

$$D = 1 - \frac{1}{n(n-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

n représente le nombre total d'isolats du panel d'échantillons, s indique le nombre total de regroupements décrits et n_j représente le nombre d'isolats appartenant au $j^{\text{ème}}$ regroupement.

5. Utilisation du microsatellite EmsB dans une démarche d'épidémiologie moléculaire

La diversité génétique du parasite *E. multilocularis* a été étudiée à différentes échelles d'analyses spatiales en Europe, dans le but de mieux estimer le mode de dispersion du parasite et de définir la faisabilité de sa traçabilité dans l'environnement.

5.1. Echelle micro-locale : étude de parasites isolés de rongeurs d'un même champ

Un panel de parasites retrouvés chez des rongeurs capturés sur une zone restreinte à quelques centaines de mètres carrés a été étudié en Europe ainsi qu'un panel similaire provenant du foyer nord américain. Onze rongeurs *Arvicola terrestris* d'un champ de 0,25 km² près de Fribourg en Suisse avaient été collectés sur une période d'un mois. Le panel nord américain comprenait 10 rongeurs *Microtus oeconomus*, collectés sur une période de 3 jours sur une pelouse (100 m x 100 m) près de la piste d'atterrissage de Savoonga, sur l'île Saint Laurent en Alaska. L'ADN des lésions parasitaires a été extrait et étudié par l'amplification et l'analyse de fragments (voir les **encadrés 1, 2 et 4**) des cibles EmsJ, EmsK, EmsB et NAK1, dans le but d'évaluer le polymorphisme des microsatellites au sein de populations de parasites géographiquement liées. La moyenne et la déviation standard des distances génétiques observées entre les profils EmsB ont été calculées pour chaque panel.

5.2. Echelle locale : étude de parasites issus de renards collectés sur 900 km²

Un panel de vers adultes a été constitué après autopsie de renards piégés ou victimes d'accident de la circulation (n = 79). Les renards ont été collectés sur une zone géographique de 900 km² dans le Sud-Est du département des Ardennes et de la Meuse voisine (France). L'isolement des vers a été mené comme décrit précédemment. Les charges parasitaires des renards ont été évaluées dans le cadre de l'étude publiée par Guislain et collaborateurs en 2008 (Guislain et al. 2008). Selon la charge, 5 vers gravides ont été isolés pour des charges parasitaires inférieures à 10000 vers et 10, pour des charges supérieures à ce seuil.

Le polymorphisme d'*E. multilocularis* a été étudié grâce aux cibles EmsB et NAK1, amplifiées par PCR fluorescente et étudiées en analyse de fragments (voir les **encadrés 2 et 4**). Les allèles de la cible NAK1 ont de plus été étudiés par séquençage après clonage des produits de PCR (voir les **encadrés 3 et 5**). Les microsatellites ont été comparés à la cible d'ADNmt ATP6 pour évaluer les liens génétiques existants entre ces parasites par une approche classique. Les conditions d'amplification des cibles sont décrites dans le **Tableau 3**. Les renards présentant des vers adultes de génotypes « hétérozygotes » ont fait l'objet d'investigations plus poussées. Des vers supplémentaires ont été étudiés chez ces renards pour mieux connaître la diversité génétique de leurs parasites et disposer de matériel pour permettre de dissocier les génotypes des œufs et des vers adultes.

5.3. Echelle continentale : étude du parasite à l'échelle de l'Europe

L'identification moléculaire d'*E. multilocularis* par la cible microsatellite EmsB a été réalisée sur une collection de 653 isolats originaires de France, de Suisse, d'Allemagne, d'Autriche, de Tchéquie, de Slovaquie et Pologne. Ce panel européen comprenant 596 vers adultes issus de renards piégés ou victimes d'accident de la circulation (**Tableau 6**), 50 lésions parasitaires opérées chez des patients et 7 lésions prélevées après l'autopsie d'animaux en captivité (2 singes vervets, 3 macaques, 1 ouistiti et 1 castor) (**Tableau 7**).

Le protocole initial d'échantillonnage pour la constitution du panel de vers adultes était le suivant : dans les 7 pays européens (France, Allemagne, Suisse, Autriche, Tchéquie, Slovaquie et Pologne), il était demandé aux différentes équipes de travail (voir **Tableau 6**) de prélever 5 vers par renard sur un échantillon de 20 renards par pays. Au final, le panel comprenait 596 vers adultes isolés après l'autopsie de 129 renards roux entre 2001 et 2005. La technique de grattage intestinal a été employée (Deplazes & Eckert 1996) pour isoler les vers gravides. Les vers ont été conservés dans l'éthanol à 70% (v/v) avant toute utilisation.

L'ADN des parasites a été extrait d'après le protocole décrit dans l'**encadré 1**.

Tableau 6 : Panel de vers adultes issus de la collection de renards européens. Les abréviations des sous-régions correspondent à : Nord Au : Nord Autriche ; Ouest Tch : Ouest Tchéquie ; Arde : Ardennes ; Lor : Lorraine ; Bav : Bavière ; Souabe : Jura Souabe ; Nord Pol : Nord Pologne ; Tatras : Est Slovaquie et Sud Pologne ; Cent Slov : Centre Slovaquie.

Pays	Origines géographiques	No de vers (No de renards)	Sous-régions	Equipes
Autriche	Oberösterreich	71 (15)	Nord Au	Département de Parasitologie & Zoologie, Vienne
	Niederösterreich	27 (7)	Nord Au	
République Tchèque	Prague	14 (3)	Ouest Tch	Institut de Parasitologie, Kosice
	Domazlice dist.	33 (7)	Ouest Tch	
	Pilsen-South dist.	5 (1)	Ouest Tch	
	Pilsen-North dist.	5 (1)	Ouest Tch	
	Rokycany distr.	4 (1)	Ouest Tch	
	Prachatice distr.	5 (1)	Nord Au	
France	Ardennes	79 (16)	Arde	2C2A, Boult-aux-Bois AFSSA, Nancy LBE, Besançon AFSSA, Nancy
	Moselle	13 (3)	Lor	
	Doubs	7 (2)	Doubs	
	Meurthe et Moselle	5 (1)	Lor	
Allemagne	Bavière	48 (10)	Bav	Institut de Zoologie, Hohenheim
	Bade-Württemberg	39 (8)	Souabe	
Pologne	Pomeranie (Nord et Centre)	37 (8)	Nord Pol	Institut de Parasitologie, Varsovie
	Varmia et Mazuria (Nord-Est)	9 (2)	Nord Pol	
	Sud-Est	48 (10)	Tatras	
Slovaquie	Nord	10 (2)	Tatras	Département de Biologie, Pielsen
	Nord-ouest	14 (3)	Cent Slov	
	Nord-Est	9 (2)	Tatras	
	Sud-Ouest	16 (4)	Cent Slov	
	Sud-Est	14 (3)	Tatras	
Suisse	Canton de Zürich	84 (19)	Suisse	Institut de Parasitologie, Zürich
		596 (129)		

Tableau 7 : Panel de cas humains et d'animaux de parcs zoologiques d'origine suisse, allemande, autrichienne et française.

Code isolat	Pays	Région	Détail origine	Hôte	Date de prélèvement	Profil EmsB
Ouistiti	Suisse	Zoo de Servion	IPA Berne	ouistiti	2003	P20
HP1357_h	Allemagne	Freiburg	IPA Berne	homme	2005	G20
HP1320_h	Suisse	Bâle	IPA Berne	homme	2004	P5
HP1207_h	Suisse	Lausanne	IPA Berne	homme	2003	P19
HP1201_h	France	Rhône	IPA Berne	homme	2003	P8
HP1199_h	Suisse	Lausanne	IPA Berne	homme	2003	P20
HP1164_h	Suisse	Lausanne	IPA Berne	homme	2002	G12
HP1054_h	Suisse	Lausanne	IPA Berne	homme	2001	P15
Castor 2	Suisse	Canton de Berne	IPA Berne	castor	2005	G23
45CH-s	Suisse	Zoo de Lausanne	IPA Berne	ouistiti	2003	P20
43CH-s	Suisse	Zoo de Zürich	IPA Berne	singe vervet	1990	G15
42CH-s	Suisse	Zoo de Zürich	IPA Berne	singe vervet	1989	G15
41CH-h	Suisse	ND ^a	IPA Berne	homme	1986	P7
40CH-h	Suisse	ND ^a	IPA Berne	homme	1994	P17
39CH-h	Suisse	ND ^a	IPA Berne	homme	1980	P13
37CH-h	Suisse	ND ^a	IPA Berne	homme	1990	P13
36CH-h	Suisse	ND ^a	IPA Berne	homme	1982	P16
35D-h	Allemagne	ND ^a	IPA Berne	homme	ND ^a	G20
34CH-s	Suisse	Zoo de Zürich	IPA Berne	macaque	1991	G15
32A-h	Autriche	ND ^a	IPA Berne	homme	1986	P8
31CH-s	Suisse	Zoo de Bâle	IPA Berne	macaque	2003	P12
29CH-s	Suisse	Zoo de Bâle	IPA Berne	macaque	1997	P13
29	France	Doubs	CHU Besançon	homme	1989	G33
25	France	Doubs	CHU Besançon	homme	1989	P10
24	France	Doubs	CHU Besançon	homme	1989	G33
23	France	Doubs	CHU Besançon	homme	1986	G20
22	France	Ain	Oyonax	homme	1988	P8
21	France	Doubs	Damprichard	homme	1988	P11
19	France	Doubs	CHU Besançon	homme	1988	P10
18	France	Haute-Saône	Buwilliers	homme	1986	G20
17	France	Doubs	Bouclans	homme	1987	G20
16	France	Haute-Saône	Luxeuil	homme	1987	G20
14	France	Jura	Lons-le-Saunier	homme	1987	P10
13	France	Haute-Saône	Vesoul	homme	1988	G20
11	France	Doubs	CHU Besançon	homme	1988	P20
10	France	Doubs	CHU Besançon	homme	1986	P18
9	Suisse	Canton de Zürich	Zürich	homme	1981	P14
6	France	Doubs	CHU Besançon	homme	1988	P11
4	France	Doubs	CHU Besançon	homme	1986	P9
(403)	France	Jura	Lons-le-Saunier	homme	2000	G20
(412)	France	Haute-Savoie	Annecy	homme	1997	P2
(413)	France	Moselle	Sarreguemines	homme	2001	G23
(415)	France	Doubs	Besançon	homme	2001	G17
(416)	France	Val-de-Marne	Maisons-alfort	homme	1999	P4
(420)	France	Seine –Maritime	CHU Besançon	homme	2000	G28
(422)	France	Côte-d'Or	Montbard	homme	2001	P8
(425)	France	Haute-Saône	Gy	homme	2004	P13
(426)	France	Doubs	Pontarlier	homme	2004	G15
(427)	France	Haute-Saône	Villersexel	homme	2005	G21
(429)	France	Doubs	Marchaux	homme	2005	P6
(432)	France	Doubs	Pierrefontaine-les-V.	homme	2004	P3
(433)	France	Moselle	CHU Besançon	homme	2003	P1
(434)	France	Jura	Salins-les-Bains	homme	2005	P11
(435)	France	Jura	Morbier	homme	2006	P20
(436)	France	Jura	Lons-le-Saunier	homme	2005	P20
(437)	France	Doubs	Le Russey	homme	2006	G15
(431)	France	Ardennes	Charleville Mézières	homme	2004	G26
(448)	France	Doubs	Fontaine les Clerval	homme	2006	P20

^aND : non documenté

5.3.1. Localisation géographique des renards et regroupement en sous-régions

La localisation géographique de chaque renard a été obtenue grâce au travail de terrain des différentes équipes européennes. Pour les renards allemands, français, polonais, slovaques et autrichiens, le nom de la commune la plus proche du lieu d'abattage était disponible. Les coordonnées du centre des communes ont été choisies comme coordonnées géographiques du renard. Les renards tchèques et suisses ont été géo-référencés par un appareil GPS. L'ensemble des coordonnées a été converti dans le système géodésique WGS84 avec l'aide du logiciel MapInfo version 6.5.

Les renards ayant été collectés à différents endroits dans les pays étudiés, ils ont été regroupés dans des sous-régions écologiquement et topographiquement similaires et graphiquement disposés sur une carte à l'aide du logiciel R version 2.6.1 et des packages `sp` (Pebesma & Bivand 2008), `rgdal` (Keitt et al. 2008), `foreign` (DebRoy & Bivand 2008), `maptools` (Lewin-Koh & Bivand 2008) et `splancs` (Rowlingson & Diggle 2007). Les coordonnées WGS84 ont été transformées en coordonnées UTM31.

Un minimum de 30 échantillons a été retenu pour constituer une sous-région exploitable dans cette étude.

Les localisations des renards français, suisses, allemands et autrichiens ainsi que les localisations des patients français, suisses, allemands et autrichiens ont été placées ensemble sur une carte. Les prélèvements issus des renards ayant été localisés à l'aide d'un GPS et pour les lésions humains, simiesques et le castor uniquement par un découpage administratif du territoire (le département, le canton, le *Regierungsbezirke* ou le *länder* de domicile lors du diagnostic), l'ensemble des données de géolocalisation a été regroupé. Pour donner une représentation unifiée de l'origine géographique des différents prélèvements issus du renard, de l'homme et de l'animal en captivité, l'échelle correspondant aux localisations des départements et équivalents a été choisie. Les découpages administratifs étaient pour la France les 96 départements français de métropole, pour la Suisse les 26 cantons, pour l'Allemagne les 32 *Regierungsbezirke* et pour l'Autriche les 9 *Länder*. Les isolats d'*E. multilocularis* ont été reliés au territoire administratif d'origine de l'animal ou du patient. Un fond de carte a été créé à l'aide du logiciel Adobe Illustrator. Le logiciel Philcarto a ensuite permis de positionner les échantillons afin d'établir une carte de la distribution des

prélèvements en fonction de leur type (prélèvements issus d'hôtes définitifs et d'hôtes intermédiaires hommes ou animaux).

5.3.2. PCR, analyse de fragments et analyse cladistique des parasites adultes et métacestodes

Le polymorphisme génétique du parasite a été étudié d'après la cible microsatellite EmsB, amplifiée dans les conditions décrites dans le **Tableau 3** et l'**encadré 2**. Les produits de PCR ont été étudiés par la technique d'analyse de fragments (**Encadré 4**).

Les profils électrophorétiques ont été pondérés comme décrit **page 77** et les distances génétiques existantes entre les isolats étudiées comme décrit **page 99**.

L'ADN des isolats de métacestodes provenant des lésions opérées chirurgicalement chez les patients et les animaux a été extrait et amplifié par PCR EmsB (**Encadré 2**). Les profils électrophorétiques des 50 isolats de patients et les 7 échantillons des animaux en captivités ont été intégrés dans une analyse cladistique comprenant les 596 vers adultes génotypés.

5.3.3. Etude de la distribution spatiale des différents génotypes identifiés

La richesse (nombre de profils EmsB) et la diversité (nombre et abondance relative de profils EmsB) de la collection d'échantillons de vers adultes ont été testées dans le but d'évaluer l'effort d'échantillonnage fourni pour chaque sous-région, avec comme unité d'échantillonnage le renard. L'analyse de raréfaction de la richesse a été représentée par des courbes, décrivant pour une sous-région, le nombre de profils obtenus en fonction du nombre de renards étudiés. L'analyse de raréfaction de la diversité a été étudiée pour chaque sous-région par la réalisation de courbes décrivant la valeur de l'indice de diversité de Simpson en fonction du nombre de renards étudiés. Cet indice mesure la probabilité que deux individus sélectionnés au hasard appartiennent à la même espèce. Pour un nombre donné de renards, si la courbe observait un plateau, un nombre raisonnable d'isolats avait été échantillonnés, en revanche si la courbe n'atteignait pas de plateau ou de saturation, l'effort d'échantillonnage

n'avait pas été suffisant pour atteindre la richesse ou la diversité génétique maximale existant dans la sous-région considérée.

La structuration spatiale de la diversité à l'échelle continentale a été étudiée par la comparaison des distances euclidiennes entre les profils génétiques EmsB et les distances géographiques existant entre les isolats. L'hypothèse d'un isolement par la distance a été testée par l'analyse de Mantel (Mantel 1967), s'appuyant sur la comparaison de matrices de distances (génétiques et géographiques) et le calcul du coefficient de corrélation r basé sur 1000 répliques, avec l'aide du logiciel R version 2.6.1 et le package `pgirmess` (Giraudoux 2006).

RESULTATS

1. Sélection des cibles microsatellites

A la suite du criblage de la banque d'ADN génomique, réalisée à partir du génome d'*E. granulosus* 3 cibles ont été décrites comme présentant un intérêt dans le génotypage d'*Echinococcus* : EmsJ, EmsK et EmsB.

La cible EmsB était la plus polymorphe, mais son profil électrophorétique était complexe, présentant une série de pics, probablement d'origine multi-allèlique (voir la comparaison entre les profils d'*E. granulosus* 539, 116 et d'*E. multilocularis* CH1 dans la **Figure 6**).

La 1^{ère} partie de ce travail de thèse avait pour but de caractériser cette cible avant d'envisager en 2nd son application en génotypage et de réaliser des études d'épidémiologie moléculaire.

Les premières analyses de fragments ont été réalisées pour les 3 cibles en testant 10 isolats d'*E. multilocularis* et ont permis de mettre en évidence 2 génotypes pour la cible EmsJ, 1 pour la cible EmsK et 7 pour la cible EmsB (**Figures 19 et 21 (a)**).

2. Caractérisation moléculaire de la cible EmsB

2.1. Caractérisation du motif complexe

L'isolement de chacun des pics de l'électrophorogramme EmsB par le clonage des produits de PCR EmsB A/C a permis de clarifier la signification des profils multiples obtenus avec cette cible. Un total de 110 clones a été étudié par analyse de taille des fragments, isolés dans les colonies bactériennes. La **Figure 7** montre que l'addition des fragments obtenus permet de reconstituer un profil électrophorétique. La taille des pics correspondrait au nombre de copies de fragments de même taille. Le coefficient de corrélation entre les intensités de fluorescence des profils initiaux et reconstitués était de 0,74.

La composition nucléotidique de 16 fragments isolés a été déterminée par séquençage. Les différences de tailles révélées par les pics du profil correspondaient à des variations dans le nombre de répétitions du microsatellite présent dans la séquence EmsB A/C (**Tableau 8**).

Le séquençage a de plus fait apparaître que le polymorphisme de la cible était encore plus important que ne le montrait la simple analyse de taille des fragments amplifiés. En effet, pour les 3 isolats CH1, CND et SL1, quatre fragments séquencés ont été comparés après leur alignement (**Figure 8**). Chez SL1 deux fragments présentant la même taille étaient constitués d'un nombre de répétitions $(CT)_i$ $(GT)_j$ différent. Ce polymorphisme caché chez EmsB, non détectable par analyse de fragment démontre l'existence du phénomène d'homoplasie.

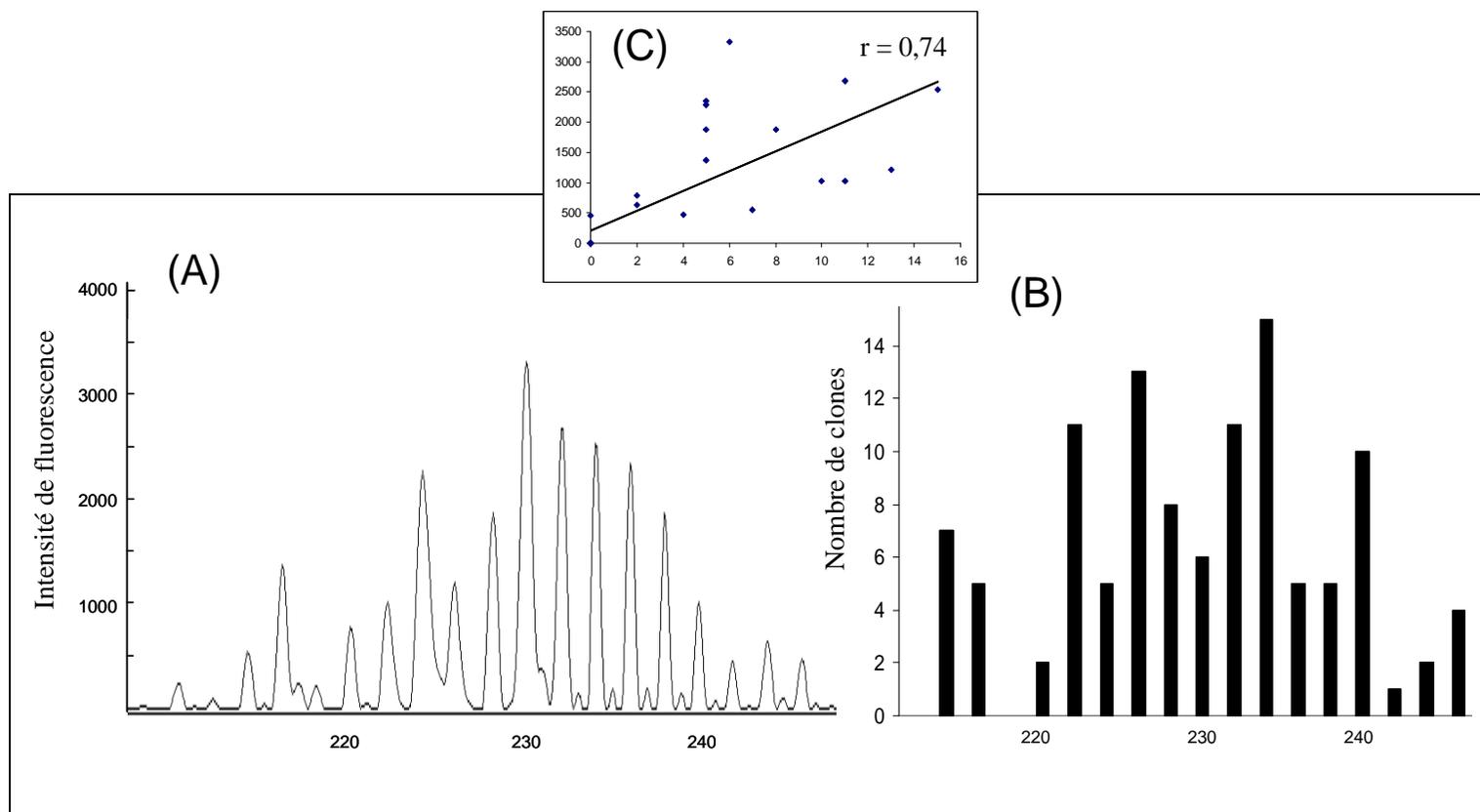


Figure 7 : Relation entre (A) le profil complexe EmsB obtenu par la PCR fluorescente EmsB A/C de l'échantillon CH1 et (B) la répartition des pics EmsB isolés par clonage des produits de PCR EmsB A/C de l'échantillon CH1. (C) le coefficient de corrélation de Pearson r comparant les données d'intensité de fluorescence du profil (A) avec la répartition des 110 clones analysés.

Tableau 8 : Composition des séquences microsatellites EmsB isolées par clonage à partir des produits d'amplification de l'échantillon CH1-h

Taille de fragments (pb)	No du clone	Composition du microsatellite			Taille du microsatellite (pb)
215	7	(CA)7	(GA)4	GGTG (GA)2	30
217	5	(CA)8	(GA)4	GGTG (GA)2	32
221	2	(CA)10	(GA)4	GGTG (GA)2	36
223	11	(CA)8	(GA)4	GGTG (GA)5	38
225	5	(CA)10	(GA)4	GGTG (GA)4	40
227	13	(CA)10	(GA)4	GGTG (GA)5	42
229	8	(CA)11	(GA)4	GGTG (GA)5	44
231	6	(CA)11	(GA)5	GGTG (GA)5	46
233	11	(CA)14	(GA)4	GGTG (GA)4	48
235	15	(CA)14	(GA)4	GGTG (GA)5	50
237	5	(CA)15	(GA)4	GGTG (GA)5	52
239	5	(CA)15	(GA)5	GGTG (GA)5	54
241	10	(CA)15	(GA)6	GGTG (GA)5	56
243	1	(CA)16	(GA)6	GGTG (GA)5	58
245	2	(CA)18	(GA)5	GGTG (GA)5	60
247	4	(CA)20	(GA)4	GGTG (GA)5	62

2.2. Localisation de la séquence EmsB dans le génome d'*E. multilocularis*

La sonde marquée à la digoxigénine EmsB G/H, employée pour localiser la séquence EmsB A/C dans le génome d'*E. multilocularis* a été étudiée par séquençage avant d'être utilisée pour l'hybridation. Deux types de fragments amplifiés étaient visibles sur le gel de séparation (**Figure 9a**). Une séquence de 110 pb correspondant au fragment amplifié par les amorces EmsB G/H et une séquence de 852 pb, comprenant le fragment de 110 pb, les 2 régions flanquantes du microsatellite où sont localisées les amorces, le microsatellite, une séquence de 508 pb, et pour finir la région flanquante en amont du microsatellite (**Figure 10**). Les 2 bandes ont été isolées du gel d'agarose grâce à une trousse d'extraction spécifique (Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, Buckinghamshire, Angleterre). Une nouvelle sonde EmsB G/H marquée DIG a été réalisée à partir de cet extrait, pour permettre une hybridation spécifique limitée à la sonde de 110 pb.

L'hybridation a été réalisée sur les deux produits de digestion des enzymes *AluI* et *PstI*. Elle a révélé pour *E. multilocularis* (CH1 et CND) une bande unique d'environ 600 pb pour la digestion enzymatique *AluI* et une bande unique d'environ 500 pb pour *PstI* (**Figure 9b**). Aucune bande n'a été détectée pour les produits de digestion des ADN de *T. crassiceps* et *A. lumbricoides*.

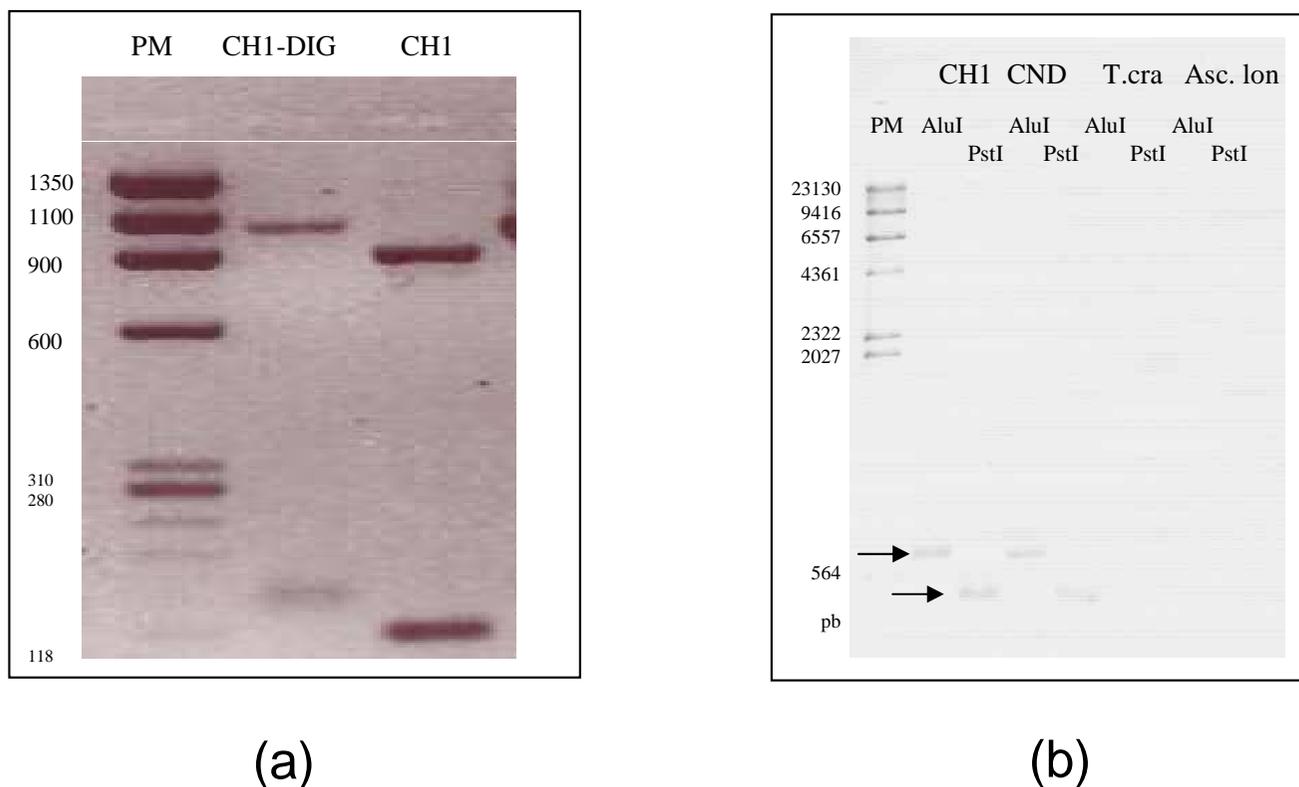
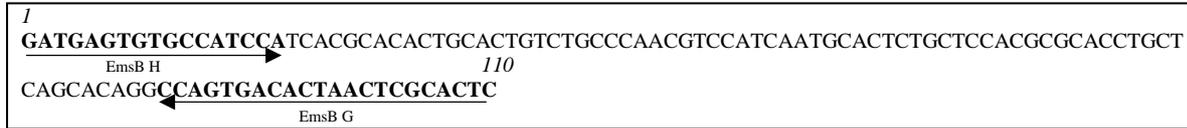


Figure 9 : (a) Réalisation de la sonde EmsB G/H marquée DIG (CH1-DIG) et contrôle positif (CH1) (bande d'intérêt à 110 pb et bande atypique à 900 pb), à partir de l'isolat CH1; (b) Immunodétection de l'hybridation de la sonde EmsB G/H marquée à la digoxigénine avec l'ADN d'*E. multilocularis* digéré par les enzymes *AluI* et *PstI* (CH1 : Suisse ; CND : Canada), d'un autre cestode (*Taenia crassiceps*) et d'un nématode (*Ascaris lumbricoides*) et transféré sur une membrane par Southern blotting. PM : poids moléculaire.



(a)



(b)

Figure 10 : (a) Séquençage du fragment de 110 pb et (b) du fragment de 852 pb, tous deux obtenus lors de la conception de la sonde DIG EmsB G/H. Les couples d’amorces G/H et EmsB A/C sont indiqués sur la figure. Le sens de l’élongation du fragment est indiqué par une flèche. La séquence indiquée en rouge représente le microsatellite.

2.3. Agencement du microsatellite EmsB dans le génome d'*E. multilocularis*

Les PCR réalisées au moyen des amorces EmsB A/B et des amorces inversées EmsB A_{ext}/B_{ext} ont conduit à l'obtention de profils de bandes sur le gel d'agarose. Ces bandes ont été séquencées après leur extraction du gel. Une bande de 0,2 kb représentait la région « inter-fragment », une de 0,6 kb correspondait au fragment EmsB A/B contenant le microsatellite, une de 1 kb contenait 2 régions « inter-fragment » et le fragment EmsB A/B et une de 1,4 kb comprenait 2 microsatellites et une région « inter-fragment » comme représenté dans la **Figure 11**. Le séquençage a permis de reconstituer l'agencement des cibles sur le génome d'*E. multilocularis*. Ces cibles, longues d'environ 800 pb seraient disposées en tandem dans le génome du parasite. Les séquences nucléotidiques des fragments sont rigoureusement identiques à l'exception de la composition et de la taille du microsatellite qui y est inséré.

2.4. Estimation du nombre de copies du microsatellite EmsB dans le génome d'*E. multilocularis*

La technique de PCR quantitative a permis à partir d'une gamme de plasmides recombinants contenant un seul fragment EmsB A/C d'estimer la présence approximative de 10⁴ copies de la séquence EmsB dans le génome d'*E. multilocularis*.

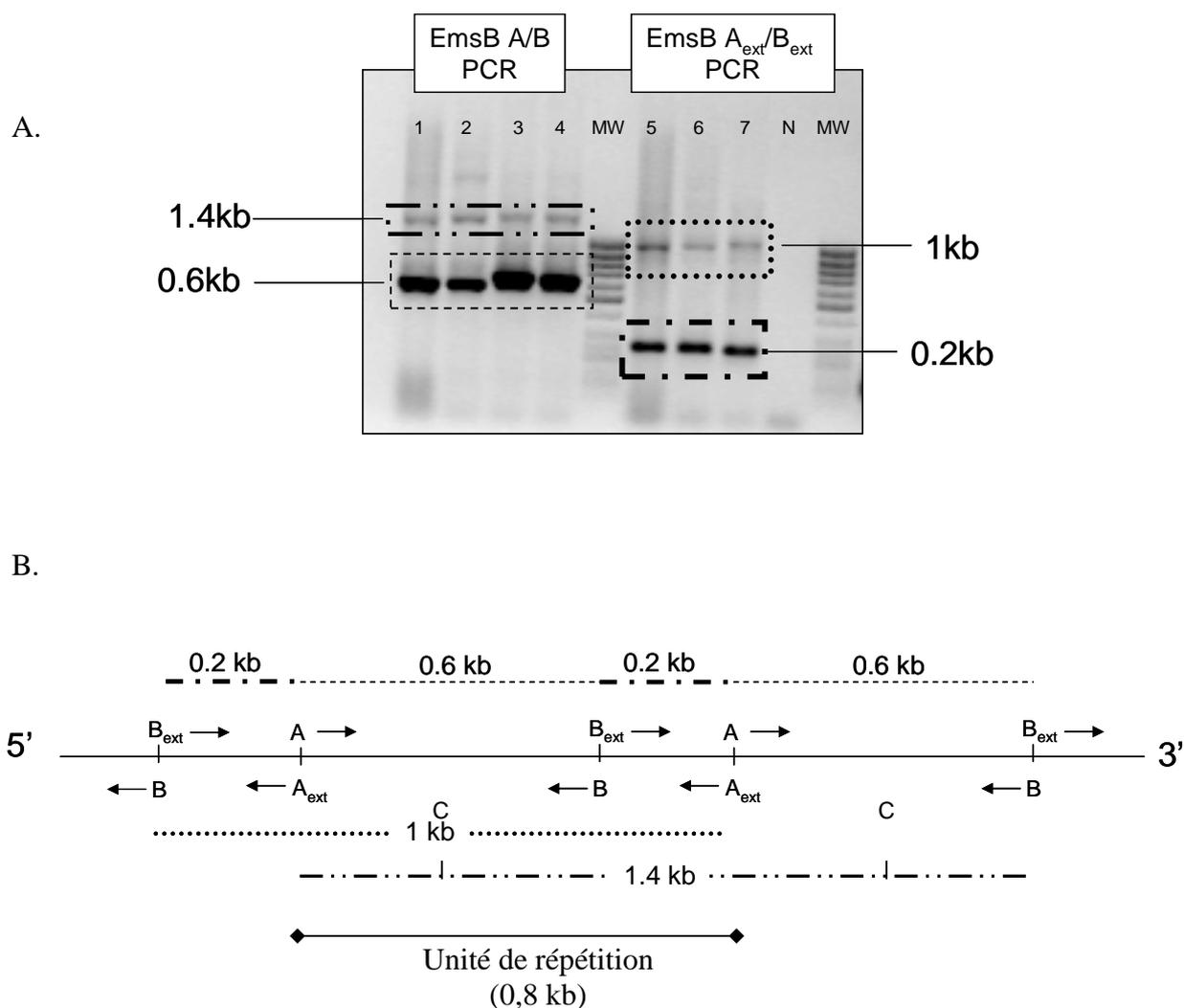


Figure 11 : (A) Produits de PCR séparés sur gel d'agarose après amplification de l'ADN d'*E. multilocularis* par les couples d'amorces EmsB A/B et EmsB A_{ext}/B_{ext}. Lignes 1, 2, 5 et 6 : échantillons *E. multilocularis* ; 3, 4 et 7 : *E. granulosus*, N : contrôle négatif, Mw : pour Molecular weight ou poids moléculaire. (B) Interprétation des bandes de PCR à partir des électrophorèses et de l'analyse des séquences. Le sens de l'élongation du fragment est indiqué par des flèches. Le microsatellite est situé entre A et C.

2.5. Recherche des microsatellites EmsJ, EmsK, NAK1 et EmsB dans le génome d'*E. multilocularis* publié par l'Institut Sanger

Après la publication du génome d'*E. multilocularis* (à partir de l'isolat allemand H59) par l'Institut Sanger en 2008, la présence et l'agencement des microsatellites EmsJ, EmsK, NAK1 et EmsB dans le génome d'*E. multilocularis* a été recherchée.

Les séquences des microsatellites EmsJ et EmsK ont été retrouvées pour chacun d'eux dans un seul fragment publié. La région flanquante en aval du microsatellite d'EmsJ présentait 2 mutations (**Figure 12**). Les régions flanquantes d'EmsK présentaient de nombreuses mutations et une insertion de 15 pb au niveau de l'amorce en aval du microsatellite (**Figure 13**). Le motif de chacun des microsatellites était conservé.

La séquence japonaise EMms1 (N° GenBank AB100031), renommée dans notre étude NAK1 a été trouvée en un seul exemplaire. Une mutation a été trouvée par comparaison au génome complet de l'isolat H59. La séquence microsatellite a montré une grande différence de composition dans les motifs répétés entre les séquences. Ces différences seront étudiées plus tard dans cette partie.

La cible EmsB A/C, incluant le microsatellite et les régions flanquantes a été comparée à la base de données Sanger. La séquence N° 11811 présentée dans le **Figure 14** contenait 4 microsatellites répétés en tandem et 3 séquences « inter-fragments » de 508 pb.

Onze séquences ont montré le plus d'homologie (> 90 %) avec le fragment EmsB A/C issu de l'isolat CH1. Entre 2 et 8 microsatellites EmsB ont été trouvés parmi ces 11 séquences du génome publié, constitués de 2500 à 20 000 pb. Au total pour le fragment EmsB A/C comparé à la base de données, 44 microsatellites ont été trouvés au sein des onze séquences présentant une grande homologie avec ce fragment.

Les sites de restriction des enzymes *AluI* et *PstI* permettent d'expliquer les résultats de l'hybridation de la sonde EmsB G/H (voir sites de restriction sur la **Figure 14**). Les fragments contenant le microsatellite, obtenus par la restriction *AluI* mesuraient environ 650 pb et par *PstI* environ 500 pb. Ces tailles de fragments correspondaient aux spots d'hybridation retrouvés sur la membrane de Southern blotting pour chaque enzyme (**Figure 9b**).

Cette démarche originale de caractérisation de la cible EmsB avait donc permis d'élucider la nature complexe de ce microsatellite multilocus répété en tandem.

```

      |.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      710      720      730      740      750
Contig_4805 CGATCTGCGC CGCAAAGGT GCGCTCGCCC TCGGGTGGGC TCGAACCACC
EmsJ        -----..... C ..A.....

      |.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      760      770      780      790      800
Contig_4805 AACCTTTCGG TTAACAGCC AACGCGCTAA CCGATTGCGC CACGAAGGCT
EmsJ        .....

      |.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      810      820      830      840      850
Contig_4805 GCCTTGCCAC GCGCTACACT GCTTTGCCAT CCGCAAGCCG CCGCCTCTTC
EmsJ        .....TT.. A..... ..A..... .....T ..... C..

      |.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      860      870      880      890      900
Contig_4805 TCTCTCTCTC CCTC----- -CACCACCAC CTCGCCATCT GCAACACTAC
EmsJ        ..... T...TCTCTC T.T.....N ..... C.....T

      |.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      910      920      930      940      950
Contig_4805 CTCACCATCG CCATCACCTT CCCATTCCCTA AGCCGTGCAC ACACACACAC
EmsJ        ....T..... .GA..... .....

      |.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      960      970      980      990      1000
Contig_4805 ACACACACAC ACACACACCC ATGGACGCAG CATGAGCATG CAGTTGCGTG
EmsJ        -----CC ..... N..... N...

      |.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1010     1020     1030     1040     1050
Contig_4805 TGAGCAGGGT GTAGTGAGGG TGAGGAAGCA GTCGAGTCGA TTGGC-ACTG
EmsJ        ...A..... ..... C.GA..... .....T N...NC.N..

      |.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1060     1070     1080     1090     1100
Contig_4805 CATGGG-GAG CGCTGAGACA GCGCGACCAA CGCTACACAT GG-TAGAGCG
EmsJ        .T....A... .A. ....AA .....A... ..... ..G..A....

      |.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1110     1120     1130
Contig_4805 CA-GCCAATG G-CTTGCCAC CTCAATG-TC ATTATGCC
EmsJ        ..A..... .GN...N... .....G.. .....--

```

Figure 12 : Comparaison entre la séquence EmsJ obtenue après amplification de l'isolat CH1 et la séquence publiée N° 4805 (Institut Sanger). Les séquences surlignées en rouge correspondent aux amorces EmsJ A/B. La séquence surlignée en rose correspond à la séquence du microsatellite.

```

      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
      510      520      530      540      550
Contig_18680 CTGGACGATG AAACCGACAG TAAAAAATGA AAGATCTCCA CTTTGATCCT
EmsK         -----
      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
      560      570      580      590      600
Contig_18680 TACCTTCCCT TGGTGTACTT TTCGAGGAAG TAAGAAAATT GCCATCCGAA
EmsK         -----A.G.C. GCA.GTCG.C .CTAG.GC-----
      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
      610      620      630      640      650
Contig_18680 TGCCTTTATT CAAGGCGAGG TCTGTGTGTG TGTATGTG-- -----GTT
EmsK         .....G....TG TGTGTGT.G.
      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
      660      670      680      690      700
Contig_18680 TTATTAGAAG GGGGAGAGGG GTGGGCTTTT AAGGGTCTGA AAATCCCACA
EmsK         .....T
      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
      710      720      730      740      750
Contig_18680 TTAGGGTGTC AGCTAGAACA CACGCGCGCA CTCACGCATG CACGCACGTG
EmsK         .....-----
      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
      760      770      780      790      800
Contig_18680 CATTTGTTTG GCCCTCCGTG ACTGGCCCAG CCGCGGCCAA TGATCGCGT-
EmsK         .G.....AAACC
      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
      810      820      830      840      850
Contig_18680 GTCTAGGCGA CTGCGGACTG CAGGCGATAT AAATACGCAC AGCACCGAGC
EmsK         .A.C..A.TT AAAG.GCTGA .AAAT..G.G GG.---.G.. ...TG.C.A.
      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
      860      870      880      890      900
Contig_18680 ATTGGACCGC GCTGTTAGTA CTGATCTCTC GCTCCGTGCG CGTGTATCTT
EmsK         GCGTAGATA. AGA.G.GC-- -----

```

Figure 13 : Comparaison entre la séquence EmsK obtenue après amplification de l'isolat CH1 et la séquence publiée N° 18680 (Institut Sanger). Les séquences surlignées en rouge correspondent aux amorces EmsJ A/B. La séquence surlignée en rose correspond à la séquence du microsatellite.

3. Validation de la technique de typage basée sur le polymorphisme de la séquence EmsB

3.1. La sensibilité de l'amplification

L'amplification de la cible EmsB, réalisée avec un gradient d'ADN (1 ng à 1 fg) a permis de déterminer que la quantité minimale nécessaire pour une PCR EmsB efficace était de 1 fg d'ADN.

3.2. La spécificité de l'amplification

L'ADN des hôtes principaux du parasite (rongeur, homme et renard) n'a pas été amplifié avec les amorces EmsB A/C.

Les isolats *E. granulosus sensu stricto*, *E. canadensis*, *E. vogeli* et *E. shiquicus* ont fourni des résultats positifs pour l'amplification d'EmsB (**Figure 15**). Pour le reste du panel d'helminthes, un pic unique a été observé pour 2 isolats de *Taenia saginata* (233 pb pour les échantillons p9 et p10) et l'isolat *Taenia crassiceps* (217 pb). Une série de pics comparables à ceux d'*Echinococcus* spp. a été trouvée pour un troisième isolat de *T. saginata* (p3), ainsi que

pour *Taenia taeniformis* (p8). Aucun des nématodes et aucun des protozoaires testés n'a montré d'amplification positive pour la cible EmsB.

3.3. Reproductibilité et répétabilité

La **Figure 16** montre les électrophorégrammes de 3 échantillons d'*E. multilocularis* (1AL : rongeur d'Alaska, 31CH : homme suisse et 116D : renard allemand), réalisés sur l'automate CEQ 8000 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) à Besançon (France) et sur l'automate ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA) à Berne (Suisse). Le coefficient r a été calculé entre chaque pic de fluorescence constituant le profil et était compris entre 0,92 et 0,99 ($p < 0,001$).

La répétabilité des techniques a été testée sur l'isolat 302PL et amplifié dans 5 tubes réactionnels différents. Après normalisation des profils, la déviation standard (σ) calculée avec les distances génétiques de ces 5 répétitions était de $\sigma = 3,1 \times 10^{-3}$ pour les résultats obtenus sur l'automate ABI Prism 3100 et $6,3 \times 10^{-3}$ pour l'automate Beckman CEQ 8000.

Taille de fragments (paire de bases)

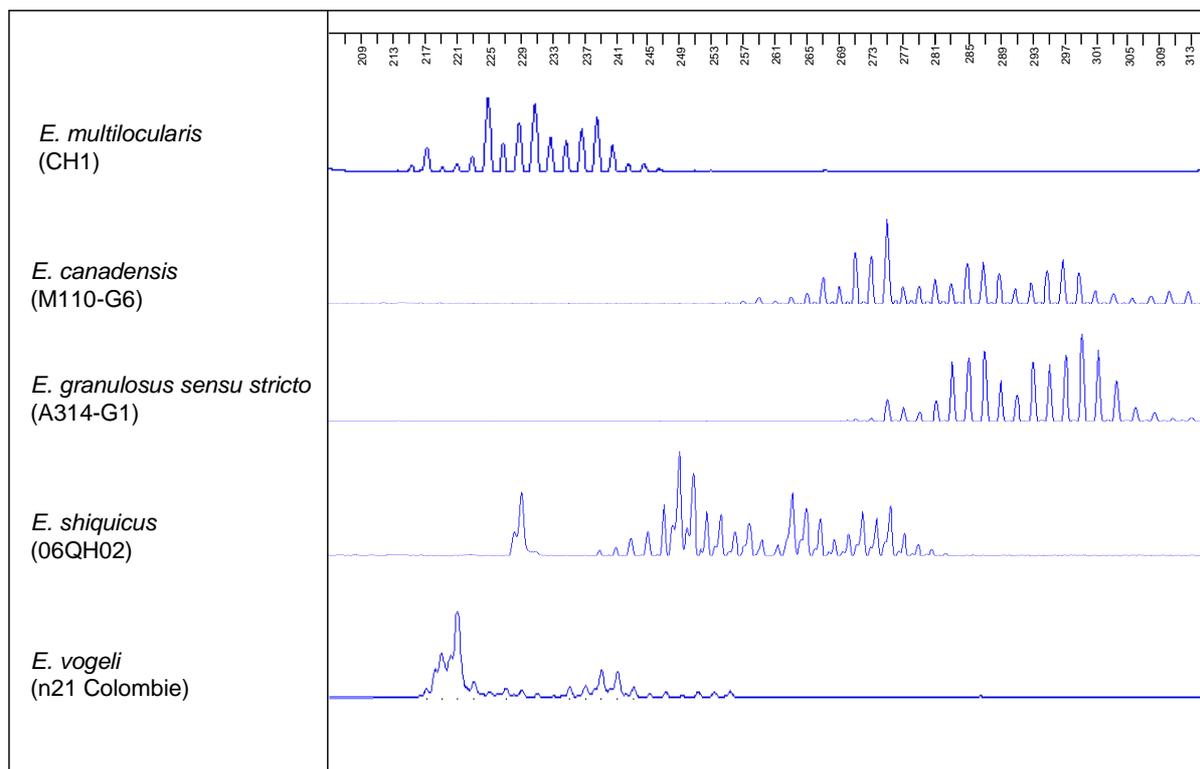


Figure 15 : Electrophorégrammes des analyses de fragments de la cible EmsB pour *E. multilocularis* (CH1 : Suisse, hôte homme), *E. canadensis* (M110 : Mauritanie, hôte dromadaire), *E. granulosus sensu stricto* (A314 : Algérie, hôte ovin), *E. shiquicus* (06QH02 : province du Qinghai, Chine, hôte pika) et *E. vogeli* (n21 : Colombie, hôte rongeur).

3.4. Stabilité dans le temps

La souche d'*E. multilocularis* F AUB-2, maintenue par des inoculations successives chez différentes gerbilles (**Tableau 4**) a été testée en amplifiant la cible EmsB A/C pour 3 isolats prélevés sur un intervalle de 7 mois, dans le but d'évaluer la stabilité du microsatellite dans le temps. La comparaison des électrophorégrammes des 3 lésions est montrée dans la **Figure 17**. La moyenne des distances génétiques entre les 3 isolats, calculée après normalisation du profil était de 0,0266 et la déviation standard de 0,0177. Un seuil de distance génétique a été calculé à partir de ces résultats en ajoutant 3 déviations standard à la moyenne des distances génétiques existant entre les 3 isolats. La valeur seuil était alors à 0,08. Cette valeur minimale a été retenue pour différencier des isolats très semblables. En dessous de ce seuil les échantillons sont considérés comme soit très similaires soit identiques. Au-delà de ce seuil, les échantillons sont considérés comme génétiquement différents.

3.5. Amplification par PCR des pré-fèces et fèces terrain

Douze prélèvements coprologiques rectaux ont été étudiés parmi le panel de renards collectés sur les plateaux de Maîche et Morteau. Les cibles EmsB et ND1 ont été étudiées dans le but de tester leur sensibilité d'amplification pour la détection du parasite dans les fèces du renard. Les résultats des amplifications sont présentés dans le **Tableau 9**. Neuf prélèvements de renards positifs (charges parasitaires intestinales entre 2 et 680 vers adultes) et trois pré-fèces provenant de renards non parasités ont été testés. La majorité des prélèvements effectués chez les renards positifs se sont révélés positifs pour EmsB, à l'exception du renard portant une charge de 2 vers. La cible ND1 n'a pu être amplifiée que pour 3 prélèvements, à partir de charges parasitaires supérieures ou égales à 170 individus.

L'ensemble des fèces prélevées sur le terrain a été testé pour les cibles ND1, BG1/3 et EmsB. Un seul échantillon sur 31 fèces terrain a été trouvé positif pour les trois cibles (identifié comme *E. multilocularis* à 98 % pour ND1 et 94 % pour BG1/3).

La persistance d'inhibiteurs de PCR a été mise en évidence pour 2 fèces terrain négatives.

La **Figure 18** reprend quelques exemples de profils électrophorétiques obtenus par amplification de la cible EmsB A/C sur des vers adultes, des pré-fèces et fèces terrain.

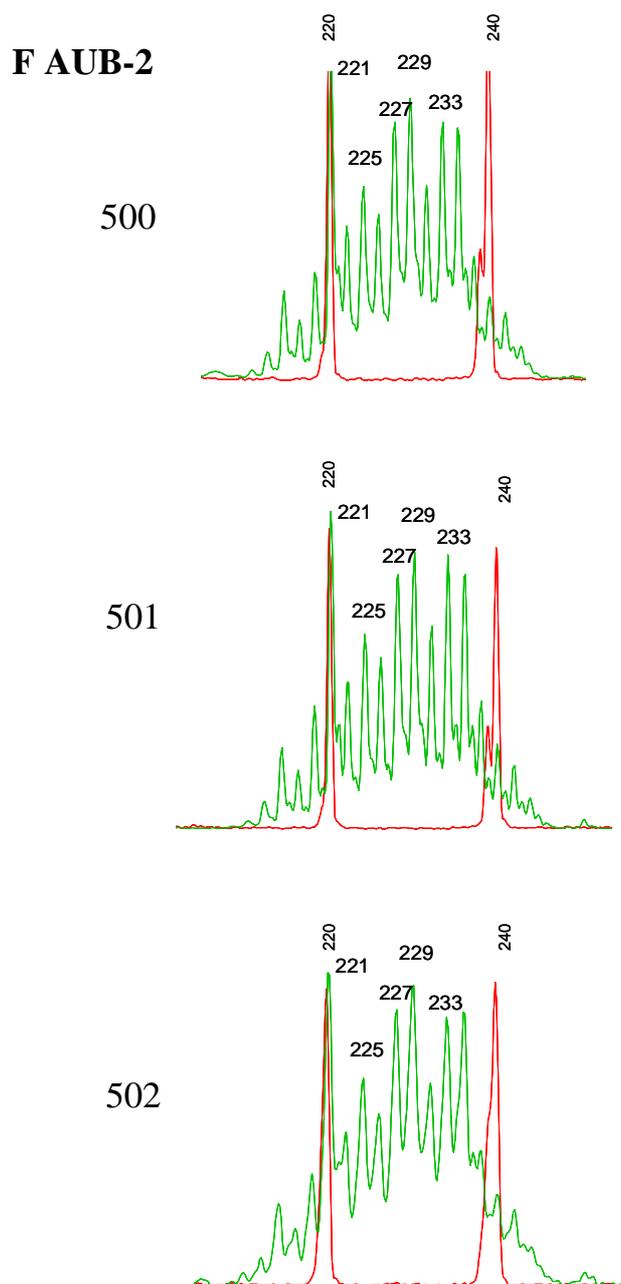


Figure 17 : Test de stabilité dans le temps des profils électrophorétiques du microsatellite EmsB. La souche F AUB-2 a été successivement inoculée à différentes gerbilles et extraite sur une période de 7 mois (F AUB-2 : (500) mars 1991, (501) mai 1991 et (502) février 1992). Le tracé rouge correspond au marqueur de taille. Les électrophorégrammes ont été réalisés sur l'automate CEQ 8000 (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

Tableau 9 : Panel de pré-fèces étudiées par copro-PCR ND1 et EmsB chez 9 renards du Haut-Doubs parasités par *E. multilocularis* et 3 témoins non parasités. La charge parasitaire comprend le nombre de vers estimé par renard, (+) identification du ver *E. multilocularis* / résultat positif sur gel d'agarose et confirmé par séquençage (pour le marqueur ND1) ou par analyse de fragments (pour le marqueur EmsB), (-) pas de ver trouvé à la surface de la muqueuse intestinale / amplification négative.

Code renard	Charge parasitaire	Diagnostic morphologique	Copro-PCR ND1	Copro-PCR EmsB
RU1	0	(-)	(-)	(-)
RU2	0	(-)	(-)	(-)
Gant Velage 7	0	(-)	(-)	(-)
RU4	2	(+)	(-)	(-)
MOR8	4	(+)	(-)	(+)
Gant Blanc 3	30	(+)	(-)	(+)
Gant Velage 8	110	(+)	(-)	(+)
M7	170	(+)	(+)	(+)
M6 coupé	180	(+)	(-)	(+)
Gant Velage 4	410	(+)	(+)	(+)
Gant Velage 6	680	(+)	(-)	(+)
M5	630	(+)	(+)	(+)

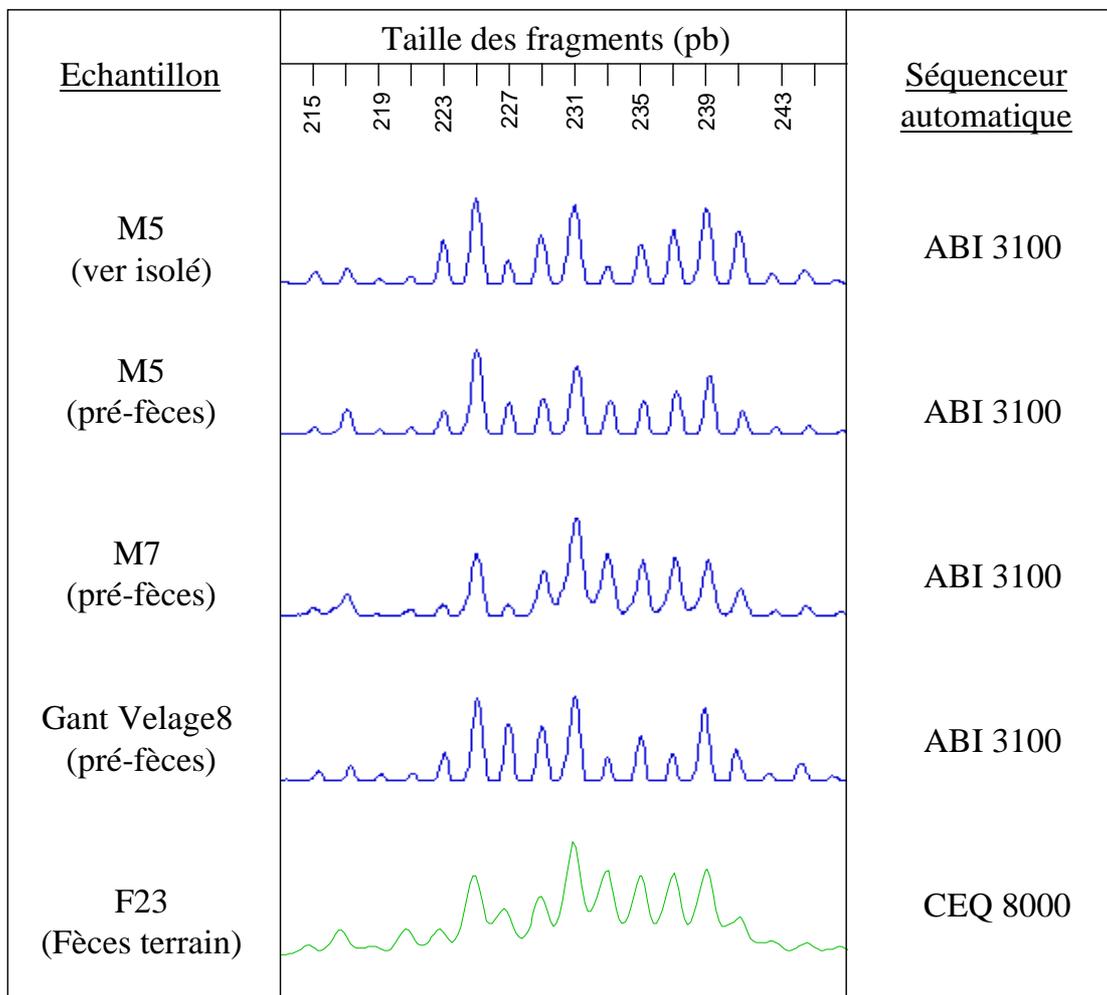


Figure 18 : Analyses de fragments de la cible EmsB comparées entre un ver *E. multilocularis* isolé (renard M5), 3 pré-fèces (M5, M7 et Gant Velage 8) et une selle prélevée sur le terrain (F23). L'automate utilisé pour réaliser l'analyse est indiqué à droite de la figure (ABI Prism 3100, Applied Biosystems et CEQ 8000, Beckman Coulter).

4. Comparaison du pouvoir discriminant de différentes cibles microsatellites

4.1. Les microsatellites simple-locus EmsJ, EmsK et NAK1

L'analyse de fragments des microsatellites EmsJ et EmsK a mis en évidence 2 allèles pour chaque cible, dans le panel mondial d'échantillons, constituant des génotypes « homozygotes » (allèles unique à 152 pb pour EmsJ et à 248 et 252 pb pour EmsK), et un génotype « hétérozygote » uniquement chez EmsJ (152-155 pb) (**Figure 19**). Le panel européen était représenté par deux génotypes « homozygotes » (EmsJ : 152 pb ; EmsK : 248 pb). Le génotype « hétérozygote » EmsJ a été retrouvé pour l'ensemble des isolats d'Alaska, du Canada, de Chine et du Japon. Le génotype EmsK à 250 pb n'a été trouvé que chez un isolat d'Alaska. Le reste du panel mondial présentant un génotype EmsK à 248 pb. Le taux d'hétérozygotie fourni par l'étude du marqueur EmsJ était de 33 % (**Tableau 10**).

L'indice de discrimination de Hunter (D) était de 0,37 pour EmsJ, avec 2 groupes constitués et 0,03 pour EmsK avec 3 groupes.

Un échantillon suisse n'a pas pu être amplifié pour la cible EmsK.

Le microsatellite NAK1, issu de la littérature a été ici étudié à partir d'autres amorces que celles publiées en 2003 par Minoru Nakao et collaborateurs (Nakao et al. 2003). La définition des amorces au Laboratoire de Besançon a été réalisée avant cette publication, à partir des séquences disponibles sur la base de données GenBank. Les amplifications ont alors fourni des tailles de fragments différentes de celles décrites par l'équipe de Nakao. Une différence de 30 pb a été observée et correspondait à l'utilisation spécifique de nos amorces.

Deux nouveaux allèles ont été décrits par l'étude du panel mondial, portant à un total de 5 allèles pour ce microsatellite (**Figure 20**). Cinq génotypes « homozygotes » ont été décrits : 189 pb trouvé uniquement chez les échantillons tibétains, 192 pb trouvé en Amérique du Nord et en Suisse, 195 et 198 pb largement retrouvés parmi les échantillons et 201 pb trouvé uniquement en Suisse. Deux génotypes « hétérozygotes » ont été décrits : 195-198 pb trouvé en Alaska et en Europe et 198-201 pb trouvé uniquement en Pologne. Le taux d'hétérozygotie calculé était alors pour la cible NAK1 de 5,88 % (**Tableau 10**).

L'indice de discrimination de Hunter (D) était de 0,73 avec 7 groupes constitués.

Un total de 7 isolats d'Alaska n'a pas pu être amplifié malgré l'utilisation de l'enzyme de haute fidélité AmpliTaq GOLD (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Tableau 10 : Résultats de l'analyse de fragments des microsatellites EmsJ, EmsK et NAK1. Code pays = AL : Alaska; CND: Canada; RPC : Chine; J: Japon; F: France; CH : Suisses; D: Allemagne; A: Autriche; PL : Pologne; CZ: Tchéquie; SK: Slovaquie; NL: Pays-Bas. Animal hôte = r : rongeur; h: homme; m: singe (*monkey*); F: renard (*fox*). aNA : non amplifié.

Pays-hôte	No. d'isolats	Allèles EmsJ		Allèles EmsK			Allèles NAK1							
		Homoz. 152	Hétéroz. 152+155	Homoz. 248	Homoz. 255	NA ^a	Homoz. 189	Homoz. 192	Homoz. 195	Homoz. 198	Homoz. 201	Hétéroz. 195+198	Hétéroz. 198+201	NA ^a
AL-r	10	0	10	9	1	0	0	3	1	0	0	0	0	6
AL-h	3	0	3	3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
CND-r	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
RPC-r	5	0	5	5	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0
J-h	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
J-F	5	0	5	5	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0
F-h	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
F-F	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
CH-r	11	11	0	11	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0
CH-h	7	7	0	6	0	1	0	1	1	1	4	0	0	0
CH-m	6	6	0	6	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0
CH-F	3	3	0	3	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0
D-h	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
D-F	5	5	0	5	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0
A-h	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
A-F	3	3	0	3	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0
PL-F	4	4	0	4	0	0	0	0	0	3	0	0	1	0
CZ-F	3	3	0	3	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0
SK-F	3	3	0	3	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
NL-F	2	2	0	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0

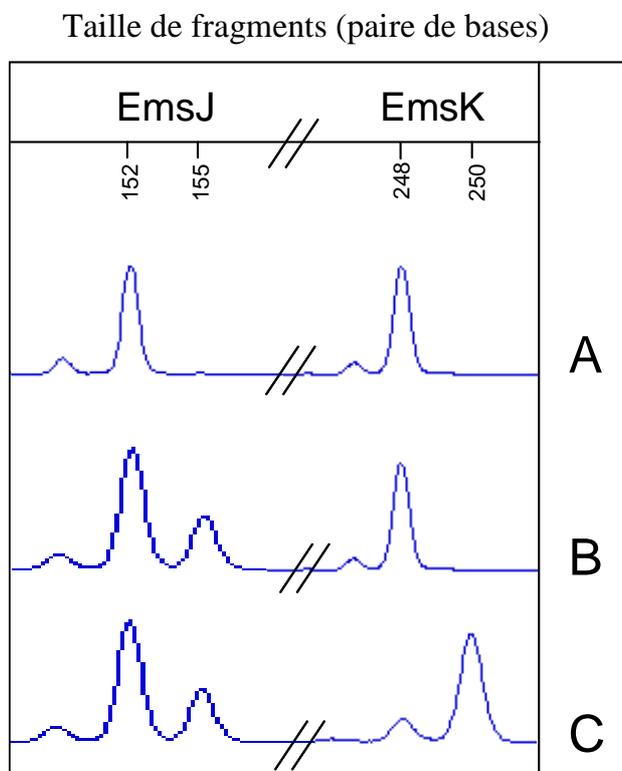


Figure 19 : Electrophorégrammes des loci d'EmsJ (152 et 155 pb) et EmsK (248 et 250 pb), réalisés avec le séquenceur automatique ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). A : génotype européen; B : génotype asiatique, d'Alaska et du Canada et C : génotype d'Alaska (trouvé chez un seul isolat).

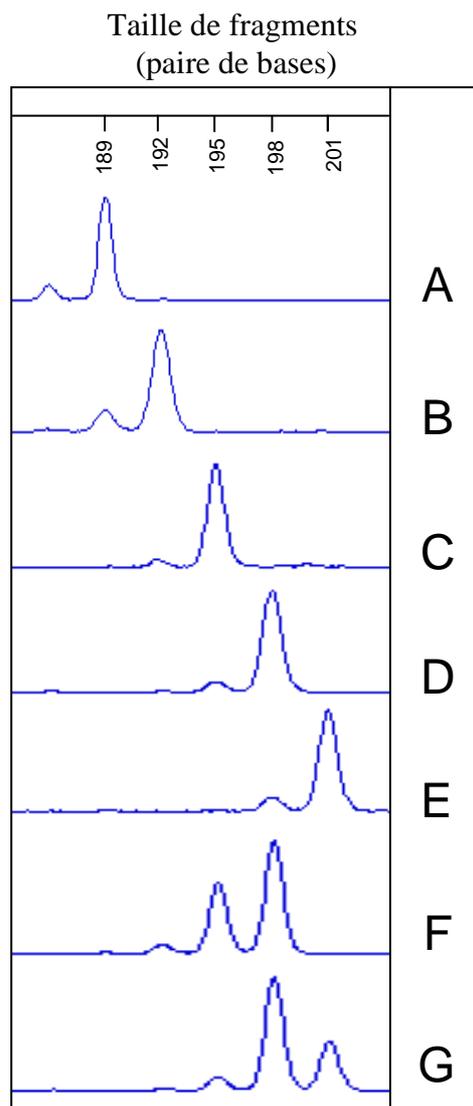


Figure 20 : Electrophorégrammes des loci NAK1 (192 à 201 pb), réalisés avec le séquenceur automatique ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Origines géographiques des isolats présentant les génotypes A à G ; A : Chine ; B : Alaska, Canada et Suisse ; C : Alaska, Japon, Suisse, Allemagne, Autriche, Tchéquie Pays-Bas ; D : Japon et Europe; E : Suisse; F : Alaska, Suisse Autriche et G : Pologne.

4.2. Le microsatellite multilocus EmsB

La cible EmsB a été amplifiée avec succès pour la totalité du panel. Un profil électrophorétique complexe a été obtenu pour chaque isolat, fournissant un total de 17 allèles (209 à 241 pb). Les profils électrophorétiques principaux retrouvés parmi les isolats du panel mondial sont donnés dans la **Figure 21a**.

Les données obtenues sur l'automate ABI Prism 3100 ont été retenues pour construire le dendrogramme des distances génétiques (**Figure 21b**).

La robustesse des regroupements a été testée par une réitération de la construction de l'arbre 1000 fois. Le groupe extérieur constitué par 2 échantillons d'*E. granulosus* a permis d'obtenir une valeur maximale de 0,5 de distance génétique.

Le seuil de distance génétique, déterminé lors de l'évaluation de la stabilité des profils EmsB, a été appliqué au dendrogramme pour permettre de distinguer des assemblages de profils. Parmi l'ensemble des échantillons, 29 assemblages de profils ont été distingués. L'indice de discrimination de Hunter était alors de 0,94.

Trois grands groupes régionaux ont été définis à partir de ce dendrogramme : Alaska, Asie et Europe. A l'intérieur de ces groupes régionaux, différents profils se distinguaient. L'assemblage A regroupait 12 des 13 échantillons d'Alaska. Les assemblages B et C représentaient le groupe asiatique (respectivement tibétain et japonais). Les assemblages D à H représentaient les échantillons européens. Par l'application de la valeur de distance génétique au dendrogramme, 23 assemblages ont été mis en évidence parmi le panel des 51 isolats européens (**Figure 21**).

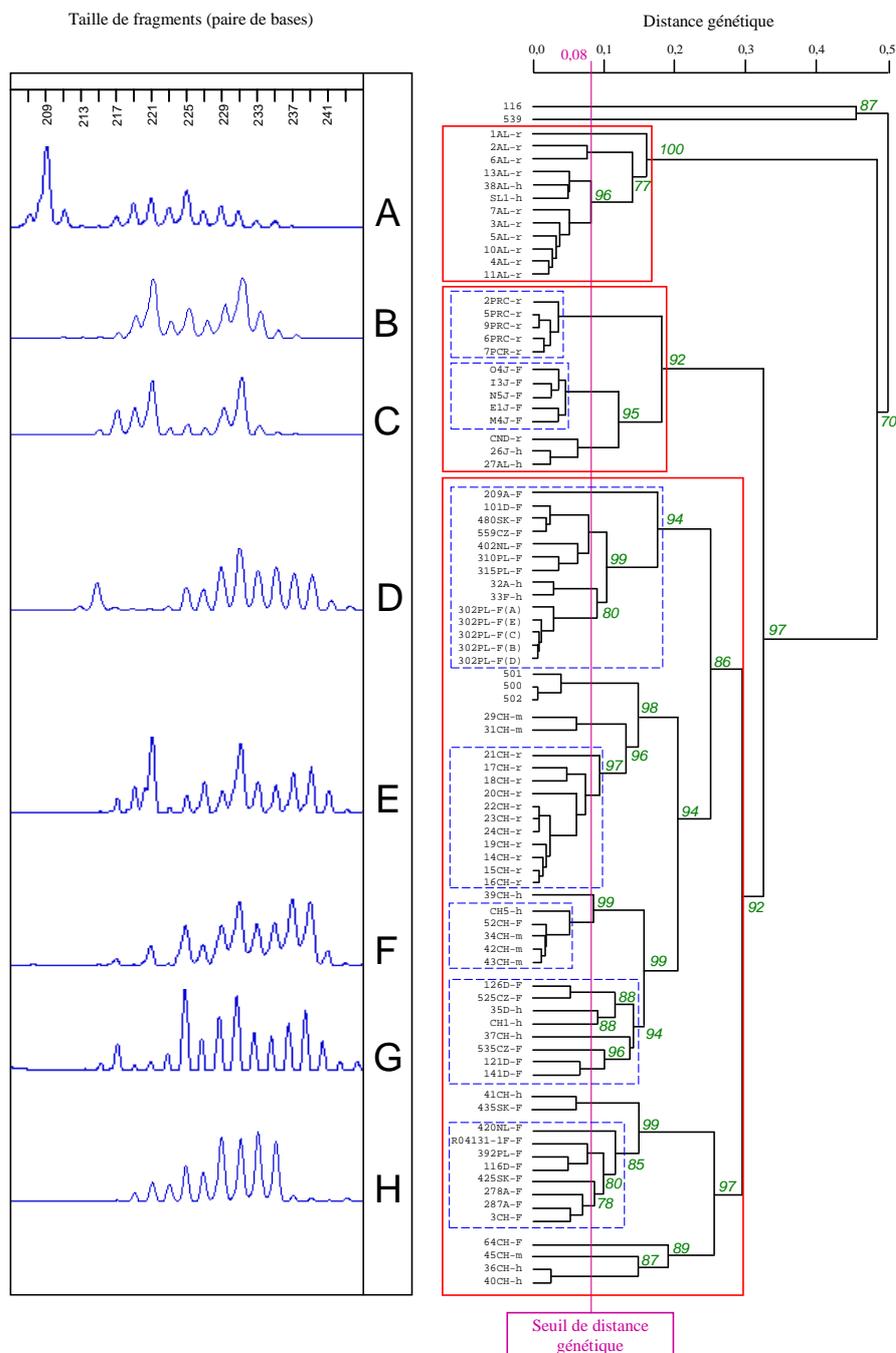


Figure 21 : Regroupement hiérarchique des isolats du panel mondial d'*E. multilocularis* à partir des résultats d'EmsB. (a) Exemple d'électrophorogrammes obtenus grâce à l'automate ABI Prism 3100 ; (b) dendrogramme réalisé grâce aux données génétiques EmsB. Le pourcentage de réitérations donnant cet agencement des isolats sont donnés aux noeuds de chaque branche. Les 3 rectangles rouges montrent les isolats de l'île St. Laurent (supérieur), les isolats d'Asie et d'Amérique du Nord (moyen) et les isolats européens (bas). Les électrophorogrammes correspondent dans l'arbre au profils (A) du Saint Laurent, (B) tibétain, (C) japonais, et (D) à (H) principaux européens. Isolats 500, 501 et 502 (souche F AUB-2) maintenues *in vivo* par passages successifs chez *Meriones unguiculatus*. Groupe extérieur : *E. canadensis* (116, dromadaire, Mauritanie) et *E. granulosus sensu stricto* (539, ovin, Algérie). Ligne rose : seuil de distance génétique (0,08).

5. Etude de la diversité génétique du parasite *E. multilocularis* à différentes échelles géographiques

5.1. Echelle micro-locale : étude de populations de parasites isolées de rongeurs capturés dans un même champ

La diversité génétique a été étudiée entre des isolats de métacestodes issus de rongeurs spatialement liés. Les rongeurs du champ de Fribourg ont présenté les mêmes génotypes EmsJ (152 pb), EmsK (248 pb) et NAK1 (195 pb) (**Figures 19** et **20**). Dix lésions sur onze ont présenté le même profil EmsB (**Figure 21**). La moyenne des distances génétiques entre les profils EmsB était de 0,05 et σ de 0,02. Par comparaison à cette situation rencontrée en Europe, 10 lésions de rongeurs d'un champ près de Savoonga ont été étudiées de la même manière. Ils présentaient tous le même génotype EmsJ (152-155 pb), 9 sur 10 présentait le génotype EmsK (248 pb et 1 isolat à 255 pb). L'amplification de NAK1 n'a été possible que pour 4 lésions, malgré l'utilisation de différentes ADN polymérases, l'emploi de différents couples d'amorces et de conditions d'amplification différentes (données non montrées). Trois isolats présentaient le même génotype NAK1 (192 pb et 1 isolat à 195 pb) (**Figures 19** et **20**). Sept lésions sur dix ont présenté le même profil EmsB (**Figure 21**). La moyenne des distances génétiques entre les profils EmsB était de 0,095 et σ de 0,06.

5.2. Echelle locale : étude d'une population de parasites hébergés par des renards des Ardennes françaises

Cent quarante vers ont été isolés de 25 renards, à partir du panel initial des 79 renards infestés par *E. multilocularis*. Vingt-et-un renards présentaient des charges parasitaires basses à moyennes et 4 de fortes charges (**Tableau 11**). Le renard R03056 présentait une forte charge, mais seulement 5 vers entiers et gravides ont pu être isolés. L'ensemble des renards étudiés portait une biomasse parasitaire totale de 175897 vers.

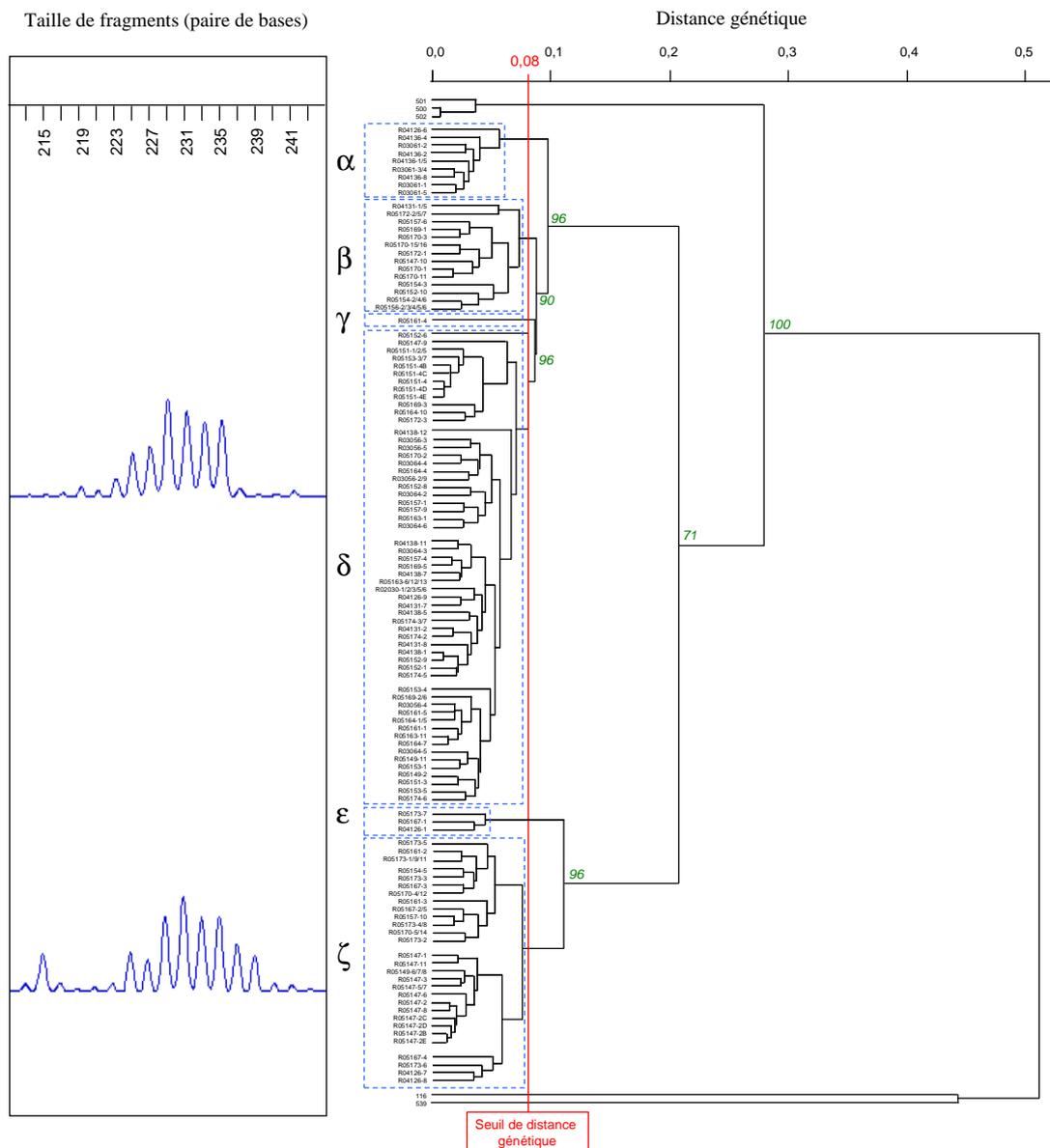
5.2.1. Le microsatellite multilocus EmsB

Le panel d'*E. multilocularis* présentait deux assemblages EmsB principaux A et B, dont les électrophorégrammes sont présentés dans la **Figure 22a**. Ces deux assemblages ont été identifiés par analyse de regroupement hiérarchique et présentaient entre eux une distance génétique de 0,21 (**Figure 22b**). Le seuil de distance génétique de 0,08 a été appliqué au dendrogramme, permettant de différencier six sous-groupes ou profils EmsB parmi les 2 assemblages A et B. Ces profils ont été nommés α à ζ dans la **Figure 22b** et leurs effectifs sont détaillés dans le **Tableau 11**. Deux sous-groupes appartenaient à l'assemblage A, représentant 26,4 % du panel d'échantillons. Ces profils étaient caractérisés par un allèle à 215 pb suivi d'une série d'allèles de 225 à 239 pb. Quatre profils appartenaient à l'assemblage B (73,6 % du panel) et étaient caractérisés par une série d'allèles rangés entre 225 et 235 pb. Le profil δ a été retrouvé chez 19 renards sur un total de 25 individus. Sept renards portaient des vers correspondant aux 2 assemblages A et B et 6 renards hébergeaient des vers appartenant à 2 sous-groupes d'un même assemblage (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Description et caractéristiques du panel de renards roux ardennais et de leurs charges parasitaires respectives. Les codes des renards soulignés représentent les charges parasitaires hautes (> 10'000 vers).

Code renard	Code région ^a	Charge Em ^b totale	Date de prélèvement	No. de vers	Assemblages EmsB		Génotypes NAKI				
					A	B	195	198	201	198-201	NA ^c
R02030	[55]	4247	24/02/2002	5	0	5 ^δ	0	5	0	0	0
<u>R03056</u>	[08]	18630	10/02/2003	5	0	5 ^δ	0	5	0	0	0
R03061	[08]	1290	09/03/2003	5	0	5 ^α	0	0	0	0	5
R03064	[08]	1797	04/04/2003	5	0	5 ^δ	0	4	0	0	1
R04126	[08]	1230	02/11/2004	5	3 ^{ε; ζ}	2 ^{α; δ}	3	1	0	0	1
R04131	[08]	46	19/11/2004	5	0	5 ^{β; δ}	0	5	0	0	0
R04136	[55]	30	07/12/2004	5	0	5 ^α	0	0	0	0	5
R04138	[08]	190	18/12/2004	5	0	5 ^δ	0	4	0	0	1
<u>R05147</u>	[08]	16510	15/01/2005	10	8 ^ζ	2 ^{β; δ}	0	10	0	0	0
R05149	[08]	14	30/01/2005	5	3 ^ζ	2 ^δ	3	2	0	0	0
R05151	[08]	1430	07/02/2005	5	0	5 ^δ	0	5	0	0	0
R05152	[08]	38	13/02/2005	5	0	5 ^{β; δ}	0	3	1	0	1
R05153	[08]	2470	14/02/2005	5	0	5 ^δ	0	5	0	0	0
R05154	[08]	4697	15/02/2005	5	1 ^ζ	4 ^β	1	4	0	0	0
R05156	[08]	3522	16/02/2005	5	0	5 ^β	0	5	0	0	0
R05157	[08]	420	17/02/2005	5	1 ^ζ	4 ^{β; δ}	1	4	0	0	0
R05161	[08]	1820	03/03/2005	5	2 ^ζ	3 ^{γ; δ}	2	3	0	0	0
R05163	[08]	26	07/03/2005	5	0	5 ^δ	0	5	0	0	0
R05164	[08]	18	10/03/2005	5	0	5 ^δ	0	0	5	0	0
R05167	[08]	6520	27/04/2005	5	5 ^{ε; ζ}	0	0	5	0	0	0
R05169	[08]	117	04/05/2005	5	0	5 ^{β; δ}	0	4	0	0	1
<u>R05170</u>	[08]	73380	13/05/2005	10	4 ^ζ	6 ^{β; δ}	0	0	4	6	0
R05172	[08]	4870	16/05/2005	5	0	5 ^{β; δ}	0	5	0	0	0
<u>R05173</u>	[08]	32520	10/06/2005	10	10 ^{ε; ζ}	0	10	0	0	0	0
R05174	[08]	65	13/06/2005	5	0	5 ^δ	0	5	0	0	0

^aCode région : [08] pour les Ardennes, [55] pour la Meuse, ^bEm, *E. multilocularis*; ^cNA, amplification non réussie ; α, β, γ, δ, ε, et ζ pour les sous-groupes des assemblages EmsB A et B.



(a)

(b)

Figure 22 : (a) Electrophorégrammes des analyses de fragments de la cible EmsB réalisées à partir du panel d'isolats de vers adultes des Ardennes, obtenues grâce à l'automate ABI Prism 3100. Les principaux profils représentent l'assemblage A pour l'électrophorégramme du bas et l'assemblage B pour l'électrophorégramme du haut ; (b) Dendrogramme des données génétiques d'EmsB analysées par regroupement hiérarchique. Les pourcentages de réitération sont donnés à chaque nœud de l'arbre. Groupe extérieur : *E. canadensis* (116, dromadaire mauritanien) et *E. granulosus sensu stricto* (539, ovin algérien). Les isolats 500, 501 et 502 (souche F AUB-2 maintenue *in vivo* chez *Meriones unguiculatus*) par différents passages successifs, ont permis d'obtenir la valeur du seuil de distance génétique (0,08). Les 6 rectangles bleus en pointillé se réfèrent aux sous-groupes des assemblages A et B (α, β, γ, δ, ε et ζ).

5.2.2. Le microsatellite simple-locus NAK1

L'amplification du microsatellite NAK1 n'a été possible que pour 125 vers sur les 140 au total ; les 15 échantillons non amplifiés étaient tous d'assemblage B. Trois allèles constituaient 3 génotypes « homozygotes » (195, 198 et 201 pb) et 1 « hétérozygote » (198-201 pb) (**Tableau 11** et **Figure 23**). Seuls les vers présentant un assemblage EmsB A ont présenté le génotype 195 pb, alors que les génotypes 198 et 201 pb ont été retrouvés pour les 2 assemblages EmsB. Le génotype « hétérozygote » 198-201 pb a été trouvé uniquement chez le renard R05170, présentant la plus forte charge parasitaire (73380 vers). De plus, ce renard était colonisé par des vers *E. multilocularis* de 3 profils EmsB différents (**Tableau 11**).

Pour étudier la genèse du génotype « hétérozygote », 26 nouveaux vers gravides ont été étudiés pour le renard R05170. Le scolex et les proglottis ont été séparés par dissection sous la loupe binoculaire (**Figure 24**). L'ADN des 2 parties a été extrait puis amplifié par PCR et étudié par analyse de fragments de manière séparée. Pour chaque individu, le scolex et la partie gravide présentaient le même génotype NAK1 et le même assemblage EmsB. Vingt vers disséqués ont présentés un assemblage EmsB B et un génotype NAK1 « hétérozygote » 198-201 pb, profil génétique déjà trouvé lors de l'étude des 10 vers entiers chez ce renard. Cinq vers présentaient un profil d'assemblage A et un génotype 201 pb, également trouvé auparavant chez ce renard. Un ver a présenté un nouveau motif pour ce renard, avec un assemblage B et un génotype 198 pb.

Le séquençage de chaque allèle NAK1 a été réalisé et les séquences nucléotidiques ont été comparées aux allèles publiés dans la base GenBank (**Figure 25**). Deux vers ont été séquencés pour NAK1 195 pb- EmsB A. Pour 198 pb, 5 vers A et 5 vers B ont été étudiés. Pour 201 pb, 1 ver pour A et 2 vers pour B ont été choisis. Pour les vers ardennais et les séquences publiées suisse (EU044716) et allemande (EU044715), le polymorphisme de la cible a été détecté au niveau du second triplet (CAC). Les séquences publiées polonaise (EU044717) et japonaise (AB100031) ont présenté d'autres sites de mutation (**Figure 25**).

Le phénomène d'homoplasie chez NAK1, suspecté pour les allèles partagés entre les 2 assemblages EmsB n'a pu être mis en évidence. En effet la présence de mutations non détectables en analyse de fragments aurait pu indiquer que ces allèles apparemment partagés entre les deux assemblages EmsB représentaient en réalité des allèles différents.

Taille de fragments (paire de bases)

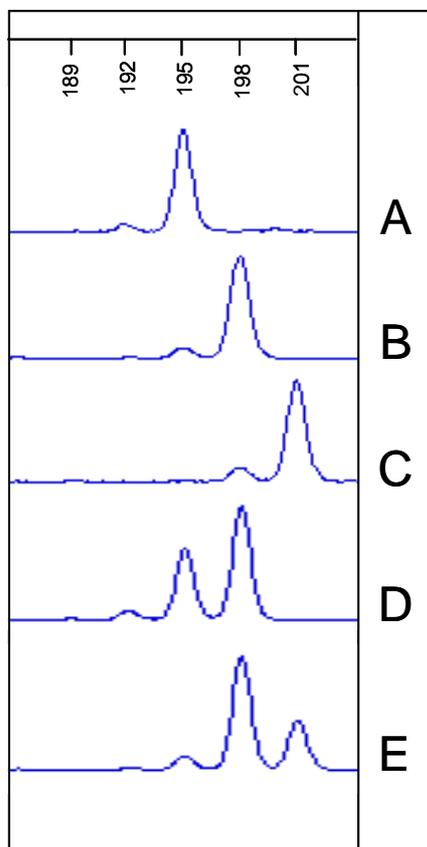


Figure 23 : Electrophorégrammes des loci NAK1 réalisés à partir des isolats de vers adultes des Ardennes, grâce au séquenceur automatique, ABI Prism 3100. Les pics à 195, 198 et 201 pb représentent des génotypes « homozygotes » et l'association des pics à 198 et 201 pb, trouvés chez le renard R05170 constitue le génotype « hétérozygote ».

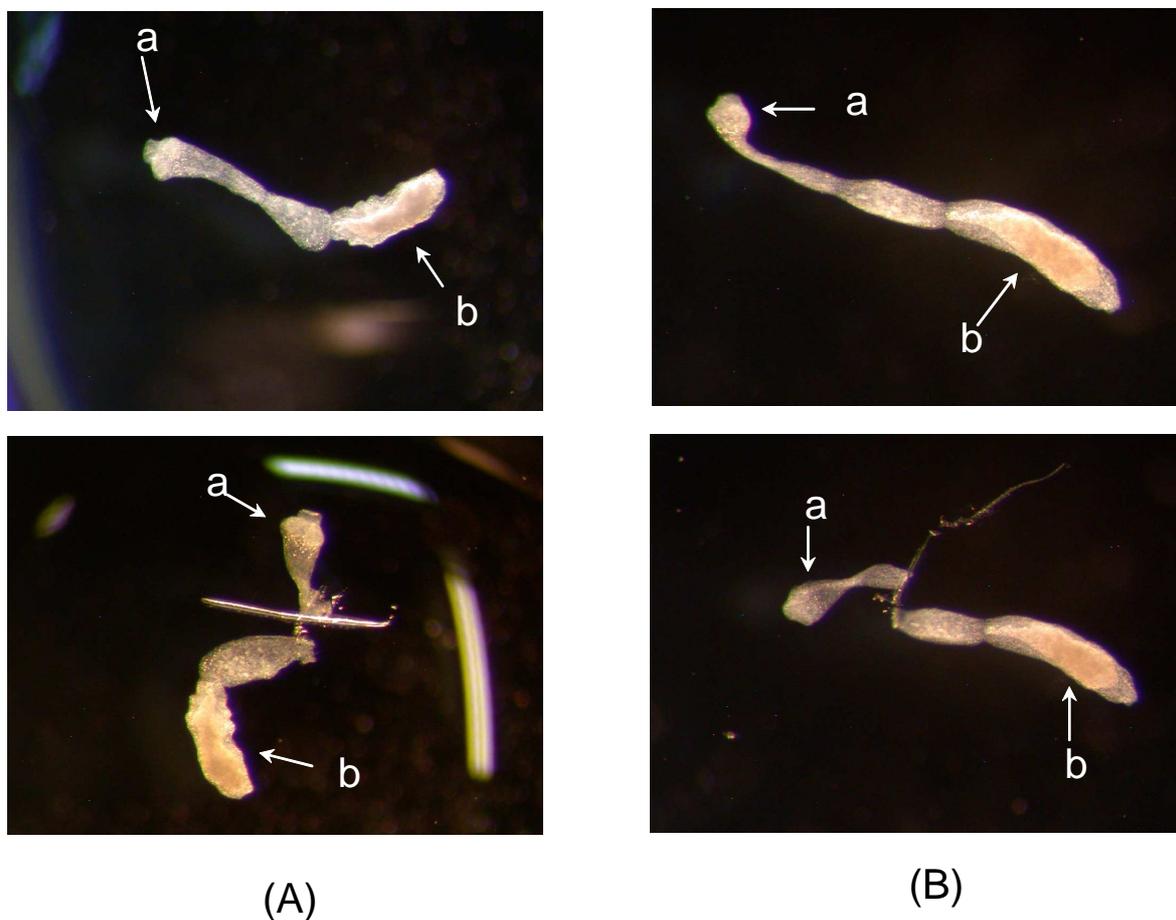


Figure 24 : (A et B) Dissection de 2 vers adultes d'*Echinococcus multilocularis* isolés chez le renard ardennais R05170. Le site de coupure a été choisi au niveau du cou du parasite (entre le scolex (a) et le strobile gravide (b)).

5.2.3. Génotypage de la cible mitochondriale ATP6

L'ADN de 32 isolats a été séquencé pour la cible ATP6, à partir des 25 renards du panel ardennais (1 ver par assemblage EmsB et par renard). Les séquences nucléotidiques ont été comparées à la séquence de référence (AB27557) (**Tableau 12**). Trente isolats ont présentés 100 % d'homologie avec cette séquence publiée. Seuls 2 vers ont présentés 1 mutation. Ni les assemblages EmsB, ni les génotypes NAK1 n'ont pu être distingués par ce séquençage.

Tableau 12 : Identification des mutations après séquençage du gène codant pour l'ATPase 6 déshydrogénase (N° d'accès GenBank AB027557), d'après l'étude d'un ver par assemblage EmsB et par renard dans le panel d'isolats des Ardennes.

No. renard	Gène ATPase 6 déshydrogénase			
	N	AA	N	AA
	63	22	376	120
	A	Ser	G	Ala
R05170-16	G	Gly		
R05172-3			A	Thr

N: Nucléotide

AA: Acide aminé

5.3. Echelle continentale : le foyer européen

5.3.1. Etude de la distribution des génotypes d'*E. multilocularis* dans un panel de renards européens

Les renards géoréférencés ont été regroupés au sein de sous-régions écologiquement et topographiquement semblables. Neuf sous-régions regroupant au minimum 30 vers *E. multilocularis* ont été décrites : les Ardennes, le Nord de l'Autriche, la Suisse, le Jura Souabe, la Bavière, le Centre de la Slovaquie, l'Ouest de la Tchéquie, la région des Tatras (Est de la Slovaquie et Sud de la Pologne) et le Nord de la Pologne (**Figure 26**). L'ensemble de ces sous-régions regroupait au total 571 vers adultes issus de 123 renards. Les vers issus des renards du Doubs et de Lorraine n'ont pas été inclus dans les analyses de distribution spatiale de la diversité génétique car l'échantillon n'était pas assez important (7 vers pour le Doubs et 18 pour la Lorraine).

5.3.2. La diversité génétique d'*E. multilocularis* en Europe

Les profils électrophorétiques de la cible EmsB obtenus pour les isolats européens ont été étudiés grâce à l'analyse de regroupement hiérarchique. La réalisation d'un dendrogramme à partir de ces données génétiques et l'application du seuil de distance génétique ont permis de mettre en évidence 32 regroupements ou assemblages de profils au sein de la collection d'échantillons des 9 sous-régions (**Figure 27**). Ces assemblages de profils regroupaient pour chacun entre 1 et 90 vers.

La composition génétique des vers *E. multilocularis* de 86 renards, pour lesquels un minimum de 5 vers était disponible a été étudiée. Cinquante six renards (65% du panel) hébergeaient

des vers *E. multilocularis* appartenant à un seul profil EmsB et 30 renards (35% du panel) présentaient une population mixte (2 à 3 profils).

Pour l'ensemble du panel, la distribution des profils par sous-région est listée dans le **Tableau 13** et graphiquement présentée dans la **Figure 28**. Six profils ont été trouvés de manière dominante parmi l'ensemble des échantillons (par ordre décroissant d'importance relative G05, G23, G28, G07, G26 et G21). Entre 38 et 90 vers étaient regroupés parmi chacun de ces 6 profils, représentant 69 % du panel total. Le profil G26 n'a été retrouvé que dans la sous-région des Ardennes alors que les groupes G05, G23, G28, G07 et G21 ont été trouvés sur des aires géographiques bien plus étendues (**Figure 28**). Par exemple, le regroupement G05 a été trouvé dans le Nord de l'Autriche, le Jura Souabe, les Ardennes, l'Ouest de la Tchéquie, la région des Tatras et le Centre Slovaquie (**Tableau 13**). Malgré une large distribution géographique, les électrophorégrammes EmsB de ce profil G05 étaient particulièrement similaires. La moyenne des distances génétiques entre les isolats de profil G05 était de 0,039 et la déviation standard de 0,0123. Pour mémoire, la comparaison des électrophorégrammes des 3 isolats de la souche F AUB-2, maintenue *in vivo* pendant 7 mois avaient fourni une moyenne de distance génétique de 0,0266 et une déviation standard de 0,0177.

La diversité génétique des populations d'*E. multilocularis* était plus importante dans les sous-régions situées au Centre de l'aire d'étude. Dans chacune des 4 sous-régions périphériques, un profil dominant a été trouvé : G23 pour le Centre Slovaquie, G28 pour les Tatras, G07 pour le Nord Pologne et G26 pour les Ardennes, représentant plus de la moitié des effectifs de ces sous-régions. (Respectivement : 83%, 51%, 83% et 54%). En revanche seule la sous-région de la Bavière, dans la zone centrale était représentée par un profil dominant (G28, pour 52% des isolats de la sous-région Bavière) (**Tableau 13**).

Pour finir, 14 profils EmsB ont été décrits de manière endémique au sein des 9 sous-régions considérées et parmi ceux-ci 7 ont été représentés de manière unique (chez un seul ver) (G08, G09, G12, G13, G14, G16 et G32 dans la **Figure 28**). La majorité de ces profils endémiques a été retrouvée dans les sous-régions de la zone centrale (5 profils EmsB sur les 7 retrouvés de manière unique).

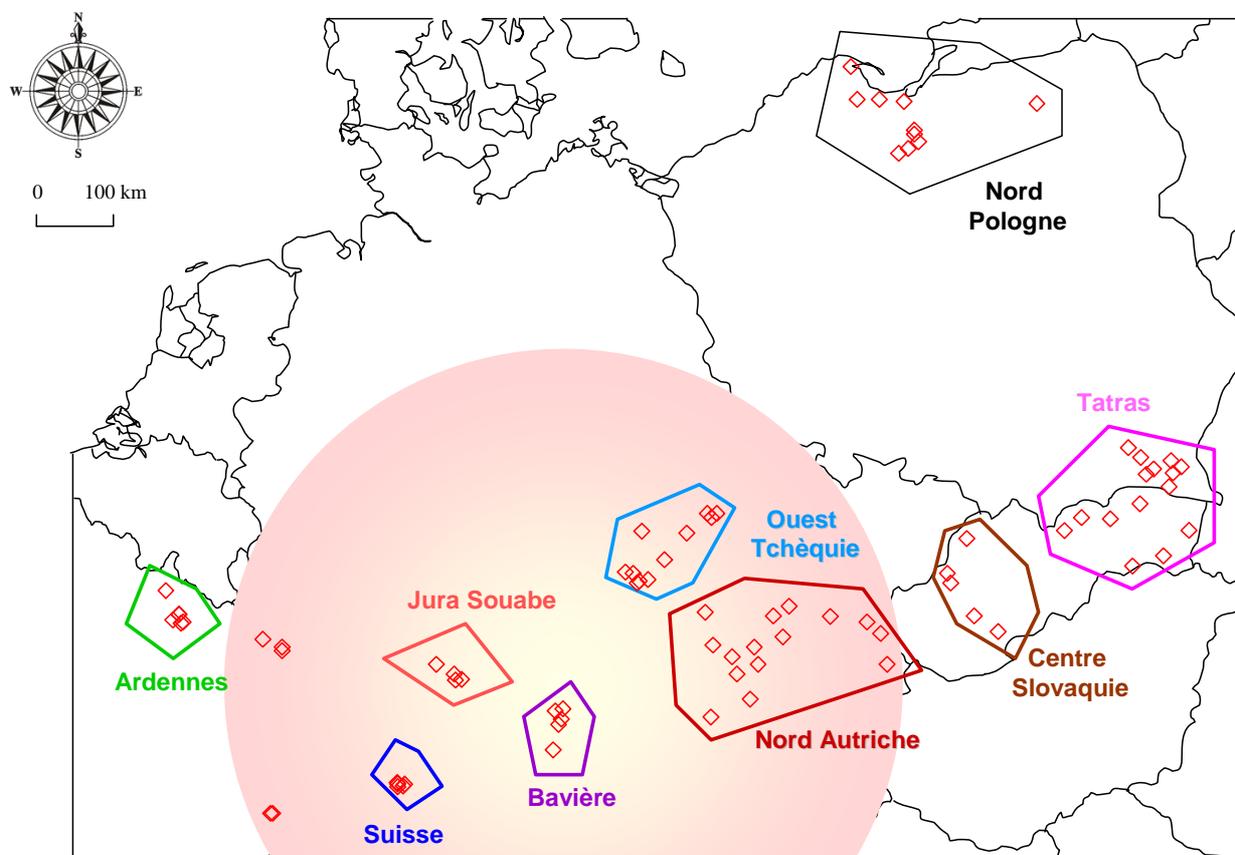


Figure 26 : Distribution spatiale du panel de renards européens. Les points rouges représentent la localisation géographique des renards étudiés. Les polygones représentent les limites des sous-régions, regroupant un minimum de 30 vers adultes. La zone ombrée rouge correspond au foyer central endémique d'*E. multilocularis* historiquement documenté.

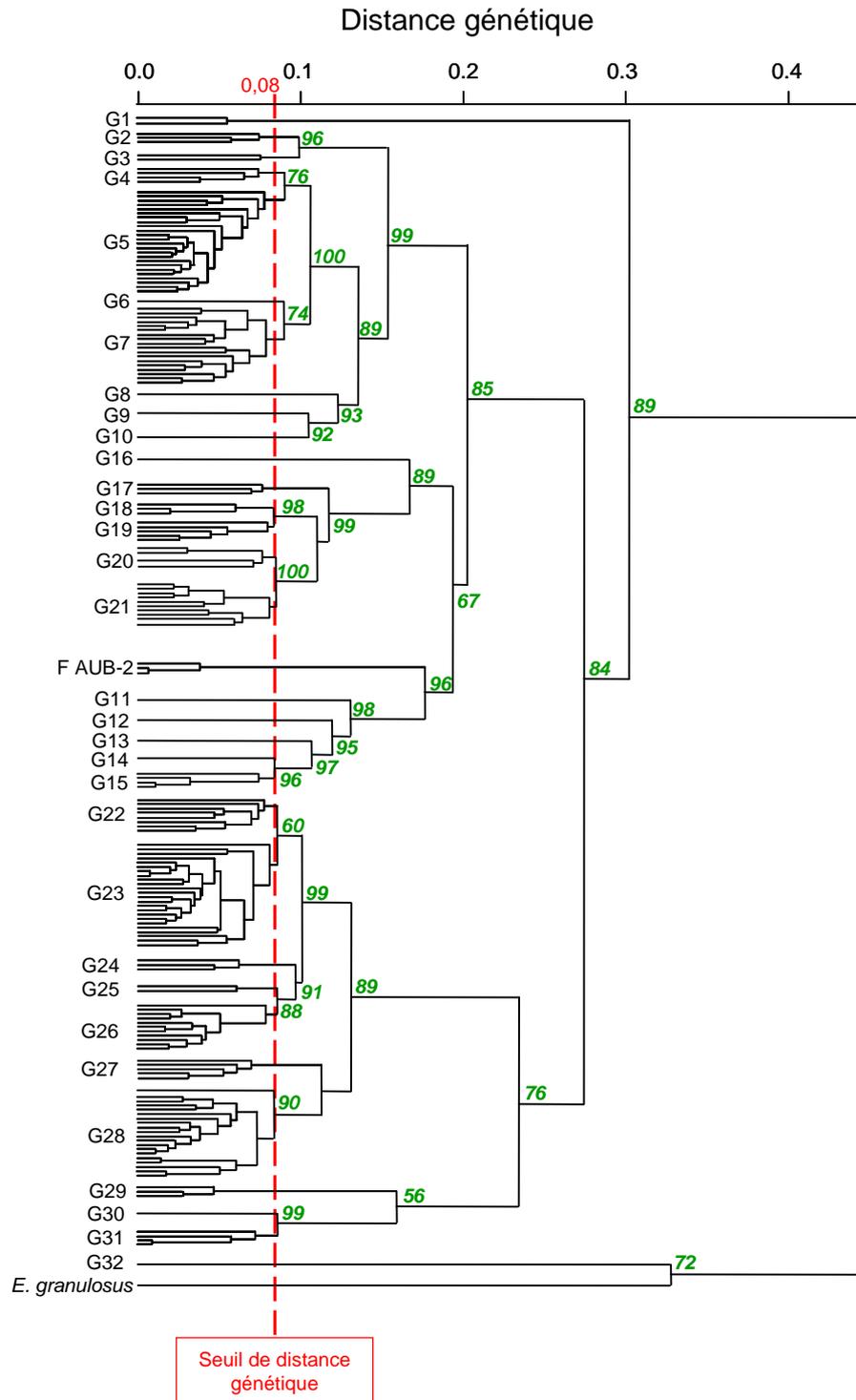


Figure 27 : Dendrogramme des analyses de fragments du microsatellite EmsB, réalisées à partir du panel de renards européens. Le pourcentage de réitérations obtenant cet agencement des isolats sont indiqués à chaque nœud de l'arbre. F AUB-2 correspond à la souche d'*E. multilocularis* maintenue *in vivo* chez *Meriones unguiculatus* pendant 7 mois. Groupe extérieur : *E. granulosus*. Le seuil de distance génétique permet de distinguer 32 assemblages de profils.

Tableau 13 : Effectifs des échantillons de chaque profil EmsB par sous-région européenne (Suisse : Canton de Zürich, Nord Au : Nord Autriche, Souabe : Jura Souabe, Bav : Bavière, Arde : Ardennes, Ouest Tch : Ouest Tchéquie, Nord Pol : Nord Pologne, Tatras : Est Slovaquie et Sud Pologne et Cent Slov : Centre Slovaquie). Les nombres en gras représentent le profil EmsB ayant le plus grand nombre de vers par sous-région.

Profils	Sous-régions								
	Suisse	Nord Au	Souabe	Bav	Arde	Ouest Tch	Nord Pol	Tatras	Cent Slov
G1	0	0	0	0	0	0	6	0	0
G2	0	0	0	0	3	0	0	1	0
G3	0	0	0	0	2	0	1	0	0
G4	2	0	2	0	0	3	0	0	0
G5	0	28	10	0	12	27	0	9	4
G6	0	0	0	0	0	5	0	0	0
G7	3	10	8	5	0	0	38	5	0
G8	0	0	0	0	0	0	1	0	0
G9	0	0	0	0	0	1	0	0	0
G10	5	0	0	0	1	1	0	0	0
G11	3	0	0	0	0	0	0	0	0
G12	1	0	0	0	0	0	0	0	0
G13	1	0	0	0	0	0	0	0	0
G14	1	0	0	0	0	0	0	0	0
G15	16	0	0	0	0	0	0	0	0
G16	1	0	0	0	0	0	0	0	0
G17	0	0	1	6	0	0	0	0	0
G18	0	5	2	5	0	0	0	0	0
G19	0	0	5	0	0	12	0	0	0
G20	6	4	0	0	0	5	0	0	0
G21	4	14	5	0	0	5	0	9	0
G22	1	2	0	0	18	0	0	0	0
G23	11	31	2	0	0	7	0	10	25
G24	5	0	0	0	0	0	0	0	0
G25	0	0	4	0	0	0	0	4	0
G26	0	0	0	0	43	0	0	0	0
G27	6	0	0	0	0	0	0	2	0
G28	1	4	0	25	0	0	0	41	0
G29	8	0	0	0	0	0	0	0	0
G30	5	0	0	0	0	0	0	0	0
G31	4	0	0	7	0	0	0	0	0
G32	0	0	0	0	0	0	0	0	1
No vers	84 (19)	103 (23)	39 (8)	48 (10)	79 (16)	61 (13)	46 (10)	81 (17)	30 (7)
No profils	19	8	9	5	6	9	4	8	3

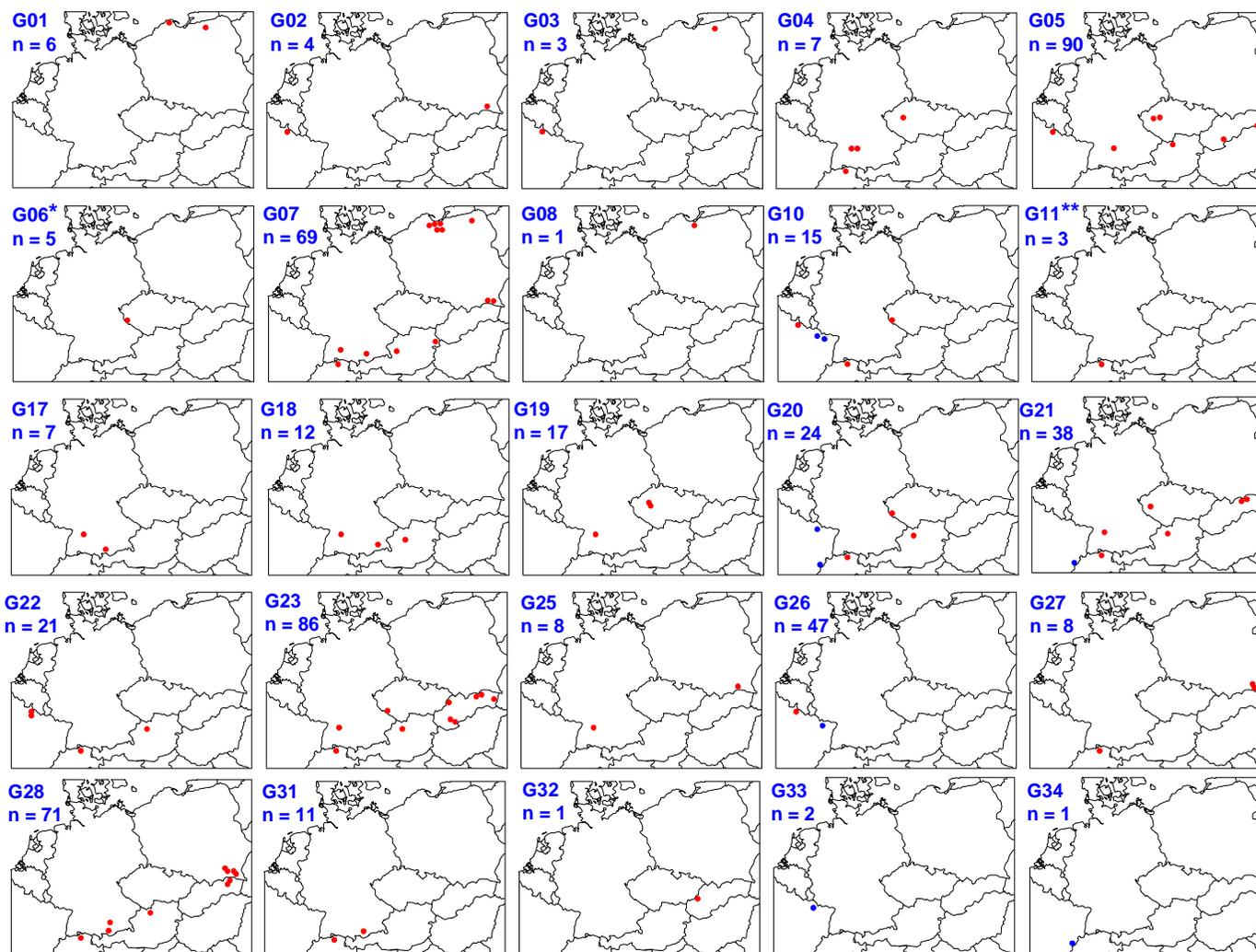


Figure 28 : Distribution spatiale des assemblages de profils EmsB dans les 9 sous-régions définies présentant un minimum de 30 vers (points rouges) et pour les isolats du Doubs et de la Lorraine (points bleus). Les localisations uniques ont été regroupées sur une seule carte pour *la Tchèque : G9(1 ver) et **la Suisse : G12(1), G13(1), G14(1), G15(16), G16(1), G24(5), G29(6), G30(5) ; n : nombre de vers.

5.3.3. Distribution géographique de la diversité génétique

Les analyses de raréfaction de richesse et diversité génétique ont été réalisées pour chaque groupe géographique, avec comme unité d'échantillonnage le renard (**Figure 29**). La richesse en profils EmsB n'a été atteinte pour aucune sous-région, ce qui signifie que l'effort d'échantillonnage n'a pas été suffisant pour décrire l'ensemble des profils génétiques présents en Europe. La sous-région Suisse montrait la plus forte pente pour une collection de 19 renards. La diversité génétique a atteint un plateau de saturation pour l'ensemble des sous-régions périphériques. Seules deux sous-régions de la zone centrale, Suisse et Jura Souabe n'atteignent pas cette saturation.

Une comparaison a été réalisée par le test du chi² sur le nombre de profils EmsB trouvés dans 3 sous-régions isolées géographiquement et présentant des effectifs similaires (Suisse, Ardennes et Tatras, chacun fournissant respectivement 19, 6 et 8 assemblages de profils). La sous-région Suisse présentait un nombre de profils significativement plus important que les deux autres sous-régions ($p < 0,01$).

Une analyse comparative entre la position géographique des isolats et les données génétiques a été menée dans l'hypothèse d'un isolement par la distance, grâce au test de Mantel (Mantel 1967). La comparaison des matrices de distances génétiques et géographiques a été conduite sur 162735 paires de vers. Des classes de distances (unité de 50 km) ont été réalisées par le regroupement des paires de vers, en prenant en compte l'amplitude de la diversité génétique existant entre les vers appariés (**Figure 30**). La valeur du coefficient de corrélation était de $r = 0,077$ ($p < 0,001$), indiquant une corrélation positive entre les matrices. Cependant une anova réalisée à partir du modèle de régression linéaire entre les distances génétiques et géographiques n'expliquait seulement que 5% de la variabilité totale.

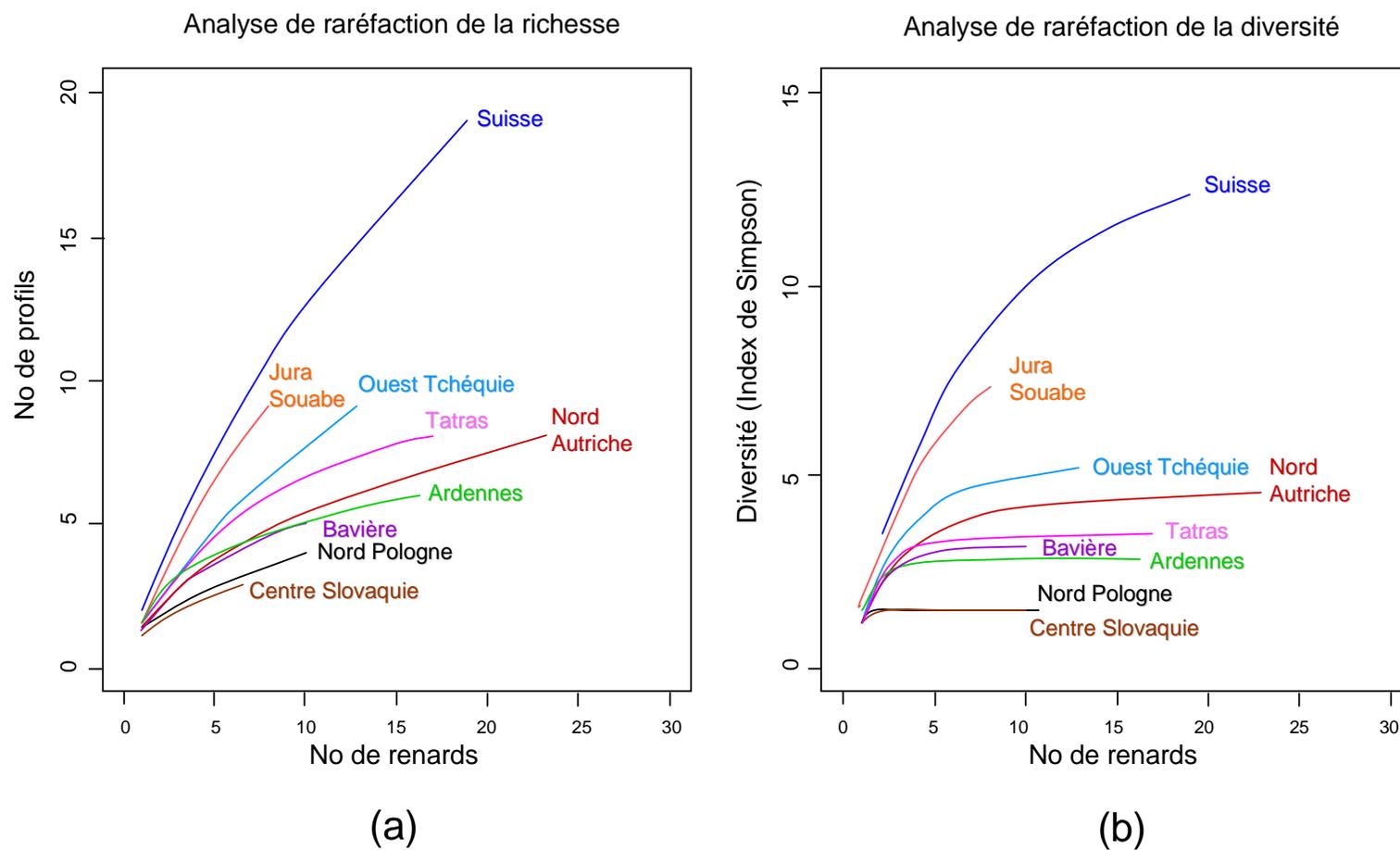


Figure 29 : Pour chaque sous-région européenne étudiée et en fonction du nombre de renards, le renard étant pris comme unité d'échantillonnage, les graphiques représentent l'ensemble (a) des courbes de raréfaction de la richesse génétique et (b) des courbes de raréfaction de la diversité génétique.

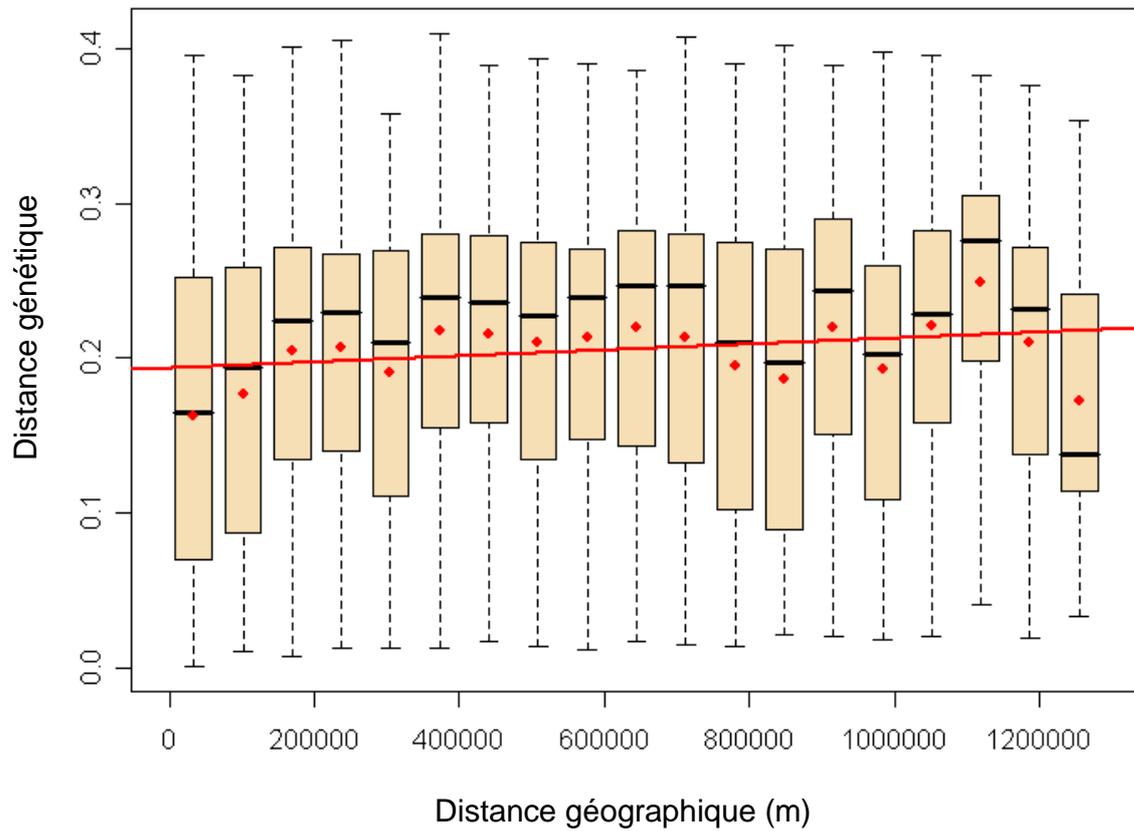


Figure 30 : Comparaison des distances génétiques et géographiques par le test de Mantel. Pour chaque classe de distance, le point rouge représente la distance génétique moyenne et la barre noire la médiane. La droite de régression est représentée en rouge sur le graphique.

5.4. Etude de la transmission d'*E. multilocularis* chez l'homme et l'animal de parcs zoologiques

Le regroupement géographique des isolats de métacestodes chez l'homme, l'animal en captivité et les renards français, suisses, allemands et autrichiens a été réalisé sur une même carte (**Figure 31**). En plus des 571 vers étudiés précédemment chez le renard, les 25 vers issus des renards du Doubs et de Lorraine, ont été inclus dans cette étude (voir **Tableau 6**).

Les profils génétiques des isolats de métacestodes ont été incorporés au dendrogramme réalisé avec l'ensemble des renards européens. Les liens génétiques existants entre les isolats du renard et de l'HI sont présentés sur un dendrogramme (**Figure 32**). Parmi les vers adultes supplémentaires du Doubs et de Lorraine, 2 nouveaux profils ont été définis, le profil lorrain G33 (n = 2) et le profil doubiste G34 (n = 1) (**Figure 28**). Quatre isolats lorrains ont présenté le profil G26, précédemment décrit dans la sous-région des Ardennes.

Neuf assemblages de profils européens, précédemment définis lors de l'étude des parasites adultes s'avéraient être très similaires à certaines lésions métacestodes humaines, simiesques et du castor (**Tableau 7**). La **Figure 33** montre les profils électrophorétiques trouvés chez 3 isolats appartenant au profil G20, alors que ces trois profils correspondent à des prélèvements espacés dans le temps et dans l'espace (la lésion N° 23 du patient originaire du Doubs a été opérée en 1986, la lésion HP1357 d'un patient allemand en 2005, et le renard autrichien a été autopsié en 2003). La moyenne des distances génétiques entre les 3 isolats était de 0,052 et σ de 0,016.

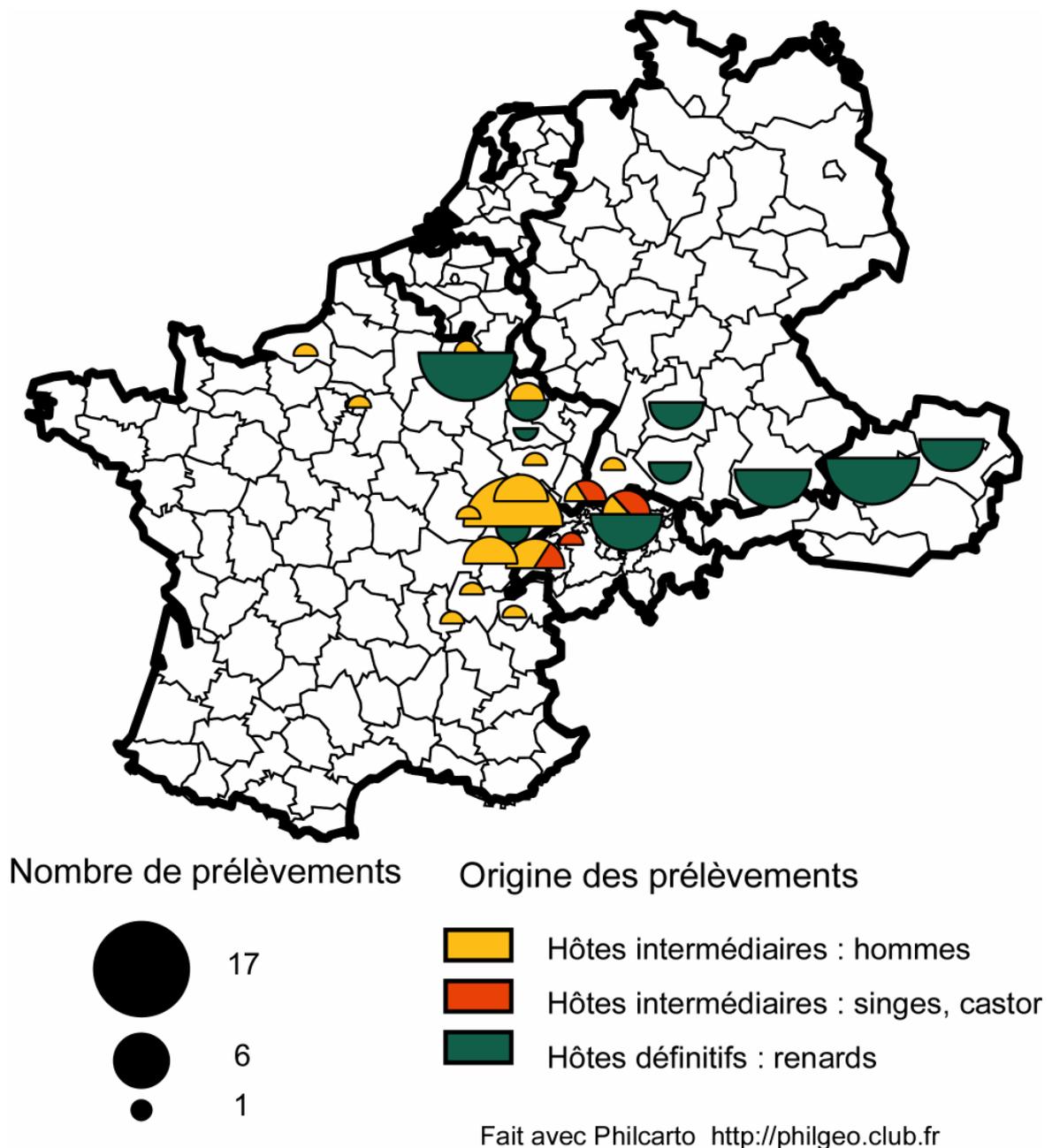


Figure 31 : Localisations géographiques des patients français, suisses et allemands (les localisations exactes du patient autrichien et du second patient allemand, n'étant pas connues ils n'ont pas été représentés ici), des singes suisses, du castor bernois et des renards français, suisses, allemands et autrichiens positionnés au niveau des départements (France), cantons (Suisse), Regierungsbezirke (Allemagne) ou länder (Autriche). La carte a été réalisée grâce aux logiciels Adobe Illustrator et Philcarto.

Parmi ces 9 profils déjà décrits en Europe (**Tableau 14**), les 4 profils G12, G15, G26 et G33 ont été retrouvés chez le renard de manière locale dans les sous-régions décrites précédemment. Ils présentaient des similitudes fortes avec les lésions parasitaires de patients ou d'animaux provenant de la même aire géographique. Par exemple, le profil ardennais G26 a été retrouvé chez un patient résidant à Charleville-Mézière dans les Ardennes (**Tableau 7**). Les singes du zoo de Zürich présentaient quant à eux le profil G15 retrouvé uniquement chez des renards originaires de ce même canton.

Les profils G23 et G28 décrits comme transversaux ont été trouvés chez le castor bernois et un patient français de Seine-Maritime.

Le profil G20, retrouvé chez les renards français, autrichiens, suisses et tchèques représentait le plus grand nombre de patients des 3 pays étudiés ($n = 8$) (**Figure 34**).

Vingt nouveaux profils EmsB ont été décrits (**Tableau 7**). Parmi ceux-ci, la plupart ont été trouvés dans des zones non couvertes par la campagne d'échantillonnage des vers adultes, comme les cantons suisses de Bâle et de Vaud, les départements français du Val-de-Marne, de Haute-Savoie, de l'Ain, du Rhône et de Côte d'Or. Le nouveau profil P20 regroupait un nombre important d'isolats ($n = 7$) issus des patients du Doubs (Fontaine-les-Clerval), du Jura (Lons-le-Saunier et Morbier), du canton de Vaud et de animaux des parcs zoologiques de Lausanne et Servion (Canton de Vaud) (**Figure 34**). Ce profil a été retrouvé chez des patients opérés entre 1988 et 2006 (e.g. pour les patients du Doubs N° 11 et N° 448) (**Tableau 7**).

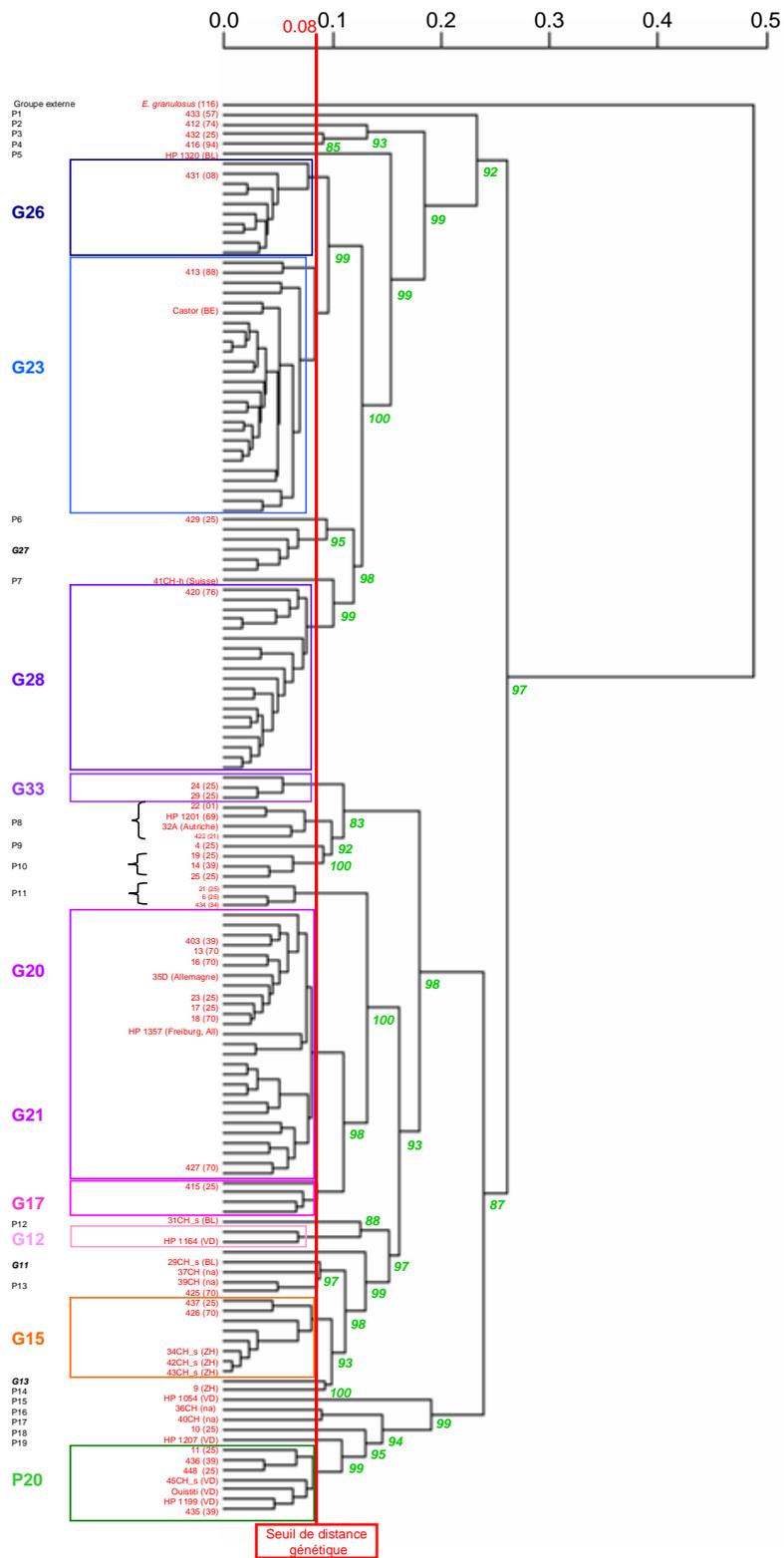


Figure 32 : Dendrogramme des distances génétiques entre les isolats de la collection de lésions chez les HI homme et animaux en captivité et les profils des vers adultes des renards européens. Valeur des calculs de réitération à chaque nœud de l'arbre (%). G : profils EmsB définis chez le renard, l'homme et l'animal HI, P : profils EmsB définis uniquement chez l'HI.

Tableau 14 : Localisations géographiques des 9 profils EmsB rencontrés à la fois chez les renards européens, l'homme et l'animal en captivité.

Profils	Localisation géographique (origine des renards)
G12	Suisse (Zürich)
G15	Suisse (Zürich)
G17	Allemagne (Bade-Wurtemberg, Bavière)
G20	Suisse (Zürich) ; Autriche (Ober Österreich) ; France (Moselle, Doubs) ; Tchéquie
G21	Suisse (Zürich) ; Autriche (Ober Österreich) ; Allemagne (Bade-Wurtemberg) ; France (Doubs) ; Tchéquie ; Slovaquie
G23	Suisse (Zürich) ; Autriche (Nieder Österreich, Ober Österreich) ; Allemagne (Bade-Wurtemberg) ; Tchéquie ; Slovaquie ; Pologne (Sud-East) ; Tchéquie
G26	France (Ardennes, Moselle)
G28	Suisse (Zürich) ; Autriche (Ober Österreich) ; Allemagne (Bavière) ; Pologne (Sud-Est) ; Slovaquie
G33	France (Moselle)

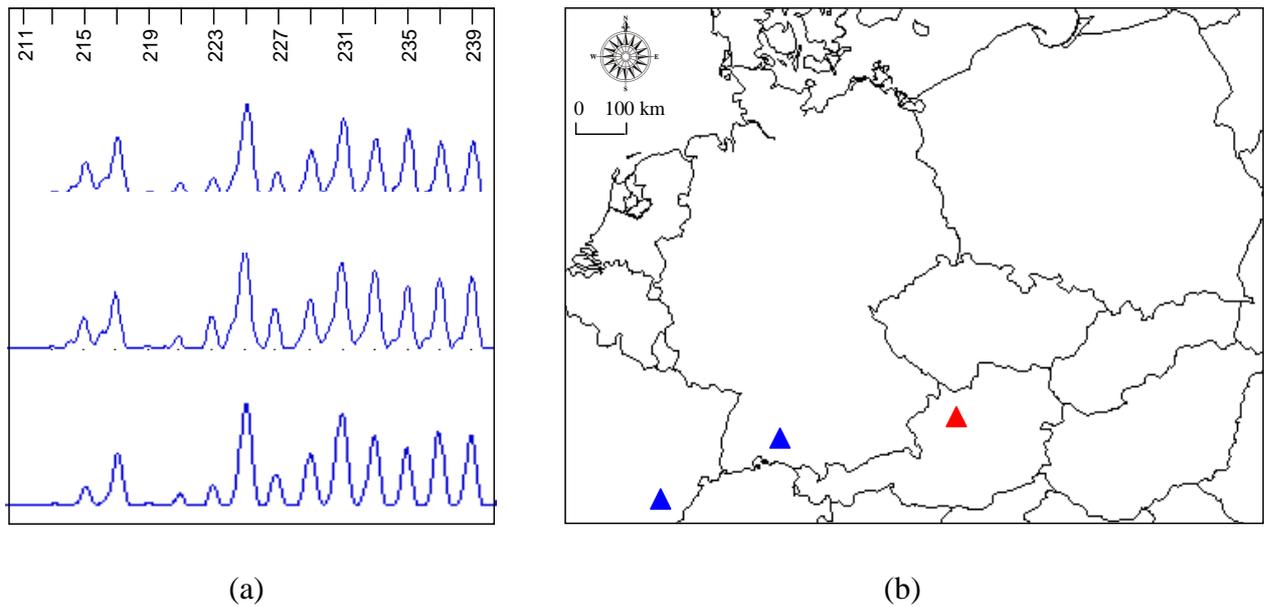


Figure 33 : (a) Electrophorégrammes et (b) exemple de distribution du profil EmsB G20 décrit chez le renard européen (ici le renard autrichien OÖ 247, autopsié en 2003 : triangle rouge) et retrouvé par exemple chez 2 patients allemand (HP1357 de Freiburg, opéré en 2005 : triangle bleu) et français (N° 23 du Doubs, opéré en 1986 : triangle bleu).

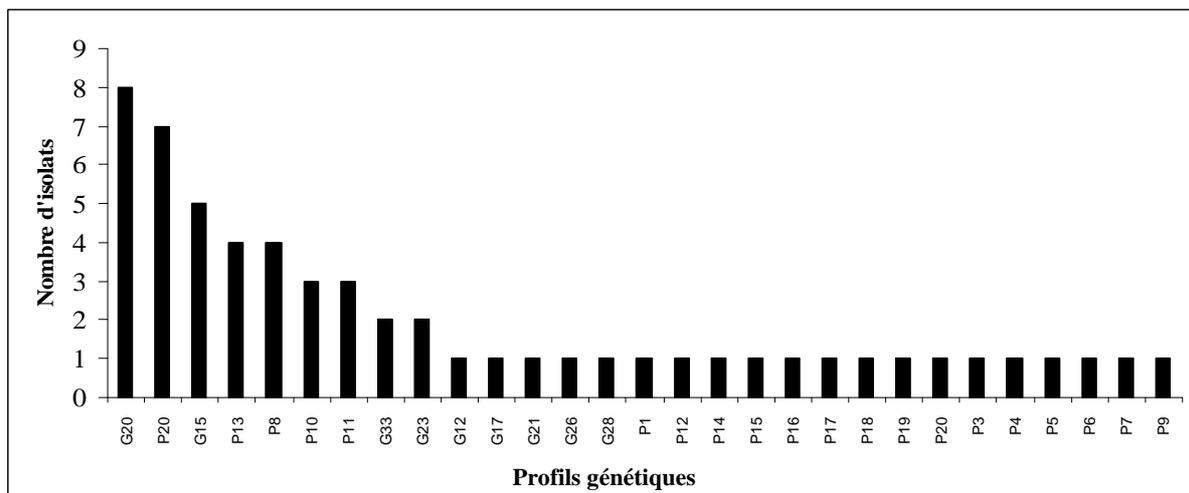


Figure 34 : Histogramme des fréquences des profils EmsB rencontrés dans la collection de métacestodes humains, simiesques et de castor d'Europe.

DISCUSSION - CONCLUSION

La réalisation d'études épidémiologiques portant sur la présence d'*E. multilocularis* en Europe se heurte à l'absence d'outil permettant de différencier les isolats de manière discriminante. On l'a vu, la recherche de polymorphisme chez *E. multilocularis*, basée aussi bien sur l'étude (i) de l'ADN total d'*E. multilocularis* par la technique d'empreinte génétique (Okamoto et al. 2007), (ii) sur l'étude de l'ADNmt par le séquençage des cibles Cox1, ND1 et ATP6 (Boucher et al. 2005; Bowles et al. 1992; Bowles & McManus 1993; Haag et al. 1997; Kedra et al. 2000; Snabel et al. 2006; Yang et al. 2005), (iii) l'étude de l'ADN nucléaire par le séquençage des cibles codantes comme AgB/1 et non codantes ActII et Hbx2 par la technique de PCR-SSCP (Haag et al. 1997) et l'étude des régions inter-géniques ITS-1 et ITS-2 par séquençage et PCR-RFLP (Gasser & Chilton 1995; Rinder et al. 1997) n'ont permis de mettre en évidence qu'un nombre limité de différences génétiques chez le parasite. Des variations limitées sont observées essentiellement entre le foyer de l'Alaska et le foyer eurasiatique, rappelant la distinction faite sur caractères morphologiques entre les sous-espèces *E. multilocularis sibiricensis*, *E. multilocularis multilocularis* (Rausch & Schiller 1954). A côté de ces différences minimales retrouvées au niveau mondial, le parasite dans le foyer européen apparaît très monomorphe dans l'ensemble de ces études.

Toutes ces approches tentées ont été mises en défaut, il fallait alors impérativement développer de nouveaux outils de typage en recherchant des marqueurs d'évolution rapide, de pouvoir discriminant supérieur aux cibles précédemment utilisées (Bart et al. 2003; Tibayrenc 1998). Les cibles polymorphes SNP's (*Single Nucleotide Polymorphism*), largement utilisées en génétique humaine et présentant un polymorphisme sur un nucléotide aurait sans doute pu convenir (Li et al. 2008). Cependant leur étude requiert la recherche d'un grand nombre de sites de mutations au sein de l'ADN, ce qui nécessite le séquençage complet du génome pour les identifier. Ce séquençage n'étant pas disponible au moment de nos investigations, une autre approche a donc été tentée. D'après les données de la littérature, les premiers microsatellites étudiés avaient permis d'atteindre un meilleur pouvoir discriminant que les cibles précédemment utilisées. La cible U1 ARNsn, contenant plusieurs séquences d'ADN microsatellite pentamérique permettait de décrire un polymorphisme au niveau mondial, sans pour autant mettre en évidence des variations chez *E. multilocularis* au sein du foyer européen (Bretagne et al. 1996). Les premières études portant sur les microsatellites EMms1 et EMms2 révélaient un niveau de discrimination supérieur à ce qui avait été décrit jusqu'ici (Nakao et al. 2003). Cependant la caractérisation de ces cibles nécessitait d'étudier un plus large panel

d'échantillons pour mieux les caractériser. La recherche de microsatellites hautement polymorphes a donc été poursuivie. Le criblage d'une banque d'ADN génomique nous a alors permis d'isoler et de caractériser la cible EmsB, qui présentait un profil complexe après l'analyse électrophorétique des produits de PCR marqués par fluorescence. Nous avons par la suite montré qu'il s'agissait d'un ensemble de microsatellites multilocus répétés en tandem particulièrement polymorphe. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une telle cible, recélant des milliers de microsatellites est utilisée à des fins de typage. En conséquence, il était impératif de caractériser au mieux ce nouvel outil, en décrivant précisément sa structure génétique, puis de valider le test de typage basé sur l'étude du polymorphisme de taille d'EmsB sur différents panels de parasites.

- *Caractérisation et validation du microsatellite multilocus répété en tandem EmsB chez E. multilocularis*

La première partie de notre travail a permis de lever les ambiguïtés sur la signification des tracés électrophorétiques obtenus après l'amplification de la cible EmsB. Le clonage des produits de PCR a montré que chaque pic composant le profil électrophorétique de la cible correspondait à un ensemble de séquences sur le génome d'*E. multilocularis*. L'analyse de fragments des clones ne retrouvant qu'un seul pic de fluorescence, l'hypothèse d'un « bégaiement » de l'ADN polymérase lors de l'élongation du brin en cours de synthèse en particulier peut être rejetée (Bulle et al. 2002; Hite et al. 1996; Schinde et al. 2003). La génération d'un nombre élevé de pics était due à la présence d'un très grand nombre de séquences présentant de minimales variations de taille résultant d'un microsatellite polymorphe. Nous avons aussi pu montrer que ces séquences, d'environ 850 pb, étaient disposées en tandem dans l'ADN du parasite. La publication récente du génome d'*E. multilocularis* par l'Institut Sanger, a montré *a posteriori* que les déductions faites de nos expérimentations étaient pertinentes. Les régions flanquant les microsatellites étaient effectivement très conservées et le polymorphisme des profils électrophorétiques était bien du à la variabilité du microsatellite. D'après l'évaluation du nombre de copies du microsatellite et l'estimation de la taille du génome, les fragments EmsB occuperaient près de 3 % du génome du parasite.

S'agissant d'un outil entièrement innovant, il était particulièrement important d'en établir les caractéristiques en termes de sensibilité, spécificité, reproductibilité, répétabilité, stabilité dans le temps et de pouvoir discriminant.

La sensibilité de la cible EmsB a été testée à partir d'une gamme de dilution d'ADN pur d'*E. multilocularis*. L'amplification d'EmsB a été possible à partir de 1 fg d'ADN. Cette quantité minimale est inférieure à celles décrites pour d'autres marqueurs, comme pour les cibles BG1/2 et BG1/3, pour lesquelles 50 pg d'ADN purifié sont nécessaires (Gottstein & Mowatt 1991). La quantité d'ADN contenue dans un œuf d'*E. multilocularis* étant estimée à 8 pg, une quantité équivalente à 1/10000 du matériel génétique contenu dans un œuf pourrait donc suffire pour obtenir l'amplification d'EmsB.

La sensibilité de l'outil a également été attestée sur le terrain par la détection du parasite dans le matériel coprologique issu du renard. Deux types de fèces ont été collectés et testés. Pour les fèces issues du contenu rectal du renard autopsié, la détection du parasite a été possible pour des charges parasitaires minimales de 4 vers, alors que la cible ND1 testée ne donnait de résultats positifs qu'à partir de 170 vers présents dans l'intestin du renard. Toutefois, pour EmsB il n'a pas été possible de détecter la présence du parasite chez un renard infesté par seulement 2 vers. Il est également possible qu'il n'y ait pas eu d'excrétion d'œufs dans les fèces à la période étudiée.

La détection du parasite par la cible EmsB semble présenter de bons résultats pour ce type de prélèvement, non soumis aux conditions climatiques. La présence de bactéries, d'enzymes du type désoxyribonucléase (ou DNase) et d'autres éléments susceptibles de dégrader l'ADN pourrait cependant compromettre les réactions d'amplification d'ADN par PCR. La petite taille des fragments amplifiés par EmsB A/C (environ 300 pb) et leur grand nombre sont de nature à faciliter la détection de l'ADN du parasite, dans de telles conditions, défavorables à sa conservation.

Parmi les 31 fèces collectées dans la zone d'abattage des renards autopsiés, un seul échantillon s'était révélé positif pour les 3 cibles étudiées. Dans cette zone géographique, la prévalence du parasite chez le renard était pourtant estimée à plus de 60 % (Raoul et al. 2001). L'ADN du parasite est sans doute rapidement dégradé compte tenu des conditions subies par l'œuf dans le milieu extérieur pendant la saison de collecte des fèces (Veit et al. 1995). Les fèces récoltées dans l'environnement doivent donc être particulièrement fraîches pour réaliser des études moléculaires sur ce type d'échantillons. Cependant, si l'ADN du parasite n'est pas

déecté dans les fèces, son pouvoir infectant peut être mis en doute. La recherche préalable des œufs par une étape de concentration après filtration du matériel coprologique nous paraît donc incontournable (Mathis et al. 1996). Toutefois, même ainsi, le caractère infectieux des œufs ne pourrait être démontré (Raoul et al. 2001). Ce travail préliminaire doit donc être complété en insistant sur la qualité des prélèvements de fèces terrain, avant d'envisager l'utilisation d'EmsB en diagnostic coprologique et en alternative à l'autopsie. Enfin, le génotypage du parasite par le marqueur EmsB pourrait être envisagé en réalisant l'amplification de la cible sur l'ADN des œufs isolés par filtration. La sensibilité de la cible permet de réaliser des PCR sur des extraits issus d'un seul œuf. L'amplification simultanée de différentes populations d'*E. multilocularis*, pouvant être présentes chez un renard (Nakao et al. 2003) pourrait être alors évitée.

L'étude portant sur la spécificité a montré que la cible EmsB était présente sur différents extraits d'ADN de parasites du genre *Echinococcus*. L'étude de cette cible chez d'autres espèces du genre *Echinococcus* pourrait permettre par exemple de retracer la circulation du parasite dans l'environnement chez les différents acteurs du cycle (Bardonnet et al. 2003; Bart et al. 2004; Maillard et al. 2007) ; Maillard, en préparation).

L'étude de la spécificité a aussi montré que les amorces étaient spécifiques des Taenidés et n'amplifient ni l'ADN des nématodes, ni des protozoaires, ni l'ADN de l'hôte.

T. saginata, présentait un profil dans le même spectre de taille que *E. multilocularis*. Cependant ce parasite n'est pas présent chez le renard. En revanche *T. taeniformis*, d'amplification EmsB positive et présent chez le renard peut poser des problèmes d'interprétation des tracés, en cas d'infestation d'un renard par les deux ténias simultanément. Une amplification positive pour EmsB réalisée à partir du matériel coprologique ne permettra donc pas d'affirmer avec certitude une infection du renard par *E. multilocularis*. Le défaut de spécificité de la cible ne peut être corrigé que par l'inventaire précis des profils respectifs de *E. multilocularis* et *T. taeniformis*.

La reproductibilité et la répétabilité de l'amplification de la cible EmsB ont été testées pour réaliser une comparaison des profils électrophorétiques EmsB obtenus par différents expérimentateurs et dans différents laboratoires. Les profils apparaissent très semblables d'une expérience à l'autre. La reproductibilité de la technique a également fourni de bons résultats. La similarité des profils EmsB obtenus sur des appareils différents indique que la

méthode peut être exportée dans d'autres laboratoires, en permettant le génotypage du parasite par différentes équipes.

La stabilité de la cible EmsB a été testée dans le but d'en étudier son évolution dans le temps. La parfaite homologie des électrophorégrammes EmsB des isolats de la souche F AUB-2, maintenue *in vivo* par des inoculations successives à différents animaux de laboratoire a permis de souligner sa parfaite stabilité dans le temps. Grâce à cette stabilité, il devient possible d'étudier la diffusion du parasite dans l'environnement, ou encore de suivre les événements de contaminations humaines de manière rétrospective. Ces expériences sur la stabilité des résultats ont aussi permis de calculer un seuil de distance génétique, appliqué à l'analyse de regroupement hiérarchique des isolats d'*E. multilocularis*. La définition d'un seuil permet d'éviter une sur-discrimination des échantillons et de considérer des isolats proches génétiquement comme appartenant au même profil génétique. Pour le calcul de ce seuil, le choix d'ajouter 3 valeurs de déviation standard à la moyenne de distance génétique a été fait afin de réduire le risque de différencier des isolats semblables.

Aux vues des résultats obtenus avec *E. multilocularis*, la cible multilocus EmsB pourrait être utilisée dans l'étude d'autres cestodes, pour lesquels les outils de biologie moléculaire actuels posent des problèmes de pouvoir discriminant insuffisant. C'est le cas de *Taenia solium*, agent causal de la cysticercose, rencontré en Asie, en Afrique et en Amérique latine. Ce parasite infecte l'homme, seul hôte définitif et le porc, hôte intermédiaire. Les cibles mitochondriales Cox1 et Cyb ont permis de distinguer 2 haplotypes, le premier étant trouvé dans le foyer asiatique et le second dans les foyers africain et nord-américain (Nakao et al. 2002a). Au sein de ces haplotypes, il n'existe pratiquement pas de variations génétiques. Deux formes cliniques sont décrites pour cette maladie, les formes neuronales de cysticercose (NCC) et les formes musculaires et sous-cutanées (SCC). La forme NCC serait prédominante en Amérique latine, alors que dans le foyer asiatique la forme SCC coïncide souvent avec la forme NCC. La situation en Afrique apparaît plus complexe encore, avec des foyers locaux où les deux formes peuvent co-exister par endroit (Ito et al. 2003). Dans ce contexte épidémiologique, il serait alors intéressant d'évaluer la faisabilité du typage des souches de *T. solium* par la cible multilocus EmsB (Campbell et al. 2006). La description de différents profils génétiques pourrait ainsi permettre de mieux comprendre le rôle du parasite dans ces différentes formes cliniques, d'obtenir une traçabilité des souches retrouvées chez l'homme et

l'animal, mieux appréhender sa transmission ou encore, réaliser un suivi épidémiologique dans les communautés exposées.

- *Validation de la cible multilocus EmsB sur un panel mondial d'échantillons*

La dernière étape de notre travail de mise au point de la technique de typage basée sur EmsB reposait sur la comparaison de son pouvoir discriminant par rapport à d'autres microsattellites. L'étude combinée des microsattellites simple-locus EmsJ et EmsK permettrait de discriminer les échantillons à une large échelle géographique. Cependant un faible pouvoir discriminant et l'absence de correspondance entre les taux d'hétérozygotie décrits dans notre panel et les données de la littérature (Haag et al. 1998; Nakao et al. 2003) limitent leur utilisation en génotypage. De plus certains échantillons n'ont jamais pu être amplifiés. On sait maintenant, grâce au séquençage complet du génome d'*E. multilocularis* qu'un polymorphisme apparaît au niveau des régions flanquantes des cibles EmsJ et EmsK. Les amorces devraient être redéfinies dans des régions moins variables pour permettre d'augmenter la sensibilité de l'amplification chez *E. multilocularis*.

La caractérisation de la cible NAK1 a été poursuivie par l'étude d'un panel mondial. Les résultats montrent qu'elle est susceptible de différencier les foyers tibétains, d'Alaska et le groupe européen et japonais. Certains allèles pour cette cible étaient cependant partagés entre différents foyers, comme l'allèle à 195 pb retrouvé en Alaska, au Japon et en Europe. Le séquençage des allèles NAK1 a permis de mettre en évidence le phénomène d'homoplasie. De plus, les sites de mutations du microsattellite de cette cible semblent changer selon l'origine géographique des isolats. L'utilisation en typage de ce marqueur présente ainsi des limites qui ne pourraient être levées que par le séquençage. Le phénomène d'homoplasie a été également décrit chez EmsB. Cependant la somme d'informations apportée par le grand nombre d'allèles amplifiés en une seule PCR compense la perte de données due à l'homoplasie (Estoup et al. 2002).

Les cibles simple-locus présentent l'avantage de permettre l'étude des événements de recombinaison entre les vers adultes. En revanche la cible EmsB ne permet pas d'étudier ces événements. Les fragments de chacun des vers parents seraient alors confondus sur le profil électrophorétique du parasite hybride.

La cible multilocus EmsB a permis de déceler un important polymorphisme au sein du panel mondial d'*E. multilocularis*. Les isolats des foyers européens, asiatiques (Chine et Japon) et nord américains (Alaska et Canada) ont été séparés dans des assemblages de profils distincts. Dans le panel d'isolats européens, les isolats de parasites provenant des différents hôtes étudiés (renards, hommes, singes et rongeurs) ont parfois présentés entre eux des profils génétiques similaires. La variabilité génétique exposée par EmsB serait en faveur d'une spécificité géographique plutôt que d'une spécificité d'hôte.

- *Application du marqueur EmsB à l'étude du polymorphisme et de la dynamique spatiale d'E. multilocularis en Europe*

L'étude de la diversité génétique d'*E. multilocularis* dans le foyer européen a été réalisée à différentes échelles spatiales.

Une première échelle spatiale a été choisie à un niveau micro-locale (une pâture de quelques ares) pour évaluer le niveau de diversité génétique existant dans un cycle parasitaire perpétué par quelques hôtes protagonistes. Cette échelle correspond au territoire d'un ou de quelques renards. Les isolats étaient liés par une unité de temps et d'espace. La forte similitude entre les profils EmsB des isolats est en faveur d'une infection des rongeurs par une même source de contamination. Cette situation a également été rencontrée pour les isolats du champ de Savoonga en Alaska. Un même renard porteur d'une population homogène de vers pourrait être à l'origine de cette contamination apparaissant comme clonale. A cette échelle la diversité génétique est à son niveau le plus bas. Le cycle parasitaire est ici entretenu par une communauté de rongeurs et un ou quelques renards, sans apport extérieur de parasites porteurs d'autres profils génétiques. Ce niveau d'analyse représenterait l'unité de structure de la diversité d'*E. multilocularis*.

La diversité génétique du parasite a ensuite été étudiée à une échelle plus étendue, au sein du panel de parasites portés par des renards fréquentant une même aire géographique, limitée à une surface de 900 km² dans les Ardennes françaises. La parfaite homologie des séquences d'ADNmt ATP6, observées entre les isolats confirme l'homogénéité des parasites étudiés. Cette étude a prouvé que l'utilisation de marqueurs moléculaires adaptés permettait

de relever une diversité génétique chez *E. multilocularis* à l'échelle locale. Quatre génotypes NAK1 et 6 profils EmsB, eux même regroupés au sein de deux assemblages EmsB A et B ont été mis en évidence. Il n'a pas été possible d'apparier de manière exacte les profils EmsB avec les génotypes de la cible NAK1 et la faible diversité génétique existant entre certains profils EmsB a rendu leur distinction parfois délicate. Cette faible diversité observée au sein des assemblages A et B laisse supposer soit une différenciation récente à partir d'un profil unique, soit une homogénéisation de la population par des recombinaisons génétiques, dans une population alors considérée comme ancienne.

Ces six profils EmsB n'étaient pas distribués de manière homogène parmi les renards. En effet, l'un d'entre eux semblait prédominer, impliquant 19 renards sur 25 au total, alors que les autres profils étaient retrouvés de manière plus sporadique. Ce déséquilibre pourrait être expliqué par l'introduction récente de profils particuliers dans les Ardennes, probablement due à l'histoire des migrations des hôtes définitifs.

La co-habitation de parasites présentant différents profils était fréquente dans l'intestin du renard (13 / 25 renards). Ce phénomène a déjà été observé chez des renards sur l'île d'Hokkaido (Nakao et al. 2003). Le renard roux consomme plusieurs milliers de micromammifères par an (2000 à 7000) (Artois 1989; Giraudoux 1991). Malgré la faible prévalence d'*E. multilocularis* chez le rongeur en Europe de l'Ouest (Gottstein et al. 1996; Hanosset et al. 2008), le renard se réinfeste et accumule des vers *E. multilocularis* dans son intestin. Cette co-habitation dans l'intestin du renard de nombreux *E. multilocularis* issus de proies différentes et présentant des profils génétiques différents pourraient faciliter la survenue d'échanges génétiques. Cependant, seul un renard a présenté un génotype NAK1 « hétérozygote ». Dans le cas d'une reproduction croisée entre deux vers génétiquement distincts, il y aurait production d'œufs hybrides, se distinguant génétiquement du parent porteur. L'étude complémentaire portant sur 26 vers supplémentaires collectés chez le renard porteur du génotype hétérozygote a montré que ce croisement était antérieur à l'infestation de ce renard, puisque scolex et strobile ont tous deux présentés les mêmes génotypes. On peut donc supposer que la reproduction croisée ait eu lieu chez un autre renard et que le parasite hybride a ensuite été transmis au renard étudié. Cependant, il est à noter que la détection de deux pics de fluorescence sur un profil électrophorétique ne démontre pas catégoriquement l'existence d'un évènement de recombinaison entre 2 vers. La mutation d'un allèle sur un seul brin de l'ADN d'une cellule germinale peut conduire à l'apparition d'un parasite apparemment hétérozygote puis par polyembryonie de toute une population de vers présentant

cette mutation (Smyth & Smyth 1964). Cette dernière hypothèse serait alors en faveur de l'évolution préférentiellement clonale du parasite, sans l'intervention de recombinaison génétique. Les profils co-existeraient alors en sympatrie dans le foyer ardennais, sans générer d'échanges génétiques. De tels profils pourraient alors être maintenus un certain temps, en l'absence d'échange génétique entre les vers adultes.

L'étude de la diversité génétique du parasite à l'échelle continentale, a permis de mieux comprendre la dynamique spatiale d'*E. multilocularis*, ainsi que le mode de transmission du parasite en Europe, à une échelle jusqu'alors jamais étudiée pour un helminthe. L'amplification de la cible EmsB et l'analyse cladistique ont permis de mettre en évidence 34 génotypes parmi un panel de 596 vers adultes issus de l'autopsie de 129 renards. La présence simultanée de différents profils EmsB chez le renard a été fréquemment retrouvée dans le panel étudié, soulignant la généralisation du phénomène sur l'ensemble des régions observées. Six profils étaient majoritaires dans le panel de vers, représentant 69 % des échantillons. Cinq de ces profils ont été retrouvés dans la plupart des sous-régions étudiées. Nous les avons considérés comme des profils transversaux. Le sixième était apparemment endémique de la sous-région des Ardennes. D'autres profils n'étaient représentés que par un ver unique. La diffusion de parasites de génotypes différents en Europe pourrait alors s'effectuer soit sur de larges distances, par le biais de la dispersion des renards ou rester géographiquement limitée, probablement par le biais de facteurs locaux.

La zone centrale du foyer européen, décrite comme le foyer endémique historique d'*E. multilocularis* et représentée dans notre étude par l'est de la France, le sud de l'Allemagne, le Canton de Zürich en Suisse, l'Autriche et l'ouest de la Tchéquie, a présenté une diversité génétique supérieure à la zone périphérique. De plus, l'étude de la richesse et de la diversité génétique indique qu'un échantillonnage plus large en Europe conduirait à trouver d'avantage de profils génétiques, notamment dans la zone centrale. La région présentant le plus de diversité était située en Suisse, dans le canton de Zürich. Cette zone comprenait la ville de Zürich et des renards urbains ont été très certainement inclus dans ce panel. Une étude récente portant sur la diversité génétique des renards urbains de la ville de Zürich a montré l'existence de deux populations urbaines ainsi qu'une nette divergence entre les populations urbaines et rurales (Wandeler et al. 2003). De plus les renards présentaient de fortes prévalences d'*E. multilocularis* (47 % de prévalence en zone urbaine et 67 % en zone rurale) (Hofer et al. 2000). L'existence de nombreux profils apparemment endémiques du Canton de Zürich

pourrait être expliquée par l'ancienneté du foyer mais aussi par l'implication du parasite dans de nombreux cycles parasitaires locaux, véhiculés par ces populations de renards limitées en nombre et peu dispersées.

La zone périphérique, où la présence du parasite a été récemment documentée (les Ardennes françaises, le centre de la Slovaquie, la région montagneuse des Tatras et le nord de la Pologne) a présenté une diversité génétique moins importante que celle observée dans la zone centrale. Les profils prédominants, décrit pour chacune des sous-régions étaient pour la plus part également trouvés dans la zone centrale, mais dans celle-ci en plus faible effectif.

Un tel gradient de diversité entre le foyer central et la zone périphérique a précédemment été décrit chez d'autres parasites comme chez *Leishmania tropica*, où l'origine historique du parasite coïncidait avec les aires géographiques montrant la plus importante diversité génétique (Schwenkenbecher et al. 2006). On peut donc penser que le foyer central aurait pour rôle d'alimenter les zones périphériques, comme dans un système « continent-île », ce qui aurait pour conséquence de créer un déséquilibre dans la diversité génétique observée. En effet, si un petit nombre d'individus vient coloniser une zone inoccupée par l'espèce, une part seulement de l'information génétique du foyer ancestral sera apportée. Ce phénomène appelé effet de fondation aura pour conséquence qu'un profil fondateur peut devenir prédominant dans une zone nouvelle, alors qu'il ne l'était pas dans la population d'origine (Templeton 2008). C'est sans doute le cas pour les profils prédominants trouvés dans les régions de la zone périphérique, comme il a été observé dans le Nord de la Pologne où un profil largement présent en Europe mais cependant en faible effectif dans les autres sous-régions est retrouvé de manière prédominante dans cette zone géographique.

D'après la comparaison des distances géographiques et génétiques par le test de Mantel, la distance géographique ne serait qu'un des facteurs expliquant la diversité génétique observée en Europe. L'existence de facteurs locaux pourrait influencer la sélection de certains profils et créer une composition géotypique différente entre des foyers voisins. Dans la sous-région des Ardennes, l'existence d'un profil endémique ne peut être expliqué par un isolement géographique induit par des barrières naturelles ou anthropiques, puisque des profils largement retrouvés en Europe sont également présents dans cette région. L'existence de profils spécifiques de zones géographiques est probablement plus due à des différences dans le cycle de vie du parasite d'une zone à l'autre. L'implication d'hôtes particuliers pourrait

expliquer ce phénomène. En effet dans cette partie des Ardennes françaises, le rongeur *Microtus arvalis* semble être prédominant (Guislain et al. 2007), contrairement au massif du Jura voisin où *Arvicola terrestris* est trouvé avec *Microtus arvalis* (Viel et al. 1999).

L'ancienneté du phénomène de dispersion du parasite reste ici à discuter à partir de nos résultats et des données de la littérature. La présence de profils transversaux et de profils endémiques sur l'ensemble de la zone étudiée indiquerait l'existence d'importants échanges de parasites à une échelle géographique étendue. Ce constat est en contradiction avec une émergence récente du parasite dans les foyers de la zone périphérique. D'après un modèle mathématique réalisé dans une zone dite de nouvelle endémie comme les Pays-Bas, le front de migration d'*E. multilocularis* progresserait de 2,7 km par an vers le nord de ce pays (Takumi et al. 2008). Si l'on considère les débuts de l'émergence du parasite à 1990 en Europe, le parasite n'aurait été véhiculé que sur une cinquantaine de kilomètres au plus jusqu'à maintenant entre la zone centrale et la zone périphérique. La présence de profils très similaires entre des zones géographiquement distinctes comme la Suisse et la Pologne ne peut être due à une diffusion récente du parasite. Une estimation de l'ordre de plusieurs centaines d'années pourrait être avancée pour expliquer la présence de ces profils similaires.

La superposition des données génétiques obtenues chez les vers adultes des renards européens et chez les lésions métacestodes des patients et animaux en captivité en Europe a permis de poser des hypothèses quant au mode de transmission du parasite. En épidémiologie, la compréhension des événements ayant conduit à la contamination par un pathogène est un point essentiel dans le diagnostic, d'une part pour décrire le contexte de l'évènement infectieux et d'autre part pour évaluer les risques de transmission à la population humaine. Dans le cas de l'échinococcose humaine, maladie d'évolution lente, la rencontre avec le pathogène et les premiers signes cliniques peuvent être espacés de près de 15 ans. Il apparaît alors souvent difficile de pouvoir retracer les événements pouvant avoir causé cette rencontre. De plus la multiplicité des facteurs de risque (séjour en zone d'endémie, activités agricoles, consommation de fruits sauvages, pratique de la chasse aux renards, etc.) ne simplifie pas l'enquête épidémiologique. La reconnaissance du pathogène par une signature moléculaire pourrait aider à retracer l'histoire de la maladie.

Les profils transversaux prédominants en Europe étaient minoritaires chez l'homme et le singe. Cependant, nous avons vu que la diversité génétique n'avait pas encore été suffisamment appréhendée et qu'un échantillonnage plus vaste aurait abouti à la description de nombreux autres génotypes. Des profils décrits chez le parasite adulte de manière endémique ont été retrouvés infestant l'HI résidant dans la même aire géographique. L'existence de cycles du parasite spécialisés à une aire géographique restreinte, par des facteurs locaux peut alors être une nouvelle fois avancée pour expliquer l'existence locale de certains profils géographiquement limités.

Les patients résidant en dehors de la zone d'étude des renards européens ont présenté pour la plupart des profils qui n'avaient pas été décrits chez le renard. Là encore, un effort d'échantillonnage plus important devrait permettre certainement de décrire d'avantage de profils génétiques, particulièrement dans ces zones non couvertes. Néanmoins les informations sur le mode de transmission du parasite peuvent être tirées de l'observation faite sur le panel d'hôtes intermédiaires. Pour certains de ces profils nouveaux, une transmission du parasite à l'échelle locale pourrait être décrite. Par exemple, le profil P20 a été trouvé dans le canton de Vaud et les départements français frontaliers du Jura et du Doubs. L'homme et les animaux semblent être tous deux atteints dans ce périmètre restreint. Il serait alors pertinent de reprendre l'échantillonnage chez l'hôte définitif. De plus les relations épidémiologiques existant entre ces différents hôtes pourraient être étudiées, comme la fréquentation d'un même lieu, en l'occurrence ici les environs d'un parc zoologique. La région parisienne, où un nouveau profil a été décrit devrait être étudiée plus attentivement. Si la présence d'un cycle parisien est avéré, une activité parasitaire en zone urbaine pourrait présenter un risque de contamination important pour la population humaine, par la proximité d'animaux parasités avec les habitations et l'implication des animaux domestiques comme le chien dans la transmission du parasite à l'homme (Deplazes et al. 2004).

L'étude génétique de ce panel de lésions parasitaires collectées sur plus de 25 ans, permet de déduire que la cible EmsB est très stable dans le temps. En effet des profils très similaires, voir identiques ont été décrits chez des patients opérés dans les années 1980 et chez des renards autopsiés 20 ans après. Ce caractère fait de l'outil EmsB un marqueur performant pour des études rétrospectives réalisées sur des tissus conservées après examen

anatomopathologique, ainsi que le suivi de la transmission du parasite chez les différents acteurs du cycle à une échelle géographique étendue.

- Apport de l'étude génétique sur la compréhension du mode de reproduction du parasite

Ces travaux ont permis de mieux appréhender le mode de reproduction du parasite *E. multilocularis*, qui semble présenter une reproduction majoritairement clonale par autogamie. Cependant, la reproduction croisée est possible chez *E. multilocularis* (Rausch 1985). Pour être identifiable, il faut que le croisement soit accompli entre deux vers génétiquement différents. Le faible taux de recombinaison observé chez *E. multilocularis* pourrait être lié à la répartition des vers dans l'intestin du renard. On peut penser que les métacestodes absorbés, provenant de différents rongeurs parasités colonisent l'intestin du renard à différents points de la muqueuse intestinale. Chez un renard présentant un pauciparasitisme la probabilité de croisement entre deux populations de parasites différentes est alors faible. En revanche, dans le cas de fortes charges, la promiscuité entre les différentes populations d'*E. multilocularis* pourrait alors induire la production d'œufs hybrides. Ainsi ces événements de recombinaison n'ont une forte probabilité de survenir que lors d'un hyperparasitisme. Cependant nous n'avons pratiquement jamais retrouvé de profils hétérozygotes même chez les renards présentant de fortes charges parasitaires (> 10000 individus). La reproduction par autogamie semble ainsi prédominer chez le parasite. Un tel mode de reproduction chez un organisme conduirait à une diminution de la diversité génétique à un niveau local et à l'augmentation des différences entre les populations de parasites isolées géographiquement en l'absence de flux géniques (Emelianov 2007), ou impliquées dans des cycles parasitaires particuliers.

La stabilité des profils génétiques du parasite pourrait alors être essentiellement due à ce mode de reproduction clonale. Un parasite transmis sur de grandes distances géographiques a très certainement subi au cours de sa diffusion des centaines voir des milliers de cycles parasitaires et a ainsi été de nombreuses fois mis en présence d'autres parasites présentant des profils génétiques différents. Cependant certains profils génétiques ont été trouvés de manière identique d'un bout à l'autre de l'Europe. Dans le cas d'une reproduction exclusivement clonale, la présence d'un grand nombre de profils génétiques dans le foyer européen serait alors due essentiellement à l'apparition de mutations dans le génome du parasite produites sur des centaines voir des milliers d'années. Cette évolution clonale pourrait alors expliquer le

faible niveau de polymorphisme observé lors de l'étude des marqueurs mitochondriaux et nucléaires simple-locus.

- *Fonctionnement du foyer européen*

Pour conclure, l'ensemble de ces travaux menés sur l'étude du polymorphisme d'*E. multilocularis* en Europe par l'application de marqueurs moléculaires adaptés a permis de poser des hypothèses sur le fonctionnement du foyer endémique européen. L'étude de la distribution de la diversité génétique du parasite en Europe a conduit à l'observation d'un ensemble de populations parasitaires juxtaposées, circulant au sein de foyers interconnectés. Ces échanges sont rendus possibles par la dispersion de l'hôte définitif (Artois 1989). Le parasite pourrait être alors véhiculé d'un foyer à un autre et ainsi connaître une dispersion sur de grandes distances. Cette dispersion en Europe se déroulerait selon un système « continent-île », où la région centrale alimenterait la zone périphérique. La colonisation de nouveaux territoires peut être suivie d'un effet de fondation, impliquant un petit nombre d'individus dans le nouveau milieu. Les individus ne portant qu'une part de la diversité génétique du foyer d'origine peuvent alors constituer des populations de composition génétique différente (Ricklefs & Miller 2005; Templeton 2008). L'extension du foyer européen est alors possible vers des territoires considérés comme indemnes. Cependant l'expansion du parasite se déroulerait sur des dizaines voir des centaines d'années. A côté de ce système général, certaines populations d'*E. multilocularis* pourraient évoluer de manière locale par des facteurs locaux particuliers, comme par exemple l'existence de barrières montagneuses. Ce peut être le cas dans le massif des Grisons, dans les Alpes suisses italiennes, où des populations de parasites existeraient au sein de foyers séparés par des massifs montagneux et d'interconnexions limitées (Tanner et al. 2006). La spécialisation de cycles locaux pourrait également être due à l'implication d'hôtes particuliers, comme on l'a suspecté dans les Ardennes (le rongeur *Microtus arvalis*) et dans le Canton de Zürich (le renard urbain) (Deplazes et al. 2004; Guislain et al. 2007).

- Perspectives pour l'application de la cible *EmsB*

La diversité génétique d'*E. multilocularis* dans le contexte des vallées des Grisons sera étudiée pour mieux appréhender le mode de circulation d'un parasite dans un espace géographique d'accès limité et où des cas d'EA ont été signalés depuis plusieurs années.

Le fonctionnement des autres foyers d'*E. multilocularis* dans l'hémisphère nord nécessite également d'être étudié en tenant compte de leurs particularités. Par exemple, dans le foyer chinois, un plus large spectre d'hôtes définitifs et intermédiaires serait impliqué dans la transmission du parasite, par comparaison au foyer européen (Vuitton et al. 2003), l'implication de l'homme dans la transmission du parasite (déplacements des hôtes définitifs parasités sur de grandes distances, comme le chien tibétain, la déforestation/reforestation favorables à la prolifération des hôtes, etc. (Giraudoux et al. 2006)) sont autant de facteurs pouvant engendrer des différences dans le mode de diffusion du parasite. On peut alors penser que l'implication dans le cycle parasitaire de profils présentant un phénotype particulier, comme un pouvoir pathogène plus important pourrait être transmis de manière locale, avec l'intervention de chiens domestiques et puisse conduire à l'apparition de cas humains d'échinococcose de manière plus fréquente dans des zones géographiquement limitées.

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

REFERENCES

- Ammann, R. W., and J. Eckert. 1996. Cestodes. *Echinococcus*. Gastroenterol Clin North Am **25**:655-689.
- Artois, M. 1989. Le Renard roux (*Vulpes vulpes*, Linnaeus, 1758). Artois M, Delatre P, editors. Encyclopédie des carnivores de France. Nort/Erdre: SFPEM:90 pp.
- Aubert, M., P. Jacquier, M. Artois, M. J. Barrat, and A. M. Basile. 1987. Le portage d'*Echinococcus multilocularis* par le renard (*Vulpes vulpes*) en Lorraine. Conséquences sur la contamination humaine. Rec. Méd. Vét. **163**:839-843.
- Auer, H., and H. Aspöck. 1991. Incidence, prevalence and geographic distribution of human alveolar echinococcosis in Austria from 1854 to 1990. Parasitol Res **77**:430-436.
- Ballek, D., M. Takla, S. Ising-Volmer, and M. Stoye. 1992. [The helminth fauna of red foxes (*Vulpes vulpes* Linnaeus 1758) in north Hesse and east Westphalia. 1. Cestodes]. Dtsch Tierarztl Wochenschr **99**:362-365.
- Bardonnet, K., M. C. Benchikh-Elfegoun, J. M. Bart, S. Harraga, N. Hannache, S. Haddad, H. Dumon, D. A. Vuitton, and R. Piarroux. 2003. Cystic echinococcosis in Algeria: cattle act as reservoirs of a sheep strain and may contribute to human contamination. Vet Parasitol **116**:35-44.
- Bart, J. M. 2004. Développement et évaluation de marqueurs moléculaires à l'identification d'*Echinococcus* spp. : application à l'étude de foyers d'échinococcoses kystique et alvéolaire en Europe et en Afrique du Nord. PhD Thesis, University of Franche-Comté.
- Bart, J. M., K. Bardonnet, M. C. Elfegoun, H. Dumon, L. Dia, D. A. Vuitton, and R. Piarroux. 2004. *Echinococcus granulosus* strain typing in North Africa: comparison of eight nuclear and mitochondrial DNA fragments. Parasitology **128**:229-234.
- Bart, J. M., I. Breyer, B. Gottstein, T. Romig, and R. Piarroux. 2003. Development of molecular tools to explore genetic diversity in *Echinococcus multilocularis*. Helminthologia **40**:117-121.
- Bessonov, A. S. 2002. Echinococcoses of animals and humans in the Russian federation. Cestode Zoonoses: Echinococcosis and Cysticercosis **P. Craig and Z. Pawlowski (Eds.):91-98**.
- Boucher, J. M., R. Hanosset, D. Augot, J. M. Bart, M. Morand, R. Piarroux, F. Pozet-Bouhier, B. Losson, and F. Cliquet. 2005. Detection of *Echinococcus multilocularis* in wild boars in France using PCR techniques against larval form. Vet Parasitol **129**:259-266.
- 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.
- Bowles, J., and D. P. McManus. 1993. Molecular variation in *Echinococcus*. Acta Trop **53**:291-305.
- Brack, M., K. Tackmann, F. J. Conraths, and S. Rensing. 1997. Alveolar hydatidosis (*Echinococcus multilocularis*) in a captive rhesus monkey (*Macaca mulatta*) in Germany. Trop Med Int Health **2**:754-759.

- Bresson-Hadni, S., R. Piarroux, B. Bartholomot, J. P. Miguet, G. Manton, and D. Vuitton. 2005. Echinococcose alvéolaire - Alveolar echinococcosis. EMC - Hépatogastroentérologie **2**:86-104.
- Bretagne, S., B. Assouline, D. Vidaud, R. Houin, and M. Vidaud. 1996. *Echinococcus multilocularis*: microsatellite polymorphism in U1 snRNA genes. Exp Parasitol **82**:324-328.
- Bretagne, S., J. P. Guillou, M. Morand, and R. Houin. 1993. Detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in fox faeces using DNA amplification. Parasitology **106** (Pt 2):193-199.
- Bretagne, S., B. Robert, D. Vidaud, M. Goossens, and R. Houin. 1991. Structure of the *Echinococcus multilocularis* U1 snRNA gene repeat. Mol Biochem Parasitol **46**:285-292.
- Brossard, M., C. Andreutti, and M. Siegenthaler. 2007. Infection of red foxes with *Echinococcus multilocularis* in western Switzerland. J Helminthol **81**:369-376.
- Brown, W. M., M. George, Jr., and A. C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc Natl Acad Sci U S A **76**:1967-1971.
- Bruzinskaite, R., A. Marcinkute, K. Strupas, V. Sokolovas, P. Deplazes, A. Mathis, C. Eddi, and M. Sarkunas. 2007. Alveolar Echinococcosis, Lithuania. Emerg Infect Dis **13**:1618-1619.
- Bulle, B., L. Millon, J. M. Bart, M. Gallego, F. Gambarelli, M. Portus, L. Schnur, C. L. Jaffe, S. Fernandez-Barredo, J. M. Alunda, and R. Piarroux. 2002. Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. J Clin Microbiol **40**:3391-3397.
- Bulter, J. M. 2007. Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. BioTechniques **43**:Sii-Sv.
- Campbell, G., H. H. Garcia, M. Nakao, A. Ito, and P. S. Craig. 2006. Genetic variation in *Taenia solium*. Parasitol Int **55** Suppl:S121-126.
- Casulli, A., M. T. Manfredi, G. La Rosa, A. R. Di Cerbo, A. Dinkel, T. Romig, P. Deplazes, C. Genchi, and E. Pozio. 2005. *Echinococcus multilocularis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) of the Italian Alpine region: is there a focus of autochthonous transmission? Int J Parasitol **35**:1079-1083.
- Charbonnet, P., L. Buhler, E. Sagnak, P. Villiger, P. Morel, and G. Mentha. 2004. [Long-term followup of patients with alveolar echinococcosis]. Ann Chir **129**:337-342.
- Combes, C. 1995. Intérations durables. Ecologie et évolution du parasitisme. Collection Ecologique, Masson **26**:16.
- Craig, P. S. 2006. Epidemiology of human alveolar echinococcosis in China. Parasitol Int **55** Suppl:S221-225.
- Craig, P. S., L. Deshan, C. N. MacPherson, S. Dazhong, D. Reynolds, G. Barnish, B. Gottstein, and W. Zhirong. 1992. A large focus of alveolar echinococcosis in central China. Lancet **340**:826-831.
- Craig, P. S., P. Giraudoux, D. Shi, B. Bartholomot, G. Barnish, P. Delattre, J. P. Quere, S. Harraga, G. Bao, Y. Wang, F. Lu, A. Ito, and D. A. Vuitton. 2000. An epidemiological and ecological study of human alveolar echinococcosis transmission in south Gansu, China. Acta Trop **77**:167-177.
- Craig, P. S., M. T. Rogan, and M. Campos-Ponce. 2003. Echinococcosis: disease, detection and transmission. Parasitology **127** Suppl:S5-20.

- da Silva, C. M., Henrique, B. Ferreira, M. Picon, N. Gorfinkiel, R. Ehrlich, and A. Zaha. 1993. Molecular cloning and characterization of actin genes from *Echinococcus granulosus*. *Mol Biochem Parasitol* **60**:209-219.
- DebRoy, S., and R. Bivand. 2008. foreign: Read Data Stored by Minitab, S, SAS, SPSS, Stata, Systat, dBase. Version 08-25.
- Deplazes, P., and J. Eckert. 1996. Diagnosis of the *Echinococcus multilocularis* infection in final hosts. *Appl Parasitol* **37**:245-252.
- Deplazes, P., and J. Eckert. 2001. Veterinary aspects of alveolar echinococcosis--a zoonosis of public health significance. *Vet Parasitol* **98**:65-87.
- Deplazes, P., D. Hegglin, S. Gloor, and T. Romig. 2004. Wilderness in the city: the urbanization of *Echinococcus multilocularis*. *Trends Parasitol* **20**:77-84.
- Dinkel, A., M. von Nickisch-Rosenegk, B. Bilger, M. Merli, R. Lucius, and T. Romig. 1998. Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. *J Clin Microbiol* **36**:1871-1876.
- Doi, R., E. Kanda, N. Nihei, and A. Uchida. 2000. [Occurrence of alveolar hydatid disease (multilocular echinococcosis) outside of Hokkaido and a proposal for its prevention]. *Nippon Koshu Eisei Zasshi* **47**:111-126.
- Dubinsky, P., A. Malczewski, M. Miterpakova, J. Gawor, and K. Reiterova. 2006. *Echinococcus multilocularis* in the red fox *Vulpes vulpes* from the East Carpathian region of Poland and the Slovak Republic. *J Helminthol* **80**:243-247.
- Dubinsky, P., V. Svobodova, L. Turcekova, K. Litterak, K. Martinek, K. Reiterova, L. Kolarova, J. Klimes, and V. Mrlik. 1999. *Echinococcus multilocularis* in Slovak republic: the first record in red foxes. *Helminthologia* **36**:105-110.
- Eckert, J., F. J. Conraths, and K. Tackmann. 2000. Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? *Int J Parasitol* **30**:1283-1294.
- Eckert, J., and P. Deplazes. 2004. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev* **17**:107-135.
- Eckert, J., P. Deplazes, P. S. Craig, M. A. Gemmel, B. Gottstein, D. D. Health, B. L. Jenkins, H. Kamiya, and M. W. Lightowers. 2001a. Echinococcosis in animals: clinical aspects, diagnosis and treatment. J. Eckert, M.A Gemmel, F.X. Meslin, and Z.S.Pawloski (ed.) **WHO/OIE manuel on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. World Organisation for Animal Health, Paris, France.**:72-99.
- Eckert, J., P. M. Schantz, R. B. Gasser, P. Torgerson, A. S. Bessonov, S. O. Movsessian, A. Thakur, F. Grimm, and M. A. Nikogossian. 2001b. Geographical distribution and prevalence. WHO/OIE Manuel on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern:100-142.
- Eckert, J., and R. C. Thompson. 1988. *Echinococcus* strains in Europe: a review. *Trop Med Parasitol* **39**:1-8.
- Eckert, J., R. C. Thompson, and H. Mehlhorn. 1983. Proliferation and metastases formation of larval *Echinococcus multilocularis*. I. Animal model, macroscopical and histological findings. *Z Parasitenkd* **69**:737-748.
- Eiermann, T. H., F. Bettens, P. Tiberghien, K. Schmitz, I. Beurton, S. Bresson-Hadni, R. W. Ammann, S. F. Goldmann, D. A. Vuitton, B. Gottstein, and P. Kern. 1998. HLA and alveolar echinococcosis. *Tissue Antigens* **52**:124-129.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* **5**:435-445.

- Emelianov, I. 2007. How adaptive is parasite species diversity? *Int J Parasitol* **37**:851-860.
- Estoup, A., P. Jarne, and J.-M. Cornuet. 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetic analysis. *Mol Ecol* **11**:1591-1604.
- EurEchinoReg. 1999. European Network for Concerted Surveillance of Alveolar Echinococcosis: final report. (<http://www.eurechinoreg.org>). Community Programme for Prevention of AIDS and some other communicable diseases. European Commission, Unité de Recherche SERF, Université de Franche-Comté, F-25030 Besançon.
- Fischer, C., L. A. Reperant, J. M. Weber, D. Hegglin, and P. Deplazes. 2005. *Echinococcus multilocularis* infections of rural, residential and urban foxes (*Vulpes vulpes*) in the canton of Geneva, Switzerland. *Parasite* **12**:339-346.
- Fraser, A., F. Elayoubi, and P. Craig. 2002. Detection of cestode infections in definitive hosts: present status and future advances. *Cestode Zoonoses: Echinococcosis and Cysticercosis* P. Craig and Z. Pawlowski (Eds.), **IOS Press**:157-175.
- Fuglei, E., A. Stien, N. G. Yoccoz, R. A. Ims, N. E. Eide, P. Prestrud, P. Deplazes, and A. Oksanen. 2008. Spatial distribution of *Echinococcus multilocularis*, Svalbard, Norway. *Emerg Infect Dis* **14**:73-75.
- Gasser, R. B., and N. B. Chilton. 1995. Characterisation of taeniid cestode species by PCR-RFLP of ITS2 ribosomal DNA. *Acta Trop* **59**:31-40.
- Gasser, R. B., X. Zhu, N. B. Chilton, L. A. Newton, T. Nedergaard, and P. Guldborg. 1998. Analysis of sequence homogenisation in rDNA arrays of *Haemonchus contortus* by denaturing gradient gel electrophoresis. *Electrophoresis* **19**:2391-2395.
- Gerbi, S. A. 1986. The evolution of eukaryotic ribosomal DNA. *Biosystems* **19**:247-258.
- Giraudoux, P. 1991. Utilisation de l'espace par les hôtes du ténia multiloculaire (*Echinococcus multilocularis*) : conséquences épidémiologiques. PhD Thesis, University of Bourgogne:90.
- Giraudoux, P. 2006. pgirmess: miscellaneous functions for analysis and displays of ecological and spatial data. R package version 1.2.5.
- Giraudoux, P., D. Pleydell, F. Raoul, J. P. Quere, Q. Wang, Y. Yang, D. A. Vuitton, J. Qiu, W. Yang, and P. S. Craig. 2006. Transmission ecology of *Echinococcus multilocularis*: What are the ranges of parasite stability among various host communities in China? *Parasitol Int* **55 Suppl**:S237-246.
- Gottstein, B., and M. R. Mowatt. 1991. Sequencing and characterization of an *Echinococcus multilocularis* DNA probe and its use in the polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* **44**:183-193.
- Gottstein, B., F. Saucy, C. Wyss, M. Siegenthaler, P. Jacquier, M. Schmitt, M. Brossard, and G. Demierre. 1996. Investigations on a Swiss area highly endemic for *Echinococcus multilocularis*. *Appl Parasitol* **37**:129-136.
- Gourlain, K., B. Amellal, Z. Ait Arkoub, N. Dupin, C. Katlama, and V. Calvez. 2003. Quantitative analysis of human mitochondrial DNA using a real-time PCR assay. *HIV Med* **4**:287-292.
- Guislain, M. H., F. Raoul, P. Giraudoux, M. E. Terrier, G. Froment, H. Ferte, and M. L. Poulle. 2008. Ecological and biological factors involved in the transmission of *Echinococcus multilocularis* in the French Ardennes. *J Helminthol* **82**:143-151.

- Guislain, M. H., F. Raoul, M. L. Poulle, and P. Giraudoux. 2007. Fox faeces and vole distribution on a local range: ecological data in a parasitological perspective for *Echinococcus multilocularis*. *Parasite* **14**:299-308.
- Haag, K. L., A. M. Araujo, B. Gottstein, and A. Zaha. 1998. Selection, recombination and history in a parasitic flatworm (*Echinococcus*) inferred from nucleotide sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **93**:695-702.
- Haag, K. L., A. Zaha, A. M. Araujo, and B. Gottstein. 1997. Reduced genetic variability within coding and non-coding regions of the *Echinococcus multilocularis* genome. *Parasitology* **115** (Pt 5):521-529.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**:95-98.
- Hancock, J. M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. *Microsatellites: Evolution and Applications* (Ed. Goldstein, DB, Schlotterer, C).
- Hanosset, R., B. Mignon, and B. Losson. 2004. Données récentes sur une zoonose d'actualité : l'échinococcose alvéolaire due à *Echinococcus multilocularis*. *Ann Méd Vet* **148**:153-167.
- Hanosset, R., C. Saegerman, S. Adant, L. Massart, and B. Losson. 2008. *Echinococcus multilocularis* in Belgium: Prevalence in red foxes (*Vulpes vulpes*) and in different species of potential intermediate hosts. *Vet Parasitol* **151**:212-217.
- Hegglin, D., F. Bontadina, P. Contesse, S. Gloor, and P. Deplazes. 2007. Plasticity of predation behaviour as a putative driving force for parasite life-cycle dynamics: the case of urban foxes and *Echinococcus multilocularis* tapeworm. *Functional Ecology* **21**:552-560.
- Henttonen, H., E. Fuglei, C. N. Gower, V. Haukialmi, R. A. Ims, J. Niemimaa, and N. G. Yoccoz. 2001. *Echinococcus multilocularis* on Svalbard: introduction of an intermediate host has enabled the local life-cycle. *Parasitology* **123**:547-552.
- Hildreth, M. B., S. Sriram, B. Gottstein, M. Wilson, and P. M. Schantz. 2000. Failure to identify alveolar echinococcosis in trappers from South Dakota in spite of high prevalence of *Echinococcus multilocularis* in wild canids. *J Parasitol* **86**:75-77.
- Hite, J. M., J. Eckert, and K. C. Cheng. 1996. Factors affecting fidelity of DNA synthesis during PCR amplification of d(C-A)n.d(G-T)n microsatellite repeats. *Nucleic Acids Res.* **24**:2429-2434.
- Hofer, S., S. Gloor, U. Muller, A. Mathis, D. Hegglin, and P. Deplazes. 2000. High prevalence of *Echinococcus multilocularis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) and voles (*Arvicola terrestris*) in the city of Zurich, Switzerland. *Parasitology* **120** (Pt 2):135-142.
- Horvath, A., A. Patonay, D. Banhegyi, J. Szlavik, G. Balazs, D. Gorog, and K. Werling. 2008. [The first case of human alveolar echinococcosis in Hungary.]. *Orv Hetil* **149**:795-799.
- Hunter, P. R., and M. A. Gaston. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* **26**:2665-2666.
- Huttner, M., M. Nakao, T. Wassermann, L. Siefert, J. D. Boomker, A. Dinkel, Y. Sako, U. Mackenstedt, T. Romig, and A. Ito. 2008. Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. *Int J Parasitol* **38**:861-868.

- Ito, A., M. Nakao, and Y. Sako. 2007. Echinococcosis: serological detection of patients and molecular identification of parasites. *Future Microbiol* **2**:439-449.
- Ito, A., M. Okamoto, H. Kariwa, T. Ishiguro, A. Hashimoto, and M. Nakao. 1996. Antibody responses against *Echinococcus multilocularis* antigens in naturally infected *Rattus norvegicus*. *J Helminthol* **70**:355-357.
- Ito, A., H. Yamasaki, M. Nakao, Y. Sako, M. Okamoto, M. O. Sato, K. Nakaya, S. S. Margono, T. Ikejima, A. A. Kassuku, S. M. Afonso, W. B. Ortiz, A. Plancarte, A. Zoli, S. Geerts, and P. S. Craig. 2003. Multiple genotypes of *Taenia solium*--ramifications for diagnosis, treatment and control. *Acta Trop* **87**:95-101.
- Jeffreys, A. J., V. Wilson, and S. L. Thein. 1985a. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* **314**:67-73.
- Jeffreys, A. J., V. Wilson, and S. L. Thein. 1985b. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* **316**:76-79.
- Jenkins, D. J., T. Romig, and R. C. Thompson. 2005. Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp.-a global update. *International Journal for Parasitology* **35**:1205-1219.
- Jonas, D., and K. Dräger. 1998. Untersuchungen von Füchsen auf *Echinococcus multilocularis*: Entwicklung seit 1982 und situation 1996/97 in Rheinland-Pfalz. *Tierärztl Umsch.* **53**:214-221.
- Kamiya, H., T. Inaba, H. Sato, and A. Osanai. 2003. A red fox, *Vulpes vulpes shrencki*, infected with *Echinococcus multilocularis* was introduced from Hokkaido Island, where *E. multilocularis* is endemic, to Aomori, northern part of the mainland Japan. *Jpn J Infect Dis* **56**:180-181.
- Kamiya, M., J. Trinipil Lagapa, and Y. Oku. 2007. Research on targeting sources of alveolar echinococcosis in Japan. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **30**:427-448.
- Kapel, C. M., P. R. Torgerson, R. C. Thompson, and P. Deplazes. 2006. Reproductive potential of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes, dogs, raccoon dogs and cats. *Int J Parasitol* **36**:79-86.
- Kedra, A. H., Z. Swiderski, V. V. Tkach, B. Rocki, J. Pawlowski, and Z. Pawlowski. 2000. Variability within NADH dehydrogenase sequences of *Echinococcus multilocularis*. *Acta Parasitologica* **45**:353-355.
- Keitt, T. H., R. Bivand, E. J. Pebesma, and B. Rowlingson. 2008. rgdal: Bindings for the Geospatial Data Abstraction Library. Version 05-24.
- Kern, P., K. Bardonnnet, E. Renner, H. Auer, Z. Pawlowski, R. W. Ammann, and D. A. Vuitton. 2003. European echinococcosis registry: human alveolar echinococcosis, Europe, 1982-2000. *Emerg Infect Dis* **9**:343-349.
- 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**:565-570.
- Legendre, P., and L. Legendre. 1998. Numerical ecology, 2nd English edition. Elsevier Science BV, Amsterdam.
- Leiby, P. D., W. P. Carney, and C. E. Woods. 1970. Studies on sylvatic echinococcosis. 3. Host occurrence and geographic distribution of *Echinococcus multilocularis* in the north central United States. *J Parasitol* **56**:1141-1150.
- Lessa, E. P., and G. Applebaum. 1993. Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. *Mol Ecol* **2**:119-129.

- Lewin-Koh, N. J., and R. Bivand. 2008. maptools: Tools for reading and handling spatial objects. Version 07-13.
- Li, J. Z., D. M. Absher, H. Tang, A. M. Southwick, A. M. Casto, S. Ramachandran, H. M. Cann, G. S. Barsh, M. Feldman, L. L. Cavalli-Sforza, and R. M. Myers. 2008. Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation. *Science* **319**:1100-1104.
- Logar, J., B. Soba, T. Lejko-Zupanc, and T. Kotar. 2007. Human alveolar echinococcosis in Slovenia. *Clin Microbiol Infect*.
- Losson, B., T. Kervyn, J. Detry, P. P. Pastoret, B. Mignon, and B. Brochier. 2003. Prevalence of *Echinococcus multilocularis* in the red fox (*Vulpes vulpes*) in southern Belgium. *Vet Parasitol* **117**:23-28.
- Lymbery, A. J. 1995. Genetic diversity, genetic differentiation and speciation in the genus *Echinococcus* Rudolphi 1801. In : *Echinococcus* and hydatid disease, Thompson RCA, Lymbery AJ (eds), CAB International, Wallingford:51-88.
- Lymbery, A. J., C. C. Constantine, and R. C. Thompson. 1997. Self-fertilization without genomic or population structuring in a parasitic tapeworm. *Evolution* **51**:289-294.
- Machnicka-Rowinska, B., B. Rocki, E. Dziemian, and M. Kolodziej-Sobocinska. 2002. Raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*)--the new host of *Echinococcus multilocularis* in Poland. *Wiad Parazytol* **48**:65-68.
- 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.
- Malczewski, A., A. Ramisz, B. Rocki, R. Bienko, A. Balicka-Ramisz, and J. Eckert. 1999. *Echinococcus multilocularis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Poland: an update of the epidemiological situation. *Acta Parasitologica* **44**:68-72.
- Malczewski, A., B. Rocki, A. Ramisz, and J. Eckert. 1995. *Echinococcus multilocularis* (*Cestoda*), the causative agent of alveolar echinococcosis in humans: first record in Poland. *J Parasitol* **81**:318-321.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* **27**:209-220.
- Martinek, K., L. Kolarova, E. Hapl, I. Literak, and M. Uhrin. 2001. *Echinococcus multilocularis* in European wolves (*Canis lupus*). *Parasitol Res* **87**:838-839.
- Mathis, A., and P. Deplazes. 2006. Copro-DNA tests for diagnosis of animal taeniid cestodes. *Parasitol Int* **55 Suppl**:S87-90.
- Mathis, A., P. Deplazes, and J. Eckert. 1996. An improved test system for PCR-based specific detection of *Echinococcus multilocularis* eggs. *J Helminthol* **70**:219-222.
- Mazeika, V., A. Paulauskas, and L. Balciauskas. 2003. New data on the helminth fauna of rodents of Lithuania. *Acta Zoologica Lituanica* **13**:41-47.
- McManus, D. P. 2006. Molecular discrimination of taeniid cestodes. *Parasitol Int* **55S**:S31-S37.
- Moks, E., U. Saarma, and H. Valdmann. 2005. *Echinococcus multilocularis* in Estonia. *Emerg Infect Dis* **11**:1973-1974.
- Monnier, P., F. Cliquet, M. Aubert, and S. Bretagne. 1996. Improvement of a polymerase chain reaction assay for the detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in faecal samples of foxes. *Vet Parasitol* **67**:185-195.

- Moreira, D. 1998. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Res* **26**:3309-3310.
- Morishima, Y., H. Sugiyama, K. Arakawa, and M. Kawanaka. 2006. *Echinococcus multilocularis* in dogs, Japan. *Emerg Infect Dis* **12**:1292-1294.
- Nakao, M., D. P. McManus, P. M. Schantz, P. S. Craig, and A. Ito. 2007. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* **134**:713-722.
- Nakao, M., M. Okamoto, Y. Sato, H. Yamasaki, K. Nakaya, and A. Ito. 2002a. A phylogenetic hypothesis for the distribution of two genotypes of the pig tapeworm *Taenia solium* worldwide. *Parasitology* **124**:657-662.
- Nakao, M., Y. Sako, and A. Ito. 2003. Isolation of polymorphic microsatellite loci from the tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Infect Genet Evol* **3**:159-163.
- Nakao, M., N. Yokoyama, Y. Sako, M. Fukunaga, and A. Ito. 2002b. The complete mitochondrial DNA sequence of the cestode *Echinococcus multilocularis* (Cyclophyllidea: Taeniidae). *Mitochondrion* **1**:497-509.
- Nebel, W. 1996. Die Ergebnisse bisheriger Untersuchungen auf *Echinococcus multilocularis* in Schleswig-Holstein. Zur epidemiologischen Situation des *Echinococcus multilocularis* - breitet sich eine gefährliche Parasitose in the Bundesrepublik Deutschland aus? (K. Tackmann & K. Janitschke, eds.) **RKI-Hilfe 14, Robert-Koch-Institut, Berlin, 97.**
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nothdurft, H. D., F. Jelinek, A. Mai, B. Sigl, F. von Sonnenburg, and T. Loscher. 1995. Epidemiology of alveolar echinococcosis in Southern Germany (Bavaria). *Infection* **23**:85-88.
- Nurnberg, P., L. Roewer, H. Neitzel, K. Sperling, A. Popperl, J. Hundrieser, H. Poche, C. Epplen, H. Zischler, and J. T. Epplen. 1989. DNA fingerprinting with the oligonucleotide probe (CAC)₅/(GTG)₅: somatic stability and germline mutations. *Hum Genet* **84**:75-78.
- OIE, M. o. D. T. a. V. f. T. A. 2004. *Echinococcosis/Hydatidosis*. Chapter 2.2.3. **5th edition.**
- Okamoto, M., O. Fujita, J. Arikawa, T. Kurosawa, Y. Oku, and M. Kamiya. 1992. Natural *Echinococcus multilocularis* infection in a Norway rat, *Rattus norvegicus*, in southern Hokkaido, Japan. *Int J Parasitol* **22**:681-684.
- Okamoto, M., Y. Oku, T. Kurosawa, and M. Kamiya. 2007. Genetic uniformity of *Echinococcus multilocularis* collected from different intermediate host species in Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci* **69**:159-163.
- Orita, M., Y. Suzuki, T. Sekiya, and K. Hayashi. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* **5**:874-879.
- Pavlasek, I. 1998. Actual situation in the occurrence of *Echinococcus multilocularis* in red foxes in Europe and in the Czech Republic [in Czech]. *Remedia Klin. Mikrobiol.* **2**:233-240.
- Pavlasek, I., J. Chalupsky, L. Kolarova, B. Horyna, and J. Ritter. 1997. [Occurrence of *Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863, in foxes (*Vulpes vulpes*) in the Czech Republic]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* **46**:158-162.
- Pawlowski, J., J. Eckert, D. Vuitton, R. Ammann, P. Kern, P. Craig, F. K. Dar, F. De Rosa, C. Filice, B. Gottstein, F. Grimm, C. N. Macpherson, N. Sato, T. Todorov, J. Uchido, W. von Sinner, and H. Wen. 2002. Echinococcosis in humans: clinical aspects, diagnosis

- and treatment. WHO/OIE Manuel on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern:20-71.
- Pebesma, E. J., and R. Bivand. 2008. sp: classes and methods for spatial data. Version 09-25.
- Petavy, A. F., S. Deblock, and C. Prost. 1990. [Epidemiology of alveolar echinococcosis in France. 1. Intestinal helminths in the red fox (*Vulpes vulpes* L.) from Haute-Savoie]. *Ann Parasitol Hum Comp* **65**:22-27.
- 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. Vuitton, and p. l. r. FrancEchino. 2006. Surveillance de l'échinococose alvéolaire en France : bilan de cinq années d'enregistrement 2001-2005. *BEH n°27-28/2006*:206-208.
- Prosl, H., and E. Schmid. 1991. Zum Vorkommen von *Echinococcus multilocularis* in Österreich. *Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol.* **13**.
- Raoul, F., P. Deplazes, N. Nonaka, R. Piarroux, D. A. Vuitton, and P. Giraudoux. 2001. Assessment of the epidemiological status of *Echinococcus multilocularis* in foxes in France using ELISA coprotests on fox faeces collected in the field. *Int J Parasitol* **31**:1579-1588.
- Rausch, R., and E. L. Schiller. 1954. Studies on the helminth fauna of Alaska. XXIV. *Echinococcus sibiricensis* n. sp. from St. Lawrence Island. *J Parasitol* **40**:659-662.
- Rausch, R. L. 1985. Presidential address. Parasitology: retrospect and prospect. *J Parasitol* **71**:139-151.
- Rausch, R. L., F. H. Fay, and F. S. Williamson. 1990. The ecology of *Echinococcus multilocularis* (Cestoda: Taeniidae) on St. Lawrence Island, Alaska. II. Helminth populations in the definitive host. *Ann Parasitol Hum Comp* **65**:131-140.
- Rausch, R. L., and S. H. Richards. 1971. Observations on parasite-host relationships of *Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863, in North Dakota. *Can J Zool* **49**:1317-1330.
- Rausch, V. R., and R. L. Rausch. 1981. The karyotype of *Echinococcus multilocularis* (Cestoda: Taeniidae). *Can J Genet Cytol* **23**:151-154.
- R-Development-Core-Team. 2005. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria **ISBN 3-900051-07-0**, **URL <http://www.r-project.org>**.
- Rehmann, P., A. Grone, A. Lawrenz, O. Pagan, B. Gottstein, and L. N. Bacciarini. 2003. *Echinococcus multilocularis* in two lowland gorillas (*Gorilla g. gorilla*). *J Comp Pathol* **129**:85-88.
- Ricklefs, R. E., and G. L. Miller. 2005. *Ecologie*. De Boeck Université:288.
- Rinder, H., R. L. Rausch, K. Takahashi, H. Kopp, A. Thomschke, and T. Loscher. 1997. Limited range of genetic variation in *Echinococcus multilocularis*. *J Parasitol* **83**:1045-1050.
- Robardet, E., P. Giraudoux, C. Caillot, F. Boué, F. Cliquet, D. Augot, and J. Barrat. 2008. Infection of foxes by *Echinococcus multilocularis* in urban and suburban areas of Nancy, France: influence of feeding habits and environment. *Parasite* **15**:77-85.
- Rogers, A. R., and L. B. Jorde. 1995. Genetic evidence on modern human origins. *Hum Biol* **67**:1-36.
- Romig, T., B. Bilger, A. Dinkel, M. Merli, and U. Mackenstedt. 1999. *Echinococcus multilocularis* in animal hosts: new data from western Europe. *Helminthologia* **36**:185-191.

- Romig, T., A. Dinkel, and U. Mackenstedt. 2006. The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol Int* **55 Suppl**:S187-191.
- Ronaghi, M., S. Karamohamed, B. Pettersson, M. Uhlen, and P. Nyren. 1996. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem* **242**:84-89.
- Rowlingson, R., and P. Diggle. 2007. *splanx: Spatial and Space-Time Point Pattern Analysis*. Version 2.01-23.
- Rozen, S., and H. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* **132**:365-386.
- Saeed, I., C. Maddox-Hyttel, J. Monrad, and C. M. Kapel. 2006. Helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Denmark. *Veterinary Parasitology* **352**:1.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463-5467.
- Schantz, P. M., J. Chai, P. Craig, J. Eckert, D. J. Jenkins, C. N. Macpherson, and A. Thakur. 1995. Epidemiology and control of hydatid disease. *Echinococcus and Hydatid Disease* (ed. Thompson, R.C.A. & Lymbery, A.J.):233-332.
- Schinde, D., Y. Lai, F. Sun, and N. Arnheim. 2003. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. *Nucleic Acids Res* **31**:974-980.
- Schneider, R., B. Gollackner, B. Edel, K. Schmid, F. Wrba, G. Tucek, J. Walochnik, and H. Auer. 2007. Development of a new PCR protocol for the detection of species and genotypes (strains) of *Echinococcus* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Int J Parasitol*.
- Schweiger, A., R. W. Ammann, D. Candinas, P. A. Clavien, J. Eckert, B. Gottstein, N. Halkic, B. Muellhaupt, B. M. Prinz, J. Reichen, P. E. Tarr, P. R. Torgerson, and P. Deplazes. 2007. Human alveolar echinococcosis after fox population increase, Switzerland. *Emerg Infect Dis* **13**:878-882.
- Schwenkenbecher, J. M., T. Wirth, L. F. Schnur, C. L. Jaffe, H. Schallig, A. Al-Jawabreh, O. Hamarsheh, K. Azmi, F. Pratlong, and G. Schonian. 2006. Microsatellite analysis reveals genetic structure of *Leishmania tropica*. *Int J Parasitol* **36**:237-246.
- Shaikenov, B. S. 2006. Distribution and ecology of *Echinococcus multilocularis* in Central Asia. *Parasitol Int* **55S**:S213-S219.
- Sheffield, V. C., J. S. Beck, A. E. Kwitek, D. W. Sandstrom, and E. M. Stone. 1993. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* **16**:325-332.
- Shimodaira, H. 2002. An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. *Syst. Biol.* **51**:492-508.
- Shimodaira, H. 2004. An approximately unbiased test of regions using multistep-multiscale bootstrap resampling. *Ann. Stat.* **32**:2616-2641.
- Simpson, E. H. 1949. Measurement of diversity. *Nature (London)* **163**:688.
- Slais, J., A. Madle, K. Vanka, F. Jelinek, V. Cernik, M. Pruchova, and J. Jindra. 1979. [Alveolar hydatidosis (echinococcosis) diagnosed by liver puncture biopsy]. *Cas Lek Cesk* **118**:472-475.
- Smyth, J. D., and M. M. Smyth. 1964. Natural and Experimental Hosts of *Echinococcus Granulosus* and *E. Multilocularis*, with Comments on the Genetics of Speciation in the Genus *Echinococcus*. *Parasitology* **54**:493-514.

- Snabel, V., M. Miterpakova, S. D'Amelio, M. Busi, D. Bartkova, L. Turcekova, C. Maddox-Hyttel, P. Skuce, and P. Dubinsky. 2006. Genetic structuring and differentiation of *Echinococcus multilocularis* in Slovakia assessed by sequencing and isoenzyme studies. *Helminthologia* **43**:196-202.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503.
- Sreter, T., Z. Szell, Z. Egyed, and I. Varga. 2003. *Echinococcus multilocularis*: an emerging pathogen in Hungary and Central Eastern Europe? *Emerg Infect Dis* **9**:384-386.
- Suzuki, R., and H. Shimodaira. 2005. pvclust: hierarchical clustering with *p*-values. R package version 1.0-3 <http://www.is.titech.ac.jp/~shimo/prog/pvclust/>.
- Takumi, K., A. de Vries, M. L. Chu, J. Mulder, P. Teunis, and J. van der Giessen. 2008. Evidence for an increasing presence of *Echinococcus multilocularis* in foxes in The Netherlands. *Int J Parasitol* **38**:571-578.
- Tanner, F., D. Hegglin, R. Thoma, G. Brosi, and P. Deplazes. 2006. [*Echinococcus multilocularis* in Grisons: distribution in foxes and presence of potential intermediate hosts]. *Schweiz Arch Tierheilkd* **148**:501-510.
- Templeton, A. R. 2008. The reality and importance of founder speciation in evolution. *Bioessays* **30**:470-479.
- Thompson, R. C., and D. P. McManus. 2001. Aetiology: parasites and life-cycles. WHO/OIE Manuel on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern ed. Eckert, J., Gemmell, M.A., Meslin, F.X. and Pawlowski, Z.S.:1-9.
- Tibayrenc, M. 1998. Intergated genetic epidemiology of infectious disease: the Chagas model. *I. Oswaldo Cruz* **93**:577-580.
- Trachsel, D., P. Deplazes, and A. Mathis. 2007. Identification of taeniid eggs in the faeces from carnivores based on multiplex PCR using targets in mitochondrial DNA. *Parasitology*:1-10.
- van der Giessen, J. W., Y. Rombout, and P. Teunis. 2004. Base line prevalence and spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* in a newly recognized endemic area in the Netherlands. *Vet Parasitol* **119**:27-35.
- van der Giessen, J. W., Y. B. Rombout, J. H. Franchimont, L. P. Limper, and W. L. Homan. 1999. Detection of *Echinococcus multilocularis* in foxes in The Netherlands. *Vet Parasitol* **82**:49-57.
- van Herwerden, L., R. B. Gasser, and D. Blair. 2000. ITS-1 ribosomal DNA sequence variants are maintained in different species and strains of *Echinococcus*. *Int J Parasitol* **30**:157-169.
- Veit, P., B. Bilger, V. Schad, J. Schafer, W. Frank, and R. Lucius. 1995. Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasitology* **110** (Pt 1):79-86.
- Vervaeke, M., P. Dorny, F. Vercammen, S. Geerts, J. Brandt, K. Van Den Berge, and R. Verhagen. 2003. *Echinococcus multilocularis* (Cestoda, Taeniidae) in Red foxes (*Vulpes vulpes*) in northern Belgium. *Vet Parasitol* **115**:257-263.
- Vervaeke, M., J. van der Giessen, B. Brochier, B. Losson, K. Jordaens, R. Verhagen, L. Coulander Cde, and P. Teunis. 2006. Spatial spreading of *Echinococcus multilocularis* in Red foxes (*Vulpes vulpes*) across nation borders in Western Europe. *Prev Vet Med* **76**:137-150.

- Viel, J. F., P. Giraudoux, V. Abrial, and S. Bresson-Hadni. 1999. Water vole (*Arvicola terrestris scherman*) density as risk factor for human alveolar echinococcosis. *Am J Trop Med Hyg* **61**:559-565.
- Vispo, M., and R. Ehrlich. 1994. Estudio de la expression del gen con homeobox EgHbx2 del parasito *Echinococcus granulosus*. H Jornadas de Investigacion del Grupo Montevideo:121.
- Vogel, M., N. Muller, B. Gottstein, K. Flury, J. Eckert, and T. Seebeck. 1990. *Echinococcus multilocularis*: characterization of a DNA probe. *Acta Trop* **48**:109-116.
- Vuitton, D. A., S. L. Zhang, Y. Yang, V. Godot, I. Beurton, G. Mantion, and S. Bresson-Hadni. 2006. Survival strategy of *Echinococcus multilocularis* in the human host. *Parasitol Int* **55 Suppl**:S51-55.
- Vuitton, D. A., H. Zhou, S. Bresson-Hadni, Q. Wang, M. Piarroux, F. Raoul, and P. Giraudoux. 2003. Epidemiology of alveolar echinococcosis with particular reference to China and Europe. *Parasitology* **127 Suppl**:S87-107.
- Wandeler, P., S. M. Funk, C. R. Largiader, S. Gloor, and U. Breitenmoser. 2003. The city-fox phenomenon: genetic consequences of a recent colonization of urban habitat. *Mol Ecol* **12**:647-656.
- Whelan, J. A., N. B. Russell, and M. A. Whelan. 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J. Immunol. Methods* **278**:261-269.
- WHO/OIE. 2001. Manuel on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern. Edited by J. Eckert, M.A. Gemmell, F.X. Meslin and Z.S. Pawlowski.
- Wilder, J., and H. Hollocher. 2001. Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. *Mol Biol Evol* **18**:384-392.
- Worbes, H. 1992. [The occurrence of *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis* in Thuringia]. *Angew Parasitol* **33**:193-204.
- Xiao, N., J. Qiu, M. Nakao, T. Li, W. Yang, X. Chen, P. M. Schantz, P. S. Craig, and A. Ito. 2005. *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *Int J Parasitol* **35**:693-701.
- Xiao, N., J. Qiu, M. Nakao, T. Li, W. Yang, X. Chen, P. M. Schantz, P. S. Craig, and A. Ito. 2006. *Echinococcus shiquicus*, a new species from the Qinghai-Tibet plateau region of China: Discovery and epidemiological implications. *Parasitol Int* **55 Suppl**:S233-236.
- Yang, Y. R., M. C. Rosenzvit, L. H. Zhang, J. Z. Zhang, and D. P. McManus. 2005. Molecular study of *Echinococcus* in west-central China. *Parasitology* **131**:547-555.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.

GLOSSAIRE

GLOSSAIRE

ADN (Acide désoxyribonucléique) : une hélice en double brin constituée de nucléotides (base azotée, sucre = désoxyribose et phosphate) liés les uns aux autres par des liaisons phosphodiester. Les deux chaînes nucléotidiques sont maintenues ensemble par des liaisons faibles entre les bases, appelées liaisons hydrogènes. C'est la substance fondamentale dont sont composés les gènes.

ADNmt : ADN mitochondrial, circulaire et haploïde, qui se réplique et se transcrit de manière autonome au sein de l'organite mitochondrie.

Allèle : l'une des différentes formes d'un gène qui peuvent exister au niveau d'un même locus entre les chromosomes homologues.

Autogamie : croisement entre deux gamètes issus du même individu.

Cytométrie de flux (FACS : *Fluorescence Activated Cell Sorter*) : technique de détection des signaux spécifiques de fluorescence, émis par des chromosomes marqués contenus dans des gouttelettes, qui sont activées par des déflecteurs qui répartissent les différents types de chromosomes entre des tubes distincts.

Délétion : retrait d'un fragment chromosomique dans une séquence nucléotidique.

Diploïde : un organisme possédant deux jeux de chromosomes dans chacune de ses cellules.

Dixène : organisme nécessitant deux hôtes successifs pour se perpétuer.

Effet fondateur : fluctuation importante des fréquences alléliques dans une nouvelle population créée par la migration d'un petit nombre d'individus à partir d'une population mère. Le plus souvent il y a réduction de la diversité génétique dans la population fille par rapport à la population mère. La modification de fréquence est due au tirage aléatoire des migrants (et donc de leur allèle) dans la population mère.

Effort d'échantillonnage standard : exercer la même pression d'échantillonnage dans les communautés étudiées.

Electrophorèse : une technique permettant de séparer les composants d'un mélange de molécules (protéine, ADN ou ARN) dans un champ électrique qui passe au travers d'un gel.

Epissage : l'excision des introns et le raboutage des exons à partir du pré-ARN pour donner au final l'ARN mature.

Evolution concertée : phénomène observé dans l'évolution des familles multigéniques. A l'intérieur d'une même espèce les membres d'une famille multigénique tendent parfois à être très similaires les uns par rapport aux autres, alors que ces gènes diffèrent fortement lorsqu'on les compare à ceux d'autres espèces.

Flux génique : mouvement des allèles entre des sujets interféconds appartenant à différentes populations par la migration des individus.

Géitonogamie : fécondation entre deux gamètes issus d'individus distincts mais appartenant à une population clonale.

Gène : c'est l'unité fonctionnelle et physique élémentaire de l'hérédité qui transmet l'information d'une génération à la suivante. Chaque gène occupe sur un chromosome donné un emplacement défini appelé locus dont les variations sont appelées allèles. C'est un fragment d'ADN constitué d'une région transcrite et d'une séquence régulatrice qui permet la transcription.

Génotypage : discipline qui vise à déterminer l'origine d'une variation génétique, à une position spécifique sur le génome pour un individu ou un groupe d'individus donnés.

Géodésique (système) : système de référence permettant d'exprimer les positions au voisinage de la Terre. Repère tridimensionnel défini par son centre O (défini à proximité du centre de gravité de la Terre) et trois axes orthonormés (Ox, Oy, dans le plan équatorial de la Terre et Oz, dans l'axe de rotation de la Terre).

Haploïde : une cellule possédant un jeu de chromosomes ou un organisme constitué de ce type de cellules.

Haplotype : allèle localisé à un locus d'ADN haploïde comme l'ADN mitochondrial.

Hétérozygote : individu diploïde qui possède deux versions ou allèles différents pour le même gène.

Hétérogamie : croisement entre deux gamètes issus d'individus de populations distinctes.

Homoplasie : se dit de sites présentant des états moléculaires identiques mais ayant subi différentes étapes évolutives, différents types de mutations. La présence d'homoplasie conduit à sous-estimer le nombre total de mutations s'étant produites au cours du temps.

Homozygote : individu diploïde qui possède deux copies identiques du même gène.

Horloge moléculaire : hypothèse selon laquelle les molécules d'une même classe fonctionnelle (ADN, protéines, etc.) évoluent régulièrement dans le temps et à un rythme égal dans différentes lignées. Pour l'ADN ce phénomène est dû aux mutations aléatoires et à la dérive génétique de variants moléculaires non sélectionnés.

ITS (*Internal Transcribed Spacer*) : se réfère à une partie de l'ARN non fonctionnel situé entre les parties codant l'ARN ribosomal. Deux séquences ITS sont comprises dans un transcrite précurseur polycistronique (codant plusieurs chaînes polypeptidiques distinctes) contenant en 5' et 3' des séquences transcrites externes (ou ETS pour *External Transcribed Sequence*) puis les gènes codants pour les sous-unités ribosomales (5'ETS, ARNr 18S, ITS1, ARNr 5,8S, ITS2, ARNr 28S, 3'ETS).

Locus d'un gène : endroit spécifique d'un chromosome au niveau duquel est situé un gène.

Microsatellite (ADN) : séquence d'ADN répétée en tandem dont l'unité de répétition est comprise entre 1 à 6 pb.

Minisatellite (ADN) : séquence d'ADN de 1 à 5 kb contenant un nombre variable de répétitions de 15 à 100 nucléotides. Encore appelé VNTR. Séquences étudiées par la technique d'empreinte d'ADN.

PCR pour *Polymerase Chain Reaction* ou **réaction de polymérisation en chaîne** : technique permettant d'amplifier des fragments spécifiques d'ADN, qui exploitent certaines caractéristiques de la réplication de l'ADN.

PCR-nichéé (*nested PCR*) : variant de la méthode de PCR pour laquelle deux couples d'amorces sont utilisées pour amplifier un fragment, par deux réactions successives. La première PCR produit des fragments comme en PCR classique et la seconde utilise ces produits comme matrice et des amorces « nichées », pour produire des fragments de plus petite taille, centrés sur le fragment d'intérêt. L'avantage de la PCR nichée est une augmentation de la spécificité.

Polyembryonie : production de deux ou de plusieurs individus à partir d'un seul oeuf, dont les cellules, au cours du développement se séparent pour former des embryons distincts qui deviendront des jumeaux monozygotes (individu provenant de la division d'un oeuf unique).

Southern blot : technique de buvardage de Southern, réalisée sur un produit de digestion d'ADN fixé à une membrane et permettant de repérer des fragments nucléotidiques par hybridation d'une sonde spécifique marquée.

Simpson (indice de diversité de) : cet indice mesure la probabilité que deux individus sélectionnés au hasard appartiennent à la même espèce.

$$D = \frac{\sum N_i(N_i - 1)}{N(N - 1)}$$

N_i correspond au nombre d'individus de l'espèce donnée et N au nombre total d'individus

Sympatrie : caractérise la présence ou la formation d'espèces différentes dans des aires géographiques chevauchantes.

Télomère : extrémité d'un chromosome.

Test de Mantel : ce test est utilisé pour calculer la corrélation linéaire entre deux matrices de proximité (dissimilarité ou similarité). Il est souvent utilisé en écologie pour tester si les différences génétiques observées sur un échantillon d'individus peuvent être corrélées à un isolement par la distance géographique.

Transposon : fragment mobile d'ADN encadré par des séquences répétitives terminales, qui porte généralement des gènes codant des fonctions de la transposition.

Transversion : substitution d'une paire de nucléotides impliquant le remplacement d'une pyrimidine par une purine ou inversement.

U1 snARN : gène impliqué dans l'épissage de l'ARN, présent de manière répétée dans l'ADN des eucaryotes (gène multilocus) et espacé par des séquences microsatellites de motifs pentamériques (GCGAG) appelées espaceurs, répétées en tandem une cinquantaine de fois dans le génome.

UPGMA (pour *Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average*) : méthode qui prend en compte la distance moyenne donnée par la matrice de distance pour élaborer une paire de branches (cluster). Cette méthode impose une horloge moléculaire uniforme parmi les marqueurs d'ADN employés.

VNTR (répétition en tandem en nombre variable) : un locus chromosomique au niveau duquel une séquence répétitive particulière est présente en nombres différents chez des individus distincts ou sur les deux chromosomes homologues d'un organisme diploïde.

ANNEXES

EmsB, a tandem repeated multi-loci microsatellite, new tool to investigate the genetic diversity of *Echinococcus multilocularis*

J.M. Bart^{a,*}, J. Knapp^a, B. Gottstein^b, F. El-Garch^c, P. Giraudoux^d,
M.L. Glowatzki^e, H. Berthoud^f, S. Maillard^a, R. Piarroux^a

^a Parasitology Department, SERF Team (Equipe Santé Environnement Rural Franche-Comté),
Faculty of Medicine, University of Franche-Comté, France

^b Institute of Parasitology, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Bern, Switzerland

^c PERAI Team, Faculty of Medicine of Besançon, University of Franche-Comté, France

^d Laboratoire de Biologie Environnementale usc INRA, University of Franche-Comté, France

^e Department of Clinical Research, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Bern, Switzerland

^f Department of Microbiology, Swiss Dairy Research Institute, Liebefeld, Bern, Switzerland

Received 22 December 2004; received in revised form 12 January 2006; accepted 19 January 2006

Available online 28 February 2006

Abstract

In order to explore the genetic diversity within *Echinococcus multilocularis* (*E. multilocularis*), the cestode responsible for the alveolar echinococcosis (AE) in humans, a microsatellite, composed of (CA) and (GA) repeats and designated EmsB, was isolated and characterized in view of its nature and potential field application. PCR-amplification with specific primers exhibited a high degree of size polymorphism between *E. multilocularis* and *Echinococcus granulosus* sheep (G1) and camel (G6) strains. Fluorescent-PCR was subsequently performed on a panel of *E. multilocularis* isolates to assess intra-species polymorphism level. EmsB provided a multi-peak profile, characterized by tandemly repeated microsatellite sequences in the *E. multilocularis* genome. This “repetition of repeats” feature provided to EmsB a high discriminatory power in that eight clusters, supported by bootstrap *p*-values larger than 95%, could be defined among the tested *E. multilocularis* samples. We were able to differentiate not only the Alaskan from the European samples, but also to detect different European isolate clusters. In total, 25 genotypes were defined within 37 *E. multilocularis* samples. Despite its complexity, this tandem repeated multi-loci microsatellite possesses the three important features for a molecular marker, i.e. sensitivity, repetitiveness and discriminatory power. It will permit assessing the genetic polymorphism of *E. multilocularis* and to investigate its spatial distribution in detail.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *E. multilocularis*; Tandem repeated multi-loci microsatellite; Genetic polymorphism; Molecular ecology

1. Introduction

Echinococcus multilocularis is the causative agent of alveolar echinococcosis (AE), a mostly lethal infectious disease in humans if remaining untreated. This parasite is geographically widespread in the northern hemisphere, including Central Europe, the whole North Asian continent and North America (mainly including Canada, Alaska and a

few US states) (Vuitton et al., 2003). Regional endemic areas may include peculiarities in relation to e.g. human behaviour, host immune response, host species variety, predator-prey relationship or landscape characteristics (Eckert and Deplazes, 2004). Such parameters may significantly influence prevalence in the hosts (humans, rodents and carnivores). The epidemiological heterogeneity contrasts with the genetic homogeneity of the parasite described to date (Haag et al., 1997). So far, molecular studies have exhibited very little genetic variation within *E. multilocularis* (Bowles et al., 1995; Gasser and Chilton, 1995; Okamoto et al., 1995; Bretagne et al., 1996; Haag et al., 1997; Rinder et al., 1997; Gasser et al., 1998; von Nickisch-Roseneck et al., 1999; van Herwerden et al.,

* Corresponding author at: Parasitology Department, SERF team, Faculty of Medicine, University of Franche-Comté, 19 rue Ambroise Paré, 25000 Besançon, France. Tel.: +33 3 63 08 22 36; fax: +33 3 63 08 22 32.

E-mail address: jmbart2000@yahoo.fr (J.M. Bart).

2000; McManus, 2006). Irrespective of the methods used (PCR-RFLP, fingerprinting or sequencing), the molecular markers (coding mitochondrial or nuclear genes, ITS or any other non-coding sequence) lacked of discriminatory power.

The precise molecular tracking of *E. multilocularis*-based upon geographically or biologically relevant markers would be helpful to support the risk management of AE. In order to increase the level of resolution or sensitivity of the molecular methods, another class of DNA markers should be explored. In this regard, DNA microsatellites, small tandemly repeated sequences (1–6 bp) widely dispersed in eukaryotic genomes, could prove to be suitable for our purposes. Their high level of polymorphism is due to the variability in the number of tandem repeats caused by slippage of DNA strands during the cellular replication process (Schlotterer, 2000). To date, microsatellite analysis seems to be a suitable approach for detecting genetic diversity in parasites (Tibayrenc, 1998; De Luca et al., 2002; Monis et al., 2002). Nevertheless, only two studies have explored the genome of *E. multilocularis* using this approach. Employing a microsatellite upstream from the coding region of the U1 snRNA gene, isolates from Europe, Japan and North America could be discriminated, but no variation was found within each of these geographic foci (Bretagne et al., 1996). More recently, two microsatellite sequences allowed to detect genetic variation among different isolates of *E. multilocularis* adults, collected on Hokkaido Island, Japan (Nakao et al., 2003). Additional polymorphic markers that could be used for assessing the detailed genetic structure of the parasite populations in relation to molecular epidemiological analyses may be helpful. The aims of the present study were (i) to characterize microsatellite sequences which are able to detect genetic variation within the genome of *E. multilocularis*, (ii) to test the reliability of the microsatellite(s) found, and (iii) to assess the relevance of the microsatellite variations in view of geno-tracking *E. multilocularis* isolates upon geographical and/or biological clustering. For this purpose, an original panel of parasites collected mainly from intermediate hosts from Switzerland, controlled by various isolates from other geographical areas, was used.

2. Materials and methods

2.1. *Echinococcus* isolates

The following isolates of *Echinococcus* spp. were used in this study: first, microsatellite sequences were isolated from protoscolex-DNA of G1-strain *Echinococcus granulosus* (collected from Algerian sheep). Secondly, to select the most polymorphic microsatellite sequences, a first assessment of the respective inter-specific variation was performed by using two isolates of *E. granulosus* (G1 and G6 genotypes) and one of *E. multilocularis* (Switzerland). Finally, to investigate the intra-specific variation, a total of 35 *E. multilocularis* isolates were analyzed, 27 from Europe (mainly from Switzerland), seven from Alaska, and one from Canada. All the *E. multilocularis* isolates, collected from naturally infected rodents or humans, had been subsequently maintained in laboratory rodents by

serial passages every 4–6 months. To test the stability of the microsatellite in relation to the asexual metacestode multiplication, two isolates (resulting from experimental infection from two parasited French foxes), that had been continuously maintained in vivo for 1 and 7 years, respectively, by serial passage in mice every 4 months, were investigated at different sampling times. The characteristics of the *Echinococcus* isolates are summarized in Table 1.

2.2. Microsatellite isolation

2.2.1. DNA extraction

Genomic DNA was extracted from protoscolexes of *E. granulosus* (Sheep G1-strain) to avoid host DNA contamination. The High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), based on Proteinase K digestion, was used.

2.2.2. Library construction

Approximately 1 µg of genomic DNA was digested completely with *Sau3A* (Roche). The DNA fragments were ligated into the pUC18 vector (Yanisch-Perron et al., 1985) that had been digested with *BamHI* (Roche) and dephosphorylated with alkaline phosphatase (Roche). The recombinant plasmid was inserted into *Escherichia coli* DH5α competent cells by heat shock. Transformed cells were plated on Mueller–Hinton plates containing 100 µg/ml ampicillin, 40 µg/ml X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-B-D-galactopyranoside) and 0.2 µl/ml IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside).

2.2.3. Library screening and sequencing

Colony lifts with nylon membranes, hybridization at 45 °C in DIG Easy Hyb solution, and detection with anti-DIG antibody and colorimetric reagents NBT/BCIP were performed according to manufactures protocols (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The probe was an equal mixture of digoxigenin-labelled oligonucleotides [(TC)₁₀, (TG)₁₀, (CAC)₅CA, CT(CCT)₅, CT(ATCT)₆ and (TGTA)₆TG], prepared using the DIG Oligonucleotide Tailing Kit (Roche).

2.2.4. Positive clones sequencing

Positive colonies were selected from plates and resuspended in 1 ml of distilled water. Five microlitres of this solution were used for the PCR mix containing 15 pmol of each Universal primers (M13/pUC 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' and M13/pUC reverse 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), 2.5 µl of 10X Buffer, 20 µmol of dNTP and 0.5 U of Taq polymerase in a final volume of 25 µl. PCR was performed using one step at 94 °C for 5 min, then 30 cycles with three steps at 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 1 min and a final elongation (72 °C for 5 min). PCR products were subsequently purified and automatically sequenced by using the CEQ DTCS Quick Start Master Kit (Beckman Coulter, CA, USA). For sequenced clones exhibiting more than five repeats, primers were designed from appropriate regions flanking the microsatellites, using the Primer3 software (Rozen and Skaletsky, 2000).

Table 1
Main characteristics of the parasite isolates studied

Code number	Parasite species	Parasite stage	Geographical origin	Host origin	Collection date
1	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	St. Lawrence Island	<i>Microtus oeconomus</i>	1996
2	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	St. Lawrence Island	<i>Microtus oeconomus</i>	1996
3	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	St. Lawrence Island	<i>Microtus oeconomus</i>	1996
4	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	St. Lawrence Island	<i>Microtus oeconomus</i>	1996
5	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	St. Lawrence Island	<i>Microtus oeconomus</i>	1996
6	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	St. Lawrence Island	<i>Microtus oeconomus</i>	1996
7	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	St. Lawrence Island	<i>Microtus oeconomus</i>	1996
CND	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Canada	Human	1996
14	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Freiburg (Sz)	<i>Arvicola terrestris</i>	1995
15	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Freiburg (Sz)	<i>Arvicola terrestris</i>	1995
16	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Freiburg (Sz)	<i>Arvicola terrestris</i>	1995
17	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Freiburg (Sz)	<i>Arvicola terrestris</i>	1995
18	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Freiburg (Sz)	<i>Arvicola terrestris</i>	1995
19	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Freiburg (Sz)	<i>Arvicola terrestris</i>	1995
20	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Freiburg (Sz)	<i>Arvicola terrestris</i>	1995
21	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Freiburg (Sz)	<i>Arvicola terrestris</i>	1995
22	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Freiburg (Sz)	<i>Arvicola terrestris</i>	1995
23	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Freiburg (Sz)	<i>Arvicola terrestris</i>	1995
24	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Freiburg (Sz)	<i>Arvicola terrestris</i>	1995
36	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Switzerland	Human	
37	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Switzerland	Human	
39	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Switzerland	Human	
40	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Switzerland	Human	
41	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Switzerland	Human	
44	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Switzerland	Human	
CHI	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Switzerland	Human	
45	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Lausanne (Sz)	Ouistiti (Callitrichidés)	2003
29	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Basel (Sz)	Cercopitheque	1997
31	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Basel (Sz)	Cercopitheque	2003
34	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Zurich (Sz)	Cercopitheque	1991
42	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Zurich (Sz)	Cercopitheque	1989
43	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	Zurich (Sz)	Cercopitheque	1990
500 ^a	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	France	Fox	1991
501 ^a	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	France	Fox	1991
502 ^a	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	France	Fox	1992
504 ^a	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	France	Fox	1997
505 ^a	<i>E. multilocularis</i>	Metacestode	France	Fox	2004
12	<i>E. multilocularis</i>	Adult	Switzerland	Fox	2001
609	<i>E. multilocularis</i>	Adult	Czech Republic	Fox	2001
220	<i>E. multilocularis</i>	Adult	Austria	Fox	2001
539 ^b	<i>E. granulosus</i>	Metacestode	Algeria	Sheep	2003
116 ^c	<i>E. granulosus</i>	Metacestode	Mauritania	Camel	1998

^a Isolates subcultivated in mice.

^b Isolate genetically identified G1 (GenBank accession no. AF408686).

^c Isolate genetically identified G6 (GenBank accession no. AF384099).

2.3. Microsatellite amplification

2.3.1. PCR

Each primer set was initially tested for amplification by PCR in the following 25 µl reaction mixture: 2.5 µl PCR Buffer 10X (SigmaTM, St. Louis, MO, USA), 20 µmol dNTP (dNTPset, MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), 40 pmol of each primer (Invitrogen Life TechnologiesTM, Paisley, Scotland) and 0.5 U Taq polymerase (REDTaq-polymeraseTM, Sigma) and 50 ng of genomic DNA. The annealing temperature of primers was optimized using a Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) from 50 to 60 °C, with the same steps described in Section 2.2.4. The presence of PCR products was demonstrated in a 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

2.3.2. Fluorescent-PCR

The forward primer was subsequently 5'-(dyeD3)-fluorescent-labelled (Prologo, USA). PCR amplification was performed in a 10 µl-reaction mixture including 1.5 µl PCR 10X Buffer (SigmaTM, St. Louis, MO, USA), 20 µmol dNTP (dNTPset, MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), 0.5 pmol of labelled primer (EmsB A 5'-GTGTGGATGAGTGTGCCATC-3'), 1 pmol of unlabelled primer (EmsB C 5'-CCACCTTCCCTACTGCAATC-3'), 0.25 U Taq polymerase (REDTaq-polymeraseTM, Sigma) and 10 ng of genomic DNA. The amplification was carried out using the following cycling conditions: 94 °C for 2 min, 30 cycles of 94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s and a final extension step of 72 °C for 5 min. Half a microlitre of the PCR product was mixed with 40 µl of formamide and 0.4 µl of

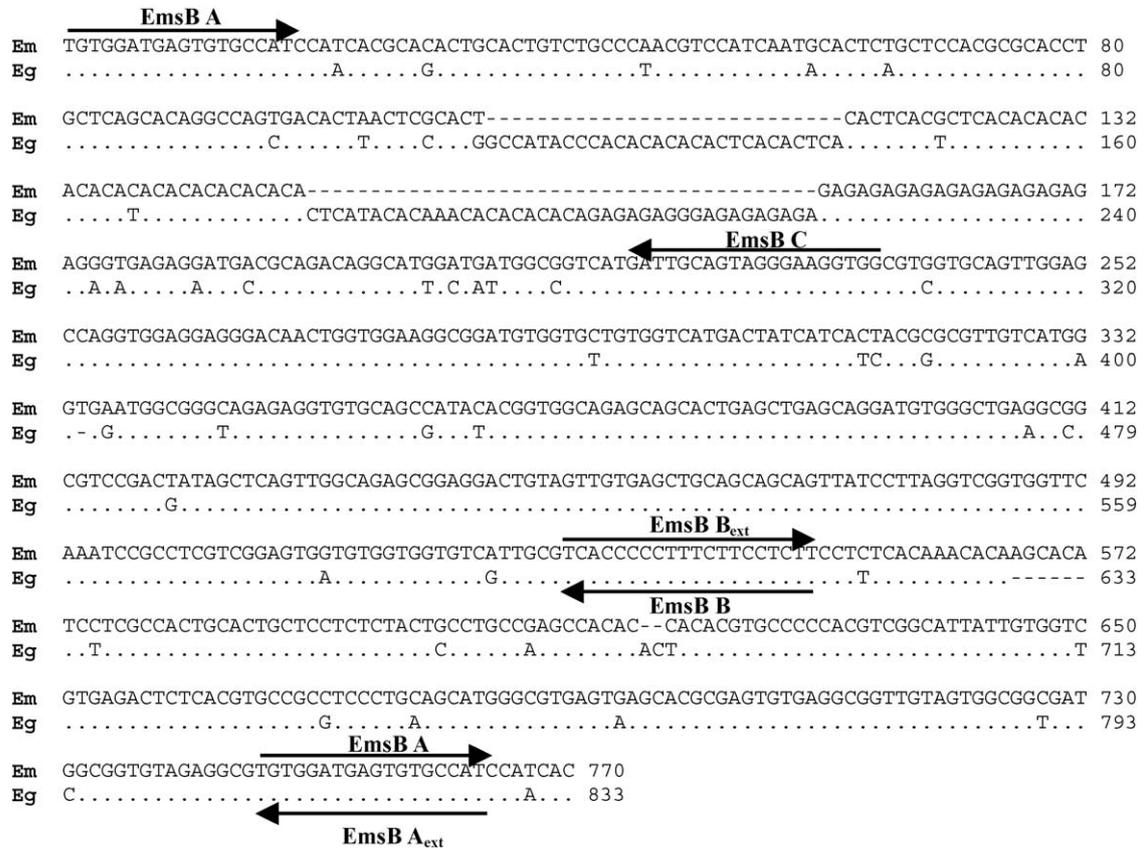


Fig. 1. Nucleotides composition of the EmsB microsatellite obtained after cloning of the PCR products. The upper sequence has been obtained for after cloning of the isolate CH1, (*E. multilocularis* from Switzerland). The lower sequence has been obtained for a clone of the isolate 539 (*E. granulosus*, G1 strain). The main differences revealed between these both sequences were the variations in (CA) and (GA) repeats. The total homology percentage is 77%. The nucleotides, indicated by arrows, correspond to the primers sequences used in this study.

labelled molecular weight markers. This mixture was loaded on a CEQ™8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter).

2.4. Dendrogram construction

According to the nature of the EmsB fragment, we established that the height of each peak was the consequence

of the number of repeats of this peak in the genome. Profiles were normalized by dividing each peak height by the maximum height value in the profile. Hierarchical cluster analysis was computed using the Euclidian distance and an average link clustering method. The uncertainty of clusters was calculated by a multiscale bootstrap resampling ($B = 1000$) and given as approximately unbiased p -values according to Shimodaira

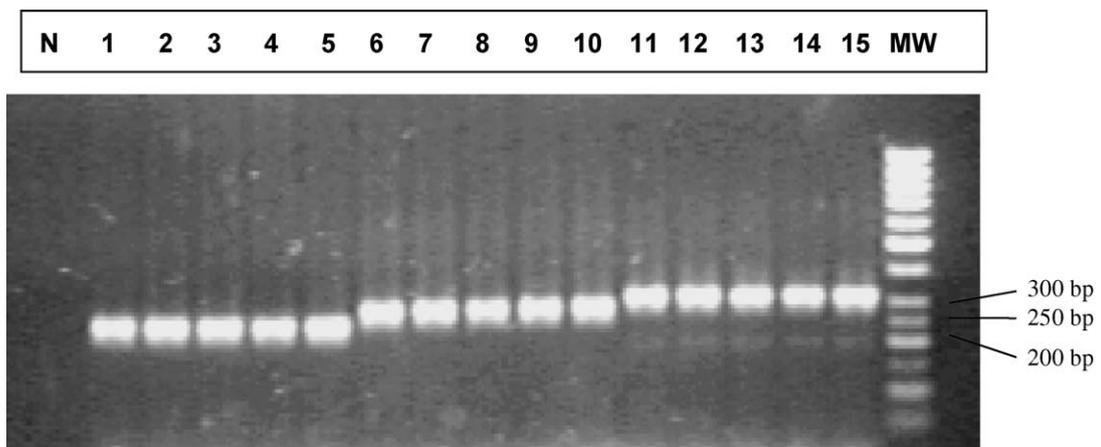


Fig. 2. Inter-specific variation of the EmsB sequence. 1–5: *E. multilocularis*, 6–10: *E. granulosus* G6, 11–15: *E. granulosus* G1. For each isolate, five annealing temperatures were tested (52, 54, 56, 58 and 60 °C). N: negative control; M_w : molecular weight.

(2002, 2004). Computing was done using R (R Development Core Team, 2005) and the package pvclust (Suzuki and Shimodaira, 2005).

2.5. Characterization of the *EmsB* microsatellite

2.5.1. Reproducibility and repeatability

PCR amplifications were processed in duplicate for all the isolates by two independent manipulators, in order to avoid any technical error. For three isolates (500, 502 and 505), PCR conditions were tested by changing the number of cycles (20, 25 and 30) and by using two other Taq polymerases: the Jump Start Taq polymerase (Sigma) and the diamond DNA polymerase (Bioline). Finally, for three samples (12, 220 and 609), PCR process was performed five times. The five profiles obtained for each sample were compared and the standard deviation was calculated.

2.5.2. Stability

The stability of the microsatellite was tested using eggs of two *E. multilocularis* adult worms (both originating from French foxes), which had been used to experimentally infected mice and which had subsequently been maintained in vivo for many years upon intraperitoneal transplantation from mouse to mouse. The first respective isolate had been cultivated for 1 year successively in three mouse passages, including sample no 500 (time point 0), 501 (time point 3 months) and 502 (12 months). The second isolate had been maintained for 7 years in mice, including sample no 504 (time point 0) and 505 (time point 7 years, with 19 passages inbetween).

2.5.3. Specificity

PCR was carried out with genomic control DNAs isolated from different host species (mouse and human). DNA extraction procedure for mouse and human liver tissue was the same as used for the *Echinococcus* samples.

2.5.4. Sensitivity

DNA extraction was performed from one single *E. multilocularis* adult tapeworm with the High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). DNA was eluted in 40 μ l of elution buffer and 2 μ l were used in the PCR at concentration comprised from 1 ng to 1 fg.

2.5.5. Identification of the complex profile

2.5.5.1. PCR product cloning. In order to characterize the fluorescent-PCR complex profiles, the PCR product of a defined *E. multilocularis* human isolate (CH1) was cloned with the TA Cloning Kit (Invitrogen) according to the recommendations of the manufacturer. The clones obtained were resuspended in 1 ml of distilled water and used for the fluorescent-PCR and for subsequent sequencing.

2.5.5.2. Southern blot. Ten micrograms of CH1 total DNA were digested with AluI and PstI. DNA fragments were electrophoresed on a 1% agarose gel and transferred to a

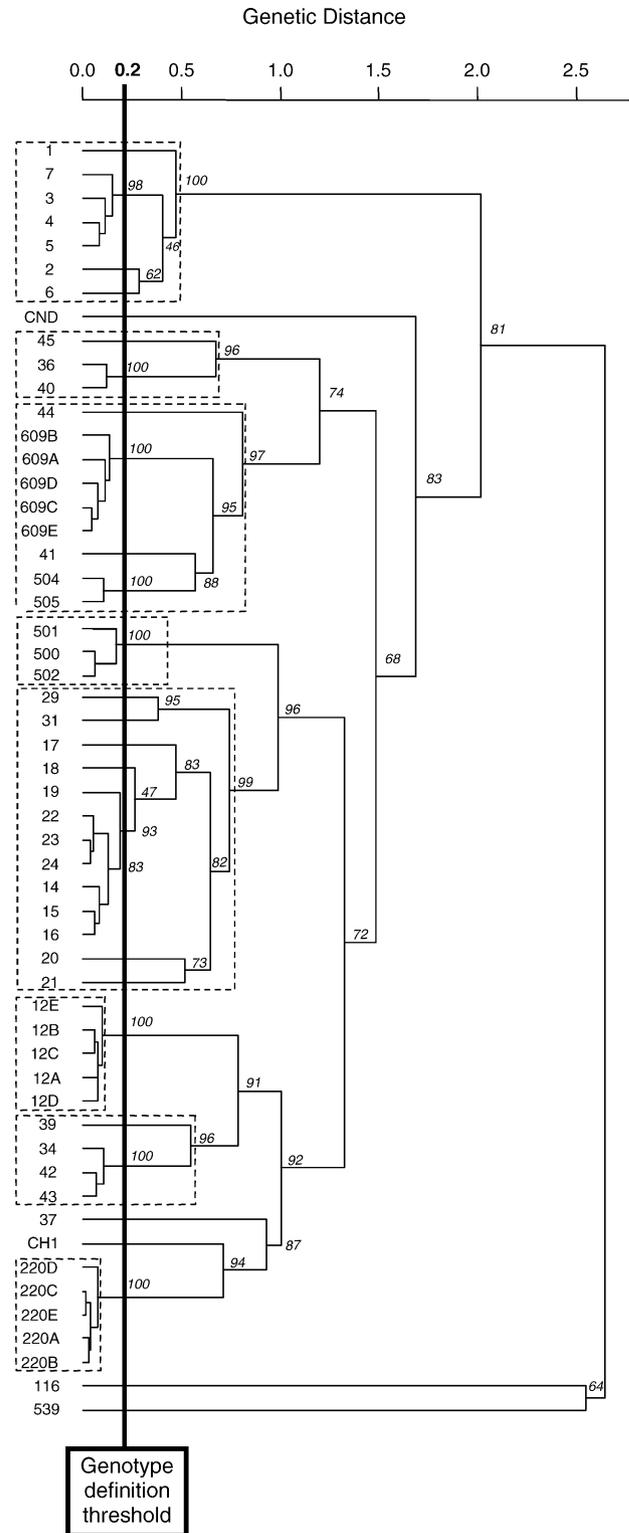


Fig. 3. Dendrogram constructed from the *EmsB* profiles data. Hierarchical cluster analysis was computed using the Euclidian distance and an average link clustering method. The uncertainty of clusters was calculated by a multiscale bootstrap resampling ($B = 1000$) and given as approximately unbiased p -values (numbers on nodes, in percent) according to Shimodaira (2002, 2004). Dotted boxes underline highly robust clusters ($p > 95\%$) on higher nodes. The "Genetic definition threshold", represented by a bold line, allows discriminating 25 genotypes within the *E. multilocularis* panel. Computing was done using R (R Development Core Team, 2005) and the package pvclust (Suzuki and Shimodaira, 2005).

nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences) by the method of Southern (1975). Hybridization was performed with two different probes: EmsB A/C and EmsB G/H (one 110 bp flanking region of the microsatellite). Probes were labelled with digoxigenin-dUTP (PCR DIG Probe Synthesis Kit, Roche[®], Germany). Hybridization, subsequent washings and NBT/BCIP signal detection were done according to the manufacturer's recommendations.

2.5.5.3. Long size PCR. To locate the repetitions of the microsatellite fragment in the *Echinococcus* genome, two sets of complementary primers were designed: EmsB A/B (EmsB A (described above) and EmsB B 5'-AAG AGG AAG AAA GGG GGT GA-3') and their complementary EmsB A_{ext} (5'-GAT GGC ACA CTC ATC CAC AC-3') and EmsB B_{ext} (5'-TCA CCC CCT TTC TTC CTC TT-3'). The tandem repetitive nature of EmsB was thus investigated by performing a PCR in the same conditions as described above (see Section 2.3.2). The elongation time (5 min) was the only modified factor.

2.5.5.4. Estimation EmsB copies number. The number of EmsB copies was assessed by the use of quantitative real-time PCR using the LightCycler[™] system (Roche Diagnostics) with the Fast-Start DNA Master SYBR Green I LightCycler Kit (Roche Diagnostics). PCR amplification efficiencies (*E*) were determined according to the equation: $E = 10^{(-1/\text{slope})}$. The strategy was to compare the number of copies of the EmsB A/C fragment in the parasite genome to a solution containing an EmsB known copies number ligated in a recombinant plasmid (Providenti et al., in press; Gourelain et al., 2003; Whelan et al., 2003). For this purpose, a dilution of plasmid (from 1 copy to 10⁸ copies) was amplified with EmsB A/C primers. By comparison of the crossing point (CP) values, the number of EmsB copies was estimated.

3. Results

3.1. Microsatellite isolation

More than 5000 *E. coli* were transformed and hybridized with the probe mixture. Seventeen positively hybridizing colonies were detected and subsequently sequenced. All containing microsatellite sequences were submitted to GenBank (accession nos. AY680844 to AY680860). Eleven sequences represented tandem repeats of two nucleotides [from (CA)₆ to (CA)₂₀(GA)₂₅] and six trinucleotide repeats [from (TGG)₅ to (TTC)₁₂].

3.2. Amplification of microsatellites by PCR

3.2.1. Assessment of inter-specific polymorphism

After the design of specific primers, PCRs were carried out for each of the 17 microsatellites to test the magnitude of variation among isolates of *E. granulosus* G1, G6 and *E. multilocularis*. Based on agarose gel electrophoretic analyses, the highest difference in fragment size was for the microsatellite designated EmsB (Figs. 1 and 2).

3.2.2. Assessment of EmsB intra-specific polymorphism

For microsatellite EmsB, amplification was effective for all the 37 *E. multilocularis* isolates of the panel. The fluorescent-PCR (EmsB A/C) products represented complex profiles. The profiles possessed from 6 to 15 peaks ranging from 209 to 247 base pairs (bp), each separated by two bases. From the hierarchical clustering, eight clusters, with approximately unbiased *p*-values larger than 95%, were highlighted by dotted rectangles (Fig. 3). Each sample located in these clusters was seen closely related to the samples of the same cluster. The first cluster, shown by the tree, contained all the St. Lawrence island isolates, collected in the same field. All presented a major peak

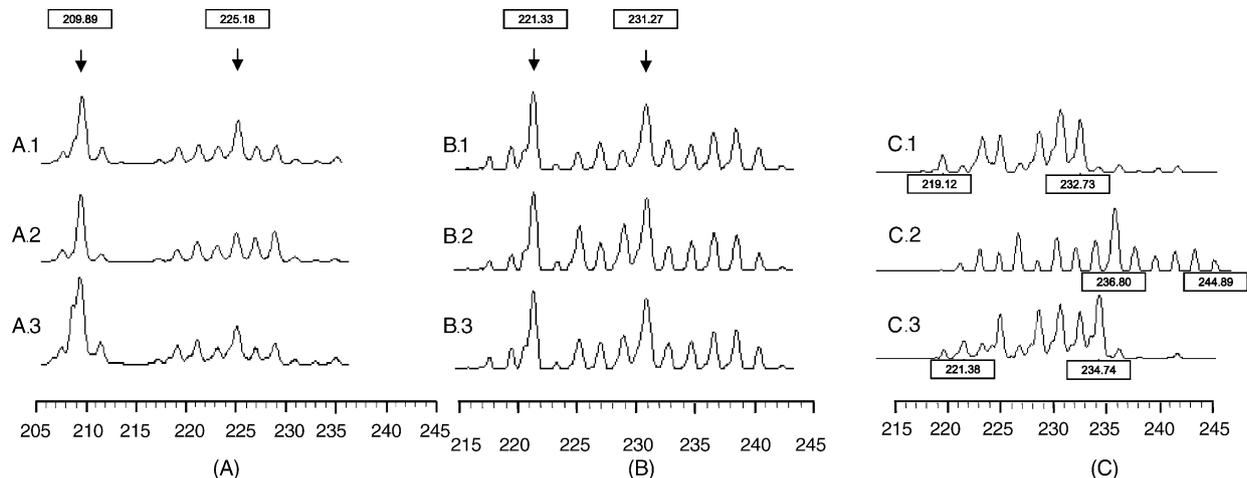


Fig. 4. Example of EmsB fragment analysis profiles. The patterns obtained for *E. multilocularis* from St. Lawrence Island rodents 3, 4 and 5 (respectively, A1, A2, and A3) were strictly similar. They vary from those obtained for the *E. multilocularis* from Freiburg rodents 14, 15 and 16 (respectively, B1, B2 and B3) which are also strictly similar between themselves. The genotypes obtained for samples 36, 41 and 42 (respectively, C1, C2 and C3) exhibited variations not only with A and B but also between themselves. These variations are due to the presence or absence of peaks and to the importance of the peaks, which correspond to the occurrence of a repetition-unit in the genome. The size of peaks is indicated in base pair.

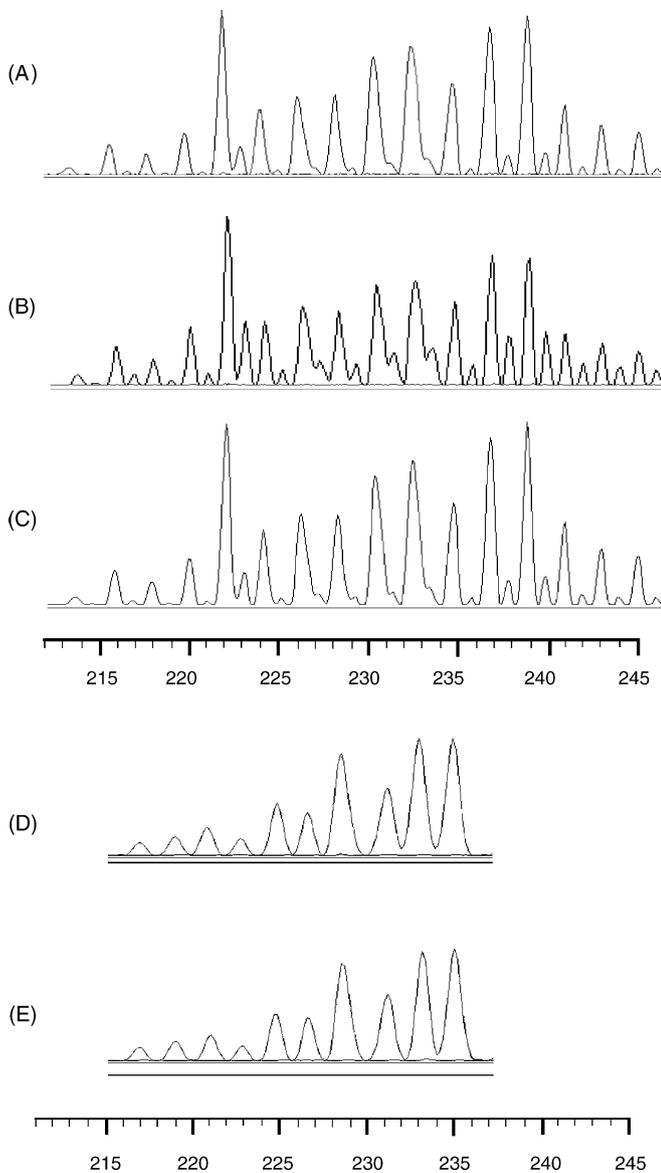


Fig. 5. Microsatellite stability test. For a same isolate, cultivated successively in three mice [(A) March 1991 (500), (B) May 1991 (501) and (C) February 1992 (502)], three DNA extractions then three fluorescent-PCRs have been performed. The three profiles obtained were identical. The same identical patterns are observed for isolates 504 and 505 cultivated in two mice, respectively, in May 1997 (D) and May 2004 (E).

at 209 bp, one peak at 211 bp and six peaks distributed between 219 and 229 bp (Fig. 4(A)). Among the European samples, displaying peaks ranged from 215 to 247 bp, one main type of profile was observed for 11 samples (samples 14–24) collected in Switzerland from *Arvicola terrestris* all caught in the same field within an area of 0.5 km² and within a time period of 1 month (Fig. 4(B)). A similar profile was found for two Swiss monkeys (samples no. 29 and 31) coming from Basel. A third group clustered three simian samples collected in Zurich (samples no. 34, 42 and 43) and one human Swiss lesion (no. 39). The last simian sample (no. 45) was clustered with two Swiss human samples (no. 36 and 40) (Fig. 4(C)). Three clusters were represented by the three samples used to test the

repeatability of the method (see Section 3.3.1). The Canadian sample was located between the St. Lawrence Island cluster and the European samples.

Finally, the *E. granulosus* isolates (no. 539 and 116) were easily identified with 13 peaks ranged from 281 to 301 bp for the G1 sample and 14 peaks ranged from 253 to 273 and from 279 to 283 for the G6 isolate.

3.3. Characterization of the *EmsB* microsatellite

3.3.1. Reproducibility and repeatability

The same results (number, position, height and width of peaks) were repeatedly displayed for a same isolate. Despite the changes in the PCR cycle numbers (20, 25 or 30) and of the source of DNA polymerase, the profiles did not vary. The three samples, which were analyzed five times (no. 12, 220 and 609), presented exactly the same number of peaks, at the same size, after each experiment (10 peaks for sample no. 12, nine for sample no. 220 and six for sample no. 609). Moreover, for each of these samples, the height of each peak presented a very low variability from an experiment to another. Indeed the standard deviation ranged from 1.4 to 5.5% for the peaks of sample no. 12, from 0.4 to 2.6% for those of sample no. 220 and from 2.7 to 6.5% for the peaks of sample no. 609. Consequently, for each of the three samples, global profiles remained extremely stable, with a genetic distance always less than 0.11 between results of the five experiments (see Fig. 3). Referring to the remarkable stability of the profiles, we could fix a “genotype definition threshold” including a rather large margin: two samples were considered to belong to different genotypes when their genetic distance exceeded 0.2 (Fig. 3). Using this threshold and despite the margin we adopted, 25 genotypes could be defined within the 37 *E. multilocularis* samples. In addition, the two main clusters of samples which exhibited an identical profile (with a genetic distance above the threshold) corresponded to isolates collected from a same closed area (a field near Freiburg in Switzerland and a field in St. Lawrence Island, respectively).

3.3.2. Stability

The profiles obtained for the two *E. multilocularis* isolates maintained in mice for 1 year (samples 500–502) and 7 years (samples 504 and 505) also exhibited a very low variability, with an apparent genetic distance inferior than 0.11 (Figs. 3 and 5). Therefore, the profiles were considered as remaining identical despite the long period of the study.

3.3.3. Specificity/sensitivity

Amplification was specific for *E. multilocularis* DNA, since no amplification was produced using rodent and human control DNAs (data not shown). Moreover, the same profile was observed for a PCR performed either with pure *E. multilocularis* DNA or with the same *E. multilocularis* DNA mixed with an equal amount of host DNA (tested for both human and mouse). Consequently, the presence of host DNA during PCR performance did not influence the electrophoretic profile (data not shown).

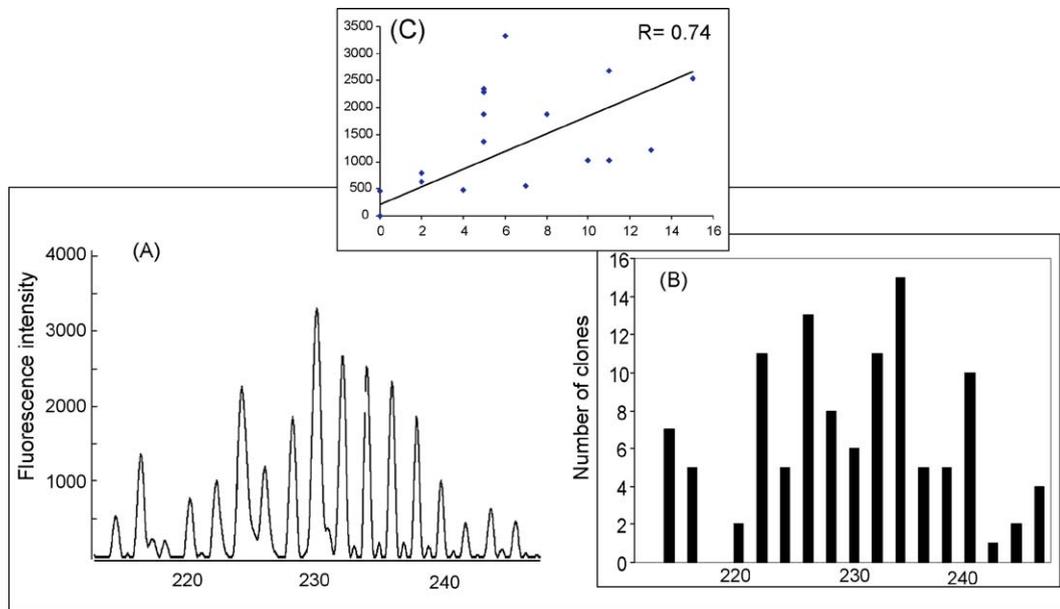


Fig. 6. Relation between (A) the EmsB “complex profile” obtained with the CH1 sample after fluorescent-PCR EmsB A/C and (B) the repartition of the EmsB “simple peaks” PCR obtained after cloning of the EmsB A/C PCR product for the CH1 sample. (C) The *R* coefficient compares the fluorescence intensity data to the repartition of the 110 clones analyzed. The microsatellite composition of each peak is described in Table 2.

PCR performed from pure parasite DNA extracted from a single *E. multilocularis* adult worm allowed the amplification of the EmsB target until 1 fg DNA (data not shown).

3.3.4. Strategy to document the complexity of the profile

The multi-peak profile obtained after fluorescent-PCR raised the question of its structural signification. The cloning of the EmsB A/C PCR product, followed by a fragment analysis, showed the amplification of single peaks. This result indicated the ability of the Taq polymerase to read the microsatellite sequence without generating stutters. Fig. 6 shows graphically the relation between the “complex profile” and the 110 “mono-peak” clones classified according to their size. Sequencing of 16 clones as shown in Fig. 6 – representing

the 16 fragment lengths – thus proved that the differences in the size for each peak corresponded precisely to the variation exhibited in the microsatellite composition (Table 2).

As the profile resulted of the repetition of different microsatellite fragments, we wondered how these fragments were divided in the *Echinococcus* genome. The Southern blot performed either with total PCR product probe either with microsatellite flanking region probe revealed only one band. Thus, we hypothesized that the fragments are tandemly repeated and not dispersed in the genome. A long-PCR (5 min of elongation), performed with EmsB A/B primers and their complementary (EmsB A_{ext}/B_{ext}), showed congruent amplifications (Fig. 7) that are in favor of the hypothesis of contiguous repetitions. The sequencing of these fragments

Table 2
Composition of the microsatellite sequences isolated by PCR-product cloning of the CH1 sample

Fragment size (bp)	Clone number	Microsatellite nucleotides composition				Microsatellite size (bp)
215	7	(CA)7	(GA)4	GGTG	(GA)2	30
217	5	(CA)8	(GA)4	GGTG	(GA)2	32
221	2	(CA)10	(GA)4	GGTG	(GA)2	36
223	11	(CA)8	(GA)4	GGTG	(GA)5	38
225	5	(CA)10	(GA)4	GGTG	(GA)4	40
227	13	(CA)10	(GA)4	GGTG	(GA)5	42
229	8	(CA)11	(GA)4	GGTG	(GA)5	44
231	6	(CA)11	(GA)5	GGTG	(GA)5	46
233	11	(CA)14	(GA)4	GGTG	(GA)4	48
235	15	(CA)14	(GA)4	GGTG	(GA)5	50
237	5	(CA)15	(GA)4	GGTG	(GA)5	52
239	5	(CA)15	(GA)5	GGTG	(GA)5	54
241	10	(CA)15	(GA)6	GGTG	(GA)5	56
243	1	(CA)16	(GA)6	GGTG	(GA)5	58
245	2	(CA)18	(GA)5	GGTG	(GA)5	60
247	4	(CA)20	(GA)4	GGTG	(GA)5	62

See also Fig. 3 to observe the exact pattern of CH1 fluorescent-PCR product.

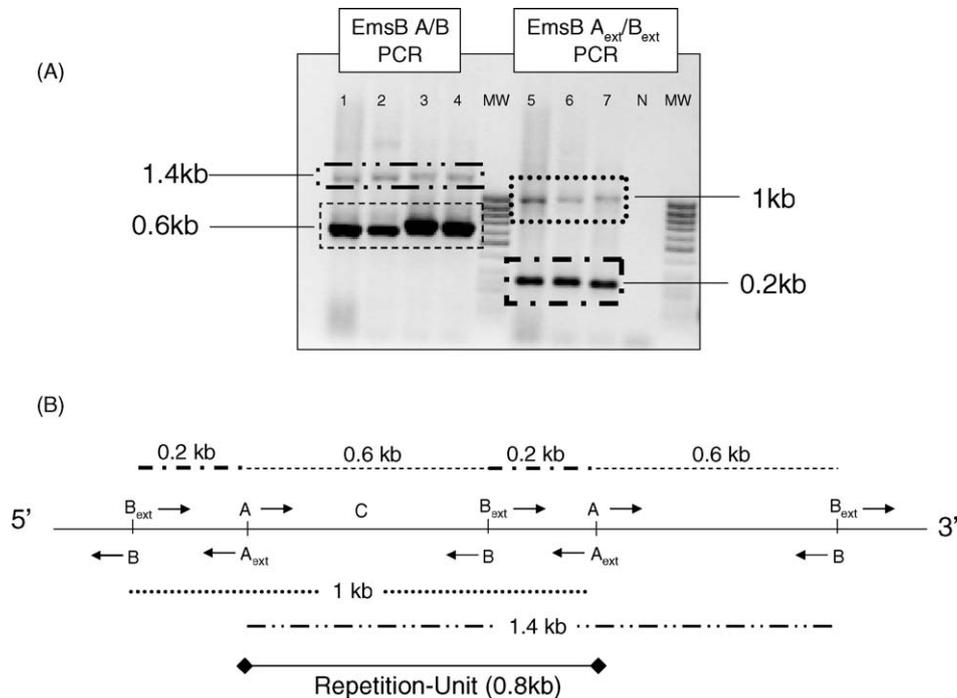


Fig. 7. PCR patterns showing the tandem feature of the EmsB fragment. (A) The primers EmsB A/B amplify a 0.6 kb band (containing the microsatellite sequence) and a 1.4 kb band, which contains two times the microsatellite sequence and the “inter-fragment region” of 0.2 kb. This “inter-fragment” is amplified with the EmsB A_{ext}/B_{ext}, which are the EmsB A/B complementary primers. The second band of 1 kb contains two times the “inter-fragment region” separated by the A/B microsatellite sequence. Lanes 1, 2, 5 and 6 are *E. multilocularis* samples; 4, 5 and 7 are *E. granulosus* samples, N is the negative control, M_W is the molecular weight. (B) Interpretation of the PCR bands thanks to the electrophoresis and the sequencing analysis. The sense of PCR elongation is indicated by arrows. The primer EmsB C, used for genotyping the parasite, was also located. Microsatellite sequence is comprised between A and C.

definitively proved the tandem distribution of a 0.8 kb repetition-unit. Its size varies due to the size of the microsatellite sequence that composed in part this unit (Fig. 1).

Finally, the use of quantitative PCR allowed us to estimate that the number of EmsB fragments is 10^4 copies (data not shown). This result is in congruence with the sensitivity threshold of the EmsB PCR that is 1 fg, i.e. 10,000 times downer than one *Echinococcus* genome size estimated around 10 pg (Gottstein and Mowatt, 1991).

4. Discussion

The microsatellite (EmsB), obtained by *Echinococcus* DNA library screening, presented a complex profile after electrophoretic analysis of the fluorescent-PCR products. The strategy, followed to characterize this profile, led us to think that this pattern is the exact expression of the repetitive nature of the microsatellite in the *Echinococcus* genome.

4.1. What is the molecular relevance of EmsB?

First, cloning carried out on PCR product, which had complex patterns, allowed us to segregate the different peaks; each transformed clone having only one insert. Furthermore, when fragment analysis was performed for each clone, the amplification of only single peaks was demonstrated. The simple profile allowed to refute the hypothesis of an in vitro slippage as a consequence of the Taq polymerase used. This

hypothesis concerned the “stutter” bands that could be produced during the extension time of the PCR. The slippage of the Taq DNA polymerase had led, in some cases, to the expansion and/or deletion of repetition units of the microsatellite sequence (Hite et al., 1996; Bulle et al., 2002; Shinde et al., 2003). In the present study, despite the use of different DNA polymerases, different PCR annealing temperatures and different cycle numbers, the profiles were always the same.

Then, sequencing of isolated peaks proved that size variation of the fragments corresponded to the variation in nucleotide composition of the microsatellite sequence. For some peaks of a same size, differences in the nucleotide composition were demonstrated (data not shown). This phenomenon can be linked to size homoplasy. Estoup et al. (2002) proposed the term of ‘molecular accessible size homoplasy’ (MASH) because DNA sequencing is useful to detect this type of information. The same authors concluded that this phenomenon does not represent a significant problem for many types of population genetics analyses. The high variability in microsatellite loci often compensates for their homoplasious evolution. Moreover, because of the microsatellite dinucleotide variation that continually causes a frame shift, there is high probability that the sequences are located in non-coding regions of the genomic DNA. Selective pressure is considered to be reduced, allowing a higher variation and an increased informativeness (Rodrigues et al., 2002).

We provided evidence that our DNA fragment is repeated in the parasite genome. But how were distributed these repeti-

tions? The Southern blot analysis combined with PCRs, able to amplify large fragment DNA, indicated that the repetition-units were clustered in tandem, at a defined location of the genome. To resume, taking into account all the features of the fragment studied, EmsB appeared to be the unit of a tandem repeats region (a minisatellite-like), in which varies a microsatellite sequence. This original pattern can be seen as a very complex variable number tandem repeats (VNTRs).

4.2. What will be the utility of EmsB?

Different types of polymorphic marker analyses generate different view-points, however, there is consensus about the restricted genetic variation within *E. multilocularis* (Haag et al., 1997; Bart et al., 2003). This relative homogeneity was interpreted as the recent spread of the parasite from the Arctic to sub-Arctic and temperate regions (Romig, 2002). In this situation where, due to the relative recent divergence of the species, the parasite population seems monomorphic, we required a rapidly-evolving marker (Tibayrenc, 1998). Despite the relatively small number of the *E. multilocularis* isolates investigated in the present study, our molecular marker already provided the ability to distinguish several genotypes. The group from St. Lawrence Island can be differentiated from the group from Europe. More than that, 20 genotypes have been exhibited within the European samples. From the repeatability experiment, a threshold has been defined to avoid over discrimination. Without this threshold, two samples could be separated, whereas their differences were only due to technical reasons. By taking a threshold at 0.2 as genetic distance, which corresponds to a large standard deviation, the risk to differentiate samples that are similar is reduced. Hence, parasites coming from the Freiburg's field can be seen as very closely associated parasites, whereas other Swiss parasites clearly belong to different genotypes.

With regard to temporal aspects, we demonstrated a respective stability of the marker by investigating two independent isolates maintained in mice by serial passage for a long time period. Results showed that the marker did not vary for each of the isolates during the entire time period assessed.

Despite its complexity, this multi-loci microsatellite target possesses the three important properties of genetics markers, i.e. sensitivity, repetitiveness and discriminatory power. The characterization of EmsB is a first step towards developing tools to tackle and understand the molecular epidemiology of *E. multilocularis* in the field. The question arises as to whether it is suitable to track potentially e.g. the infection source of human patients, or the temporal and spatial kinetics of dissemination within fox or rodent populations. We plan to carry out such investigations, especially on a large European panel of *E. multilocularis* samples to assess the emergence or not of the parasite in new detected foci.

Acknowledgements

This work was supported by the EU EchinoRisk-project QLK2-CT-2001-01995 (BBW no. 00.0586-1), the Swiss

National Science Foundation (Grant no. 31-63615.00), the US National Institute of Health and National Science Foundation (program R01 TW001565-05 "Ecology of infectious diseases").

References

- Bart, J.M., Breyer, I., Gottstein, B., Romig, T., Piarroux, R., 2003. Development of molecular tools to explore genetic diversity in *Echinococcus multilocularis*. *Helminthologia* 40, 117–121.
- Bowles, J., Blair, D., McManus, D.P., 1995. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. *Parasitology* 110, 317–328.
- Bretagne, S., Assouline, B., Vidaud, D., Houin, R., Vidaud, M., 1996. *Echinococcus multilocularis*: microsatellite polymorphism in U1 snRNA genes. *Exp. Parasitol.* 82, 324–328.
- Bulle, B., Millon, L., Bart, J.M., Gallego, M., Gambarelli, F., Portus, M., Schnur, L., Jaffe, C.L., Fernandez-Barredo, S., Alunda, J.M., Piarroux, R., 2002. Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3391–3397.
- De Luca, F., Reyes, A., Veronico, P., Di Vito, M., Lamberti, F., De Giorgi, C., 2002. Characterization of the (GAA) microsatellite region in the plant parasitic nematode *Meloidogyne artiellia*. *Gene* 293, 191–198.
- Eckert, J., Deplazes, P., 2004. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 107–135.
- Estoup, A., Jarne, P., Cornuet, J.M., 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Mol. Ecol.* 11, 1591–1604.
- Gasser, R.B., Chilton, N.B., 1995. Characterisation of taeniid cestode species by PCR-RFLP of ITS2 ribosomal DNA. *Acta Trop.* 59, 31–40.
- Gasser, R.B., Zhu, X., McManus, D.P., 1998. Dideoxy fingerprinting: application to the genotyping of *Echinococcus*. *Int. J. Parasitol.* 28, 1775–1779.
- Gottstein, B., Mowatt, M.R., 1991. Sequencing and characterization of an *Echinococcus multilocularis* DNA probe and its use in the polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 183–193.
- Gourlain, K., Amellal, B., Ait Arkoub, Z., Dupin, N., Katlama, C., Calvez, V., 2003. Quantitative analysis of human mitochondrial DNA using a real-time PCR assay. *HIV Med.* 4, 287–292.
- Haag, K.L., Zaha, A., Araujo, A.M., Gottstein, B., 1997. Reduced genetic variability within coding and non-coding regions of the *Echinococcus multilocularis* genome. *Parasitology* 115, 521–529.
- Hite, J.M., Eckert, K.A., Cheng, K.C., 1996. Factors affecting fidelity of DNA synthesis during PCR amplification of d(C-A)n-d(G-T)n microsatellite repeats. *Nucleic Acids Res.* 24, 2429–2434.
- McManus, D.P., 2006. Molecular discrimination of taeniid cestodes. *Parasitol. Int.* 55, S31–S37.
- Monis, P.T., Andrews, R.H., Saint, C.P., 2002. Molecular biology techniques in parasite ecology. *Int. J. Parasitol.* 32, 551–562.
- Nakao, M., Sako, Y., Ito, A., 2003. Isolation of polymorphic microsatellite loci from the tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Infect. Genet. Evol.* 3, 159–163.
- Okamoto, M., Bessho, Y., Kamiya, M., Kurosawa, T., Horii, T., 1995. Phylogenetic relationships within *Taenia taeniaeformis* variants and other taeniid cestodes inferred from the nucleotide sequence of the cytochrome c oxidase subunit I gene. *Parasitol. Res.* 81, 451–458.
- Providenti, M.A., O'Brien, J.M., Ewing, R.J., Paterson, E.S., Smith, M.L., in press. The copy-number of plasmids and other genetic elements can be determined by SYBR-Green-based quantitative real-time PCR. *J. Microbiol. Methods*.
- R Development Core Team, 2005. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.r-project.org>.
- Rinder, H., Rausch, R.L., Takahashi, K., Kopp, H., Thomschke, A., Loscher, T., 1997. Limited range of genetic variation in *Echinococcus multilocularis*. *J. Parasitol.* 83, 1045–1050.

- Rodrigues, N.B., Coura Filho, P., de Souza, C.P., Jannoti Passos, L.K., Dias-Neto, E., Romanha, A.J., 2002. Populational structure of *Schistosoma mansoni* assessed by DNA microsatellites. *Int. J. Parasitol.* 32, 843–851.
- Romig, T., 2002. Spread of *Echinococcus multilocularis* in Europe? In: Pawlowski, Z. (Ed.), *Cestode zoonoses: echinococcosis and cysticercosis, an emergent and global problem*. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands, pp. 65–80.
- Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132, 365–386.
- Schlotterer, C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109, 365–371.
- Shimodaira, H., 2002. An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. *Syst. Biol.* 51, 492–508.
- Shimodaira, H., 2004. Approximately unbiased tests of regions using multistep-multiscale bootstrap resampling. *Ann. Stat.* 32, 2616–2641.
- Shinde, D., Lai, Y., Sun, F., Arnheim, N., 2003. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)*n* and (A/T)*n* microsatellites. *Nucleic Acids Res.* 31, 974–980.
- Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503.
- Suzuki, R., Shimodaira, H., 2005. pvclust: hierarchical clustering with *p*-values. R package version 1.0-3. <http://www.is.titech.ac.jp/~shimo/prog/pvclust/>.
- Tibayrenc, M., 1998. Integrated genetic epidemiology of infectious diseases: the Chagas model. *Mem. I. Oswaldo Cruz* 93, 577–580.
- van Herwerden, L., Gasser, R.B., Blair, D., 2000. ITS-1 ribosomal DNA sequence variants are maintained in different species and strains of *Echinococcus*. *Int. J. Parasitol.* 30, 157–169.
- von Nickisch-Roseneck, M., Lucius, R., Loos-Frank, B., 1999. Contributions to the phylogeny of the Cyclophyllidea (Cestoda) inferred from mitochondrial 12S rDNA. *J. Mol. Evol.* 48, 586–596.
- Vuitton, D.A., Zhou, H., Bresson-Hadni, S., Wang, Q., Piarroux, M., Raoul, F., Giraudoux, P., 2003. Epidemiology of alveolar echinococcosis with particular reference to China and Europe. *Parasitology* 127 (Suppl.), S87–S107.
- Whelan, J.A., Russell, N.B., Whelan, M.A., 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J. Immunol. Methods* 278, 261–269.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J., 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103–119.

Assessment of Use of Microsatellite Polymorphism Analysis for Improving Spatial Distribution Tracking of *Echinococcus multilocularis*[∇]

J. Knapp,^{1,2*} J. M. Bart,² M. L. Glowatzki,³ A. Ito,⁴ S. Gerard,² S. Maillard,²
R. Piarroux,² and B. Gottstein¹

*Institute of Parasitology, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Bern, Switzerland*¹; *Parasitology Department, SERF Team (Equipe Santé Environnement Rural Franche-Comté), Faculty of Medicine, University of Franche-Comté, Besançon, France*²; *Department of Clinical Research, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Bern, Switzerland*³; and *Department of Parasitology, Asahikawa Medical College, Asahikawa, Hokkaido, Japan*⁴

Received 13 October 2006/Returned for modification 1 January 2007/Accepted 6 July 2007

Alveolar echinococcosis (AE)—caused by the cestode *Echinococcus multilocularis*—is a severe zoonotic disease found in temperate and arctic regions of the northern hemisphere. Even though the transmission patterns observed in different geographical areas are heterogeneous, the nuclear and mitochondrial targets usually used for the genotyping of *E. multilocularis* have shown only a marked genetic homogeneity in this species. We used microsatellite sequences, because of their high typing resolution, to explore the genetic diversity of *E. multilocularis*. Four microsatellite targets (EmsJ, EmsK, and EmsB, which were designed in our laboratory, and NAK1, selected from the literature) were tested on a panel of 76 *E. multilocularis* samples (larval and adult stages) obtained from Alaska, Canada, Europe, and Asia. Genetic diversity for each target was assessed by size polymorphism analysis. With the EmsJ and EmsK targets, two alleles were found for each locus, yielding two and three genotypes, respectively, discriminating European isolates from the other groups. With NAK1, five alleles were found, yielding seven genotypes, including those specific to Tibetan and Alaskan isolates. The EmsB target, a tandem repeated multilocus microsatellite, found 17 alleles showing a complex pattern. Hierarchical clustering analyses were performed with the EmsB findings, and 29 genotypes were identified. Due to its higher genetic polymorphism, EmsB exhibited a higher discriminatory power than the other targets. The complex EmsB pattern was able to discriminate isolates on a regional and sectoral level, while avoiding overdistinction. EmsB will be used to assess the putative emergence of *E. multilocularis* in Europe.

Echinococcus multilocularis is the causative agent of alveolar echinococcosis (AE), a parasitic infection of humans that can be lethal if not appropriately treated. In nature this zoonosis involves different mammalian hosts: carnivores (in Europe mainly foxes [*Vulpes vulpes*], dogs [*Canis lupus familiaris*], and raccoon dogs [*Nyctereutes procyonoides*]) act as definitive hosts (32), and a wide spectrum of rodents are intermediate hosts (34). Humans who are accidentally infected serve as intermediate hosts and may develop AE after a long incubation period (8, 33). Nonhuman primates, such as zoo gorillas (*Gorilla* spp.) or macaque monkeys (*Macaca* spp.) can also serve as aberrant intermediate hosts (7, 13, 25). The geographical distribution of the parasite includes large parts of the northern hemisphere: China, Central Asia (12), Hokkaido in Japan (20), Central and Eastern Europe (21, 23, 26, 34), and some parts of North America (14, 27). The extent of both infection and spatial distribution depends on different factors, for example, (i) the probability of a parasite-host encounter (encounter iris), depending on the density of susceptible rodents and carnivores and the human activities and behavior, and (ii) the balance between the immune evasion capacity of the parasite and the

host immune response (compatibility iris) (11). This interaction implies a host-parasite arms race that may depend not only on the genetic polymorphism of the host (11, 15, 16) among other components but also on the genetic polymorphism of the parasite. For *E. multilocularis*, few genetic differences among isolates have been observed with classical nuclear and mitochondrial targets (18). *E. multilocularis* has shown a variability of at least 10 times less than that of *Echinococcus granulosus*, the causative agent of cystic hydatidosis (5, 6, 18). The use of more sensitive tools such as microsatellites—fragments of nuclear DNA composed of 1 to 6 bp tandemly repeated—might provide more information about parasite DNA polymorphism; they are already used for genotyping and spatial distribution studies for other species of parasites, such as *Leishmania infantum* (10). They could help to better identify the spatial-temporal characteristics of the *E. multilocularis* transmission pattern (3). Analyses performed on the spacers of the U1snRNA gene have shown three distinct genetic profiles for European, North American, and Japanese isolates, but no variability between individual samples of the respective foci has been found (9). A Japanese team documented differences in an adult worm panel collected from Hokkaido Island, but no relationship between this sample panel and geographical position was demonstrated (22). These two publications highlighted the importance of microsatellite analyses in the exploration of the genetic diversity of *E. multilocularis*. Recently, our collaborative laboratory investigation identified 17 microsatel-

* Corresponding author. Mailing address: Parasitology Department, SERF Team, Faculty of Medicine, University of Franche-Comté, 19 rue Ambroise Paré, 25000 Besançon, France. Phone: 00 33 3 63 08 22 36. Fax: 00 33 3 63 08 22 32. E-mail: jenny.knapp@univ-fcomte.fr.

[∇] Published ahead of print on 18 July 2007.

TABLE 1. Primer sequences and characteristics of microsatellite loci in *E. multilocularis*

Primer names ^a	Primer sequence	Fragment size (bp)	Annealing temp (°C)	Repetition	Source (accession no.)
EmsJ A*, EmsJ B	5'-GAACGCGCTAACCGATTG-3', 5'-TTAGGAATGGGAAGGTGTGCG-3'	152–155	54	(CT) _n	In-house (AY680845)
EmsK A*, EmsK B	5'-CAGCTCAAAGAACCCGAAG-3', 5'-CCAAACTTCCGCTCACTCTG-3'	248–250	54	(CA) _n	In-house (AY680857)
EmsB A*, EmsB C	5'-GTGTGGATGAGTGTGCCATC-3', 5'-CCACCTTCCCTACTGCAATC-3'	209–241	60	(CA) _n (GA) _n	In-house (AY680860)
NAK1 A*, NAK1 B	5'-GGTAGCCAATGCTGTGGTTT-3', 5'-GCGAGGTCACGCAAATGTAT-3'	189–201	60	(CCA) _n	Nakao et al. (AB100031)

^a *, primer labeled. Primers NAK1 A* and NAK1 B were designed from the sequence EMms1 (AB100031) available in GenBank before the paper by Nakao et al. (4) was published.

lite targets (4). EmsB, a tandem repeated multilocus microsatellite, was identified and characterized. This microsatellite not only clearly demonstrated a high discriminatory power by identifying samples from different geographical origins (Alaska and Europe) but it also found several similar clusters within the European collection of isolates (4).

In the present investigation, in which the genetic polymorphism of *E. multilocularis* isolates from Europe, Alaska, China, and Japan was studied, we compared the relevance of four different microsatellite targets. Three of them were taken from a previous work by Bart et al., published in 2006 (4), and a microsatellite sequence published by Nakao et al. in 2003 was used as an independent marker (22).

MATERIALS AND METHODS

Selection of microsatellite targets. We selected our microsatellite targets from a series of 17 microsatellites published by Bart et al. in 2006 (4). In that study, by using amplification and fragment size analyses, microsatellites were isolated from *E. granulosus* in order to select markers which would show variations between *E. granulosus* and *E. multilocularis*. Two *E. granulosus* strains were initially tested: an Algerian sheep (strain G1) and a Mauritanian camel (strain G6) isolate; the *E. multilocularis* Swiss isolate CH5-h (shown in Table 2 of the present study) was also included. Seven microsatellites were subsequently selected and tested on 10 *E. multilocularis* isolates: CH1-h, CH5-h, 32A-h, 33F-h, 36CH-h, 39CH-h, 40CH-h, 41CH-h, SL1-h, and CND-r (included in Table 2 of the present study). For our study, we selected the three most polymorphic targets: EmsJ (GenBank accession no. GbR AY680845), EmsK (GbR AY680857), and EmsB (GbR AY680860). We also selected an additional independent target, NAK1, from a work published by Nakao et al. (target originally named EMms1; GbR AB100031) (22). For each of the four defined genomic regions, specific primers were designed with Primer3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). The respective characteristics are summarized in Table 1.

***E. multilocularis* isolates.** The panel of 76 *E. multilocularis* isolates was composed of purified single adult-stage worms obtained from definitive hosts and hepatic metacestode tissue material, which was obtained from intermediate hosts. The adult worms (29 isolates) were taken after necropsies of red foxes; their geographic origins are specified in Table 2. In the metacestode collection (47 isolates), 14 samples were from Alaska and Canada, including 10 specimens obtained in 1995 from *Microtus oeconomus* originating from a field (of about 100 m by 100 m) just outside of Savoonga, Saint Lawrence Island, Alaska. These particular samples were collected within a period of 3 days. Twenty-four samples were from Switzerland, among them 11 specimens obtained from *Arvicola terrestris*, all caught in a field (of about 500 m by 500 m) in the Canton of Fribourg over a 1-month period in 1994. Five metacestode tissue samples were isolated from *Microtus limnophilus* and *Cricetulus kamensis*, caught in an area of 50 km² in the vicinity of Tuan-Jie, a city located on the eastern Tibetan plateau (Shiqu County in Western Sichuan, China). Sampling was carried out in July 2001 for sample 2PRC-r and in July 2002 for the other Chinese samples. Fourteen samples were obtained from human AE patients residing in Japan, Alaska, Austria, Switzerland, France, and Germany. Six parasitic lesions were collected from monkeys in Swiss zoos, probably occurring after the animals were fed contaminated grass, mowed close to the zoo.

DNA extraction, PCR, and size polymorphism analysis. Total genomic DNA was isolated and purified from approximately 50 mg of each of the 47 parasite metacestode tissue samples and from the 29 single adult-stage worm samples, using a DNA Easy tissue kit (QIAGEN, Switzerland). The procedure was carried out according to the manufacturer's protocol. Purified DNA was eluted with 200 μ l of elution buffer (provided by the manufacturer) for metacestode samples and 50 μ l for adult worms, in order to obtain optimal DNA concentrations. The DNA concentrations were checked with a spectrophotometer apparatus (BioPhotometer; Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The DNA samples were then stored at -20°C until use for PCR. Reproducibility of results was checked by performing PCR and fragment analysis in two different laboratories: one in Bern (Switzerland) and the other one in Besançon (France). Amplification by PCR was performed in a 30- μ l reaction mixture containing 50 to 100 ng of DNA, 200 μ M of each deoxynucleoside triphosphate (GeneAmp dNTPs; Applied Biosystems, Foster City, CA), 0.4 μ M of fluorescent forward primer, 5'-labeled specific fluorescence dye, 0.7 μ M of classical reverse primers, and 0.5 U of AmpliTaq DNA polymerase enzyme associated with GeneAmp 1 \times PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, and 0.001% gelatin) (Applied Biosystems, Foster City, CA) in Bern and 0.5 U of REDTaq DNA polymerase enzyme associated with 1 \times REDTaq PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.1 mM MgCl₂, and 0.01% gelatin) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) for the method carried out in Besançon. The PCR amplification was achieved in a Biometra T3 thermocycler (Whatman Biometra, Goettingen, Germany), under the following conditions: 30 cycles with denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 54°C (EmsJ 1/2 and EmsK 1/2) or 60°C (EmsB 1/2 and NAK1 A/B) for 30 s, and extension at 72°C for 30 s to 1 min. PCR products were studied in fragment analysis, to assess the polymorphism of size using automatic sequencers. A comparison was made between the two different systems used, in order to evaluate and demonstrate the independent repeatability of the analyses: an ABI Prism 3100 automatic sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used in Bern, and a Beckman CEQ 8000 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) was used in Besançon. Fluorescence signals generated by marked primers were read by colorimetric analysis. Correspondences were established to assess the sizes of the amplified fragments, by using Genotyper 3.7 software for the ABI apparatus and Genetic Analysis System 8.0.52 software for the Beckman apparatus. To establish this comparison, the Pearson correlation coefficient was calculated for each sample between data sets obtained on the two systems. Stability of EmsB profiles was checked by repeated testing (five times) of sample 302 PL-F, selected randomly from the *E. multilocularis* panel.

Genotype determination and statistical analysis. Alleles from single-locus microsatellite targets (EmsJ, EmsK, and NAK1) were plotted using the results of fragment analyses and specified for homozygote or heterozygote genotypes. To assess the genetic diversity provided by EmsB, the presence and the height of each peak, basically corresponding to alleles, were recorded. Peaks below 10% of the highest peak per run were classified as artifacts and removed from the analysis. The height of each defined peak reflected the number of copies of the microsatellite present in the parasite DNA (4). Because the intensity of signals is dependent on the DNA concentration used for the PCR, normalization for an EmsB profile was achieved by dividing each peak by the sum of all the peaks for a given profile. This method of calculation is an improvement over the method used by Bart et al., which divided each peak by the highest peak of a given profile (4).

Clusters for the EmsB target were identified by hierarchical clustering analysis, using the Euclidean distance and the unweighted-pair group method using average linkages. The stability of clusters was tested by a multiscale bootstrap

TABLE 2. Main characteristics of *E. multilocularis* sample panel^a

Isolate code	Host species	Geographical origin	Yr of isolation
1AL-r	<i>Microtus oeconomus</i>	Alaska (St. Lawrence Island)	1996
2AL-r	<i>Microtus oeconomus</i>	Alaska (St. Lawrence Island)	1996
3AL-r	<i>Microtus oeconomus</i>	Alaska (St. Lawrence Island)	1996
4AL-r	<i>Microtus oeconomus</i>	Alaska (St. Lawrence Island)	1996
5AL-r	<i>Microtus oeconomus</i>	Alaska (St. Lawrence Island)	1996
6AL-r	<i>Microtus oeconomus</i>	Alaska (St. Lawrence Island)	1996
7AL-r	<i>Microtus oeconomus</i>	Alaska (St. Lawrence Island)	1996
10AL-r	<i>Microtus oeconomus</i>	Alaska (St. Lawrence Island)	1996
11AL-r	<i>Microtus oeconomus</i>	Alaska (St. Lawrence Island)	1996
13AL-r	<i>Microtus oeconomus</i>	Alaska (St. Lawrence Island)	1996
27AL-h	Human	Alaska (St. Lawrence Island)	1996
38AL-h	Human	Alaska	1996
SL1-h	Human	Alaska (St. Lawrence Island)	1996
CND-r	Rodent	Canada	ND ^b
2PRC-r	<i>Microtus limnophilus</i>	China (Tibet)	2001
5PRC-r	<i>Microtus limnophilus</i>	China (Tibet)	2002
6PRC-r	<i>Microtus limnophilus</i>	China (Tibet)	2002
7PRC-r	<i>Microtus limnophilus</i>	China (Tibet)	2002
9PRC-r	<i>Cricetulus kamensis</i>	China (Tibet)	2002
26J-h	Human	Japan	ND
E1J-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Japan (Hokkaido)	2005
I3J-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Japan (Hokkaido)	2005
M4J-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Japan (Hokkaido)	2005
N5J-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Japan (Hokkaido)	2005
O4J-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Japan (Hokkaido)	2005
33F-h	Human	France	ND
R04131-1F-F	<i>Vulpes vulpes</i>	France (Ardennes)	2004
14CH-r	<i>Arvicola terrestris</i>	Switzerland (Fribourg)	1995
15CH-r	<i>Arvicola terrestris</i>	Switzerland (Fribourg)	1995
16CH-r	<i>Arvicola terrestris</i>	Switzerland (Fribourg)	1995
17CH-r	<i>Arvicola terrestris</i>	Switzerland (Fribourg)	1995
18CH-r	<i>Arvicola terrestris</i>	Switzerland (Fribourg)	1995
19CH-r	<i>Arvicola terrestris</i>	Switzerland (Fribourg)	1995
20CH-r	<i>Arvicola terrestris</i>	Switzerland (Fribourg)	1995
21CH-r	<i>Arvicola terrestris</i>	Switzerland (Fribourg)	1995
22CH-r	<i>Arvicola terrestris</i>	Switzerland (Fribourg)	1995
23CH-r	<i>Arvicola terrestris</i>	Switzerland (Fribourg)	1995
24CH-r	<i>Arvicola terrestris</i>	Switzerland (Fribourg)	1995
36CH-h	Human	Switzerland	1982
37CH-h	Human	Switzerland	1990
39CH-h	Human	Switzerland	1980
40CH-h	Human	Switzerland	1994
41CH-h	Human	Switzerland	1986
CH1-h	Human	Switzerland	ND
CH5-h	Human	Switzerland	ND
29CH-m	Macaque monkey	Switzerland (Basel zoo)	1997
31CH-m	Macaque monkey	Switzerland (Basel zoo)	2003
34CH-m	Macaque monkey	Switzerland (Zürich zoo)	1991
42CH-m	Vervet monkey	Switzerland (Zürich zoo)	1989
43CH-m	Vervet monkey	Switzerland (Zürich zoo)	1990
45CH-m	Marmoset monkey	Switzerland (Lausanne zoo)	2003
3CH-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Switzerland	2001–2003
52CH-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Switzerland	2001–2003
64CH-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Switzerland	2001–2003
35D-h	Human	Germany	ND
101D-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Germany	2001–2003
116D-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Germany	2001–2003
121D-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Germany	2001–2003
126D-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Germany	2001–2003
141D-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Germany	2001–2003
32A-h	Human	Austria	1986
209A-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Austria	2001–2003
278A-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Austria	2001–2003
287A-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Austria	2001–2003
302PL-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Poland	2001–2003
310PL-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Poland	2001–2003
315PL-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Poland	2001–2003
392PL-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Poland	2001–2003
525CZ-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Czech Rep.	2001–2003
535CZ-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Czech Rep.	2001–2003
559CZ-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Czech Rep.	2001–2003
425SK-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Slovakia	2001–2003
435SK-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Slovakia	2001–2003
480SK-F	<i>Vulpes vulpes</i>	Slovakia	2001–2003
402NL-F	<i>Vulpes vulpes</i>	The Netherlands	2001–2003
420NL-F	<i>Vulpes vulpes</i>	The Netherlands	2001–2003
500	<i>Meriones unguiculatus</i>	France ^c	March 1991
501	<i>Meriones unguiculatus</i>	France ^c	May 1991
502	<i>Meriones unguiculatus</i>	France ^c	February 1992

^a Isolate code abbreviations: code number, geographical origin of sample, and animal host (lowercase letter for intermediate hosts [r, rodent; h, human; and m, monkey] and capital letter for definitive hosts [F, fox]). The sample collection contained 13 isolates from Alaska, 1 from Canada, 5 from China, 6 from Japan, 2 from France, 27 from Switzerland, 6 from Germany, 4 from Austria, 4 from Poland, 3 from the Czech Republic, 3 from Slovakia, and 2 from The Netherlands.

^b ND, not documented.

^c Isolate maintained in vivo in laboratory by several passages in *Meriones unguiculatus*.

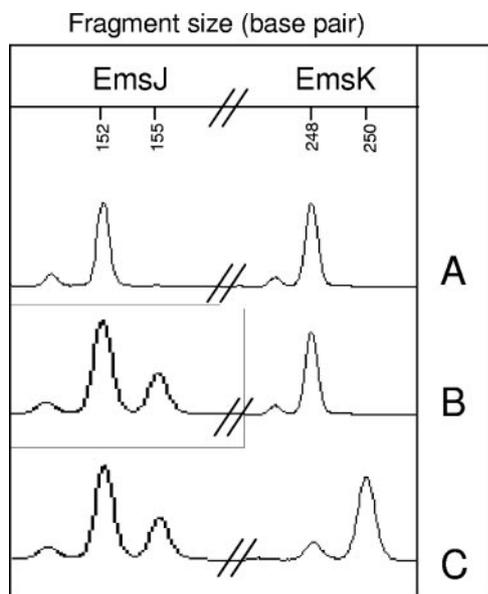


FIG. 1. Electrophoregrams of EmsJ (152 and 155 bp) and EmsK (248 and 250 bp) loci, performed with the automatic sequencer ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). A, European genotype; B, Asian, Alaskan, and Canadian genotypes; C, Alaskan genotype (found for only one rodent).

resampling ($B = 1,000$), resulting in approximately unbiased P values (28, 29). Dendrograms based on hierarchical clustering were constructed by using pvcult (31), available under the R Project (24). *E. granulosus* isolates were included in the analysis as outgroup controls (sample 539, a G1 Algerian sheep isolate, and sample 116, a G6 Mauritanian camel isolate [1, 2]). In previous experiments (4), we determined reproducibility and repeatability of EmsB microsatellite analyses by testing one isolate, which had been maintained in vivo in *Meriones unguiculatus* by serial passages at several-month intervals (samples 500, 501, and 502,

detailed in Table 2). Thus, these three samples showed similar EmsB profiles. These results were then used to calculate a genetic threshold, which enabled us to identify the isolate clusters.

The discriminatory power of each of the four microsatellites was assessed using Simpson's index (30), improved by Hunter and Gaston (19), and is described by the following equation:

$$D = 1 - \frac{1}{n(n-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

where n is the total number of isolates of the sample panel, s is the total number of groups described, and n_j is the number of isolates belonging to the j th type.

This index is based on the probability that two unrelated strain samples from a given panel will be placed in different typing groups. A genetic tool has a high discriminating power when the observed value exhibits an index close to 1.

Nucleotide sequence accession numbers. Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank database under the accession numbers AY680845, AY680857, AY680860, and AB100031.

RESULTS

EmsJ, EmsK, and NAK1 polymorphism. Both EmsJ and EmsK loci exhibited two alleles: 152 and 155 bp and 248 and 250 bp, respectively. These loci, forming three genotypes (A, B, and C) are presented in Fig. 1. Amplification for the EmsJ target was feasible for the entire sample panel (Table 3). For EmsK, one isolate yielded no amplification, even though different *Taq* polymerases and different running conditions were used (data not shown). The target pair EmsJ and EmsK split the panel into two clusters. The whole European panel presented homozygote genotypes at 152 bp for EmsJ and 248 bp for EmsK (Fig. 1A). The Asian, Alaskan, and Canadian isolates were characterized by heterozygote genotypes at 152 and 155 bp for EmsJ and a homozygote genotype at 248 bp for EmsK (Fig. 1B). Only one Alaskan sample (collected in the field close to Savoonga) differed for EmsK, with an allele at 250 bp (Fig. 1C). The rate of

TABLE 3. Results of fragment amplification for EmsJ, EmsK, and NAK1^a

Country-host	<i>n</i> ^b	EmsJ alleles		EmsK alleles			NAK1 alleles							
		Homoz. 152	Heteroz. 152 + 155	Homoz. 248	Homoz. 255	NA	Homoz. 189	Homoz. 192	Homoz. 195	Homoz. 198	Homoz. 201	Heteroz. 195 + 198	Heteroz. 198 + 201	NA
AL-r	10	0	10	9	1	0	0	3	1	0	0	0	0	6
AL-h	3	0	3	3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
CND-r	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
PRC-r	5	0	5	5	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0
J-h	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
J-F	5	0	5	5	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0
F-h	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
F-F	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
CH-r	11	11	0	11	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0
CH-h	7	7	0	6	0	1	0	1	1	4	0	0	0	0
CH-m	6	6	0	6	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0
CH-F	3	3	0	3	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0
D-h	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
D-F	5	5	0	5	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0
A-h	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
A-F	3	3	0	3	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0
PL-F	4	4	0	4	0	0	0	0	0	3	0	0	1	0
CZ-F	3	3	0	3	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0
SK-F	3	3	0	3	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
NL-F	2	2	0	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0

^a Geographical origins of samples: AL, Alaska; CND, Canada; PRC, China; J, Japan; F, France; CH, Switzerland; D, Germany; A, Austria; PL, Poland; CZ, Czech Republic; SK, Slovakia; NL, The Netherlands. Animal hosts: r, rodent; h, human; m, monkey; F, fox). Homoz., homozygous; Heteroz., heterozygous; NA, no amplification achieved.

^b *n*, number of *E. multilocularis* isolates tested.

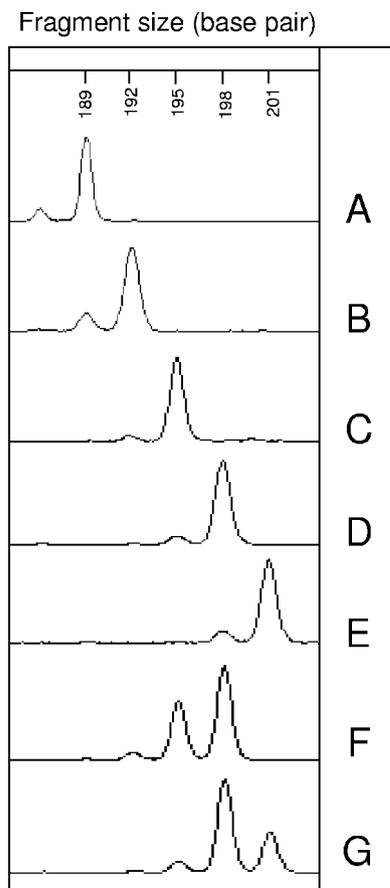


FIG. 2. Electrophoregrams of the NAK1 (192 to 201 bp) locus, performed with the automatic sequencer ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Genotypes A to G are shown, and a representative sample of each genotype is indicated in parentheses: A, Chinese samples (2PRC-r); B, Alaskan, Canadian, and Swiss samples (2AL-r); C, Alaskan, Japanese, Swiss, German, Austrian, Czech, and Dutch samples (14CH-r); D, Japanese and European samples (116D-F); E, Swiss samples (CH5-h); F, Alaskan, Swiss, and Austrian samples (32A-h); and G, one Polish sample (392PL-F).

heterozygosity observed was 33.3% for EmsJ and 0% for EmsK. The index of discrimination (D) was 0.37 for EmsJ with two groups and 0.03 for EmsK with two groups.

Amplification of the NAK1 target was basically in agreement with previously published data (22). However, a slight size difference of 30 bp was due to the use of primers NAK1 A and NAK1 B (Table 1), which were designed from the sequence available in GenBank (GbR AB100031) before the paper by Nakao et al. was published (22). In addition, two new alleles were found with these primers. Overall, this target presented a total of five alleles, with five homozygote and two heterozygote genotypes (Fig. 2 and Table 3). Some of the Alaskan isolates could not be amplified, despite the use of different sets of primers and different conditions as described above. The investigation of metacestodes from the Chinese rodents yielded one specific allele at 189 bp. An allele at 192 bp was found predominantly in Alaskan and Canadian samples. Among the European and Japanese samples, the 195- and 198-bp alleles were predominant. The 201-bp allele was present only among Swiss isolates. The rate of heterozygosity was 5.88%. The index

of discrimination was 0.73 for NAK1, with seven different groups.

Reproducibility of results was demonstrated by performing the experiments independently at the two research laboratories mentioned above.

EmsB polymorphism. EmsB amplification was successful for the entire sample collection. The EmsB investigations resulted in a complex profile pattern, yielding 17 different alleles (209 bp to 241 bp) as described by Bart et al. in 2006 (4). The Pearson correlation coefficient was determined for each sample between data sets obtained on the Beckman CEQ 8000 and on the ABI Prism 3100. It ranged between 0.92 and 0.99 ($P < 0.001$). Furthermore, patterns found with the Beckman CEQ 8000 were in agreement with those found with the ABI Prism 3100 as shown in the Fig. 3.

Repeatability was assessed by performing PCR and fragment analyses of the Polish fox sample 302 PL-F five times with both systems. After normalization of the profiles, standard deviation (σ) of the genetic distance between each repetition was 3.1×10^{-3} with the ABI system versus 6.3×10^{-3} with the Beckman system. The main EmsB profiles are shown in Fig. 4a.

ABI data were used to construct a dendrogram (Fig. 4b). Robustness of nodes was tested by multiscale bootstrap resampling ($B = 1,000$), given an approximately unbiased P value. The outgroup controls, composed of two *E. granulosus* samples, were distinguished from the other groups by a maximum genetic distance of 0.5.

A genotypic threshold, based on the results given by the cultivated isolates, was created to define the total number of genotypes. This threshold was calculated according to the following formula: $x + 3\sigma$ (where x represents the average of the genetic distance found between the three samples and σ represents the standard deviation). The calculated average was 0.0266, and standard deviation was 0.0177. The calculated genetic distance value was 0.08. With this method of classification, the index of discrimination was 0.94 for this target, with 29 different groups.

The *E. multilocularis* panel was divided into three distinct clusters. The Alaskan block was composed of isolates obtained from rodents all caught in the same field and from two Alaskan patients (profile A in Fig. 4). This cluster was genetically distinguished from the other isolates by a value of 0.48. The Asia-Canada-Alaska group (profiles B and C) was clearly distinguishable from the European cluster by a value of 0.32. In Fig. 4, five main European EmsB profiles (D, E, F, G, and H) are shown. Their variations were due to the heights, the numbers, and the sizes of the peaks. For a given profile, variations were caused only by the heights of the peaks. We were able to differentiate several genotypes using our fixed genetic threshold. Thus, 23 genotypes were identified out of the 51 European samples. For example, the cluster formed by profile D was split into four closed genotypes. Profile E was characteristic for the parasites collected from rodents caught in the Fribourg field. Profile F was found among *E. multilocularis* collected from Swiss foxes, humans, and monkeys.

DISCUSSION

Previous studies (4, 9, 22) have tackled *E. multilocularis* genetic variability by using microsatellite DNA targets. Micro-

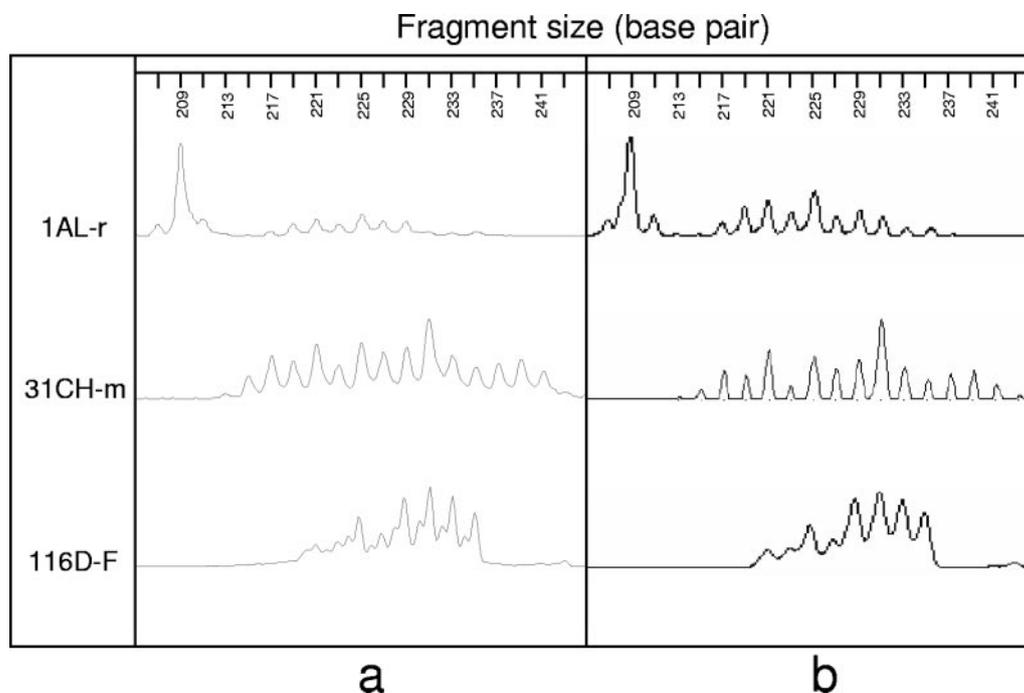


FIG. 3. Comparison between electrophoregrams performed with the automatic sequencers Beckman CEQ 8000 (a) and ABI Prism 3100 (b) for three isolates arbitrarily selected from the present sample collection: 1AL-r, Alaskan rodent isolate; 31CH-m, Swiss zoo monkey isolate; and 116D-F, German red fox isolate. The Pearson correlation coefficient was determined for results obtained on the two systems and was 0.99 for AL-r, 0.96 for 31CH-m, and 0.99 for 116D-F ($P < 0.001$).

satellite sequences, due to their high power of discrimination, seemed to be a suitable tool to search for genetic differences not only between geographically distinct endemic areas but also within the areas themselves (4, 22). In the present study, we assessed and compared the discriminatory powers of different microsatellite targets by investigating a large panel of *E. multilocularis* isolates originating from different endemic foci, such as Saint Lawrence Island (Alaska), Central Europe, the Tibetan Plateau, and Japan. The single-locus microsatellites EmsJ and EmsK provided data about the parasites' genetic diversity that was relevant for discriminating samples over a large geographical range. The European cluster could thus be distinguished from the Alaskan, Canadian, and Asian cluster by two distinctly different genotypes. This combination enabled us to determine the global origins of the samples. Nevertheless, these two microsatellites exhibited a weak discriminatory power on a small scale, and we were unable to compare our results with the heterozygosity previously described by Nakao et al. (22).

With regard to NAK1, its higher level of discriminatory power enabled us to determine genetic polymorphism between the Tibetan, Alaskan, and European-Japanese clusters. On the other hand, a strong similarity was depicted for samples collected from the same field in Switzerland, indicating a possible common origin of contamination by *E. multilocularis* in that area, as there was also a spatial and temporal homogeneity with regard to the sampling procedure. The same phenomenon was observed for some Alaskan rodents, caught under similar geographically restricted conditions. While these findings were demonstrated with EmsB, they could not be confirmed with the NAK1 target, because these samples did not provide spe-

cific amplification products. The lack of amplification has not been clarified, despite the redesign of several primer sets. No reliable geographical or genetic structures were observed among the other European samples with the NAK1 target. More isolates have to be investigated to document the polymorphism level of this target in different areas. The fairly high rate of polymorphism of NAK1 may be linked to the mutation rate which occurs faster in the NAK1 region than in those of the other two single-locus microsatellites. The heterozygosity found by NAK1 in the present study was qualitatively in agreement with results previously published by Haag et al. and Nakao et al. (17, 22). However, the relatively low rate of heterozygosity confirmed that cross-fertilization occurs in the tapeworm, but to a much lesser extent than self-fertilization (17).

The EmsB target, referred to as a "tandem repeated multilocus microsatellite," had a higher discriminatory power than the conventionally used single-locus microsatellites. Indeed, with the 17 alleles described, EmsB enabled us to discriminate single isolates from the same geographic origin, even at the "field" level. The extremely high discriminatory power of this target did not prejudice our study, as only a small genetic distance between samples from the same geographical origin was found, i.e., in the field in Alaska and in the one in Switzerland. When comparing single-locus microsatellites and EmsB results, the hypothesis of a "clonal" contamination of rodents living in the same field by, for example, one or several foxes that were infected by the same parasite isolate is considerably strengthened. In addition, an identical profile was found for different Swiss hosts, as shown in Fig. 4. This result illustrates that the genetic variability exhibited by EmsB is linked to

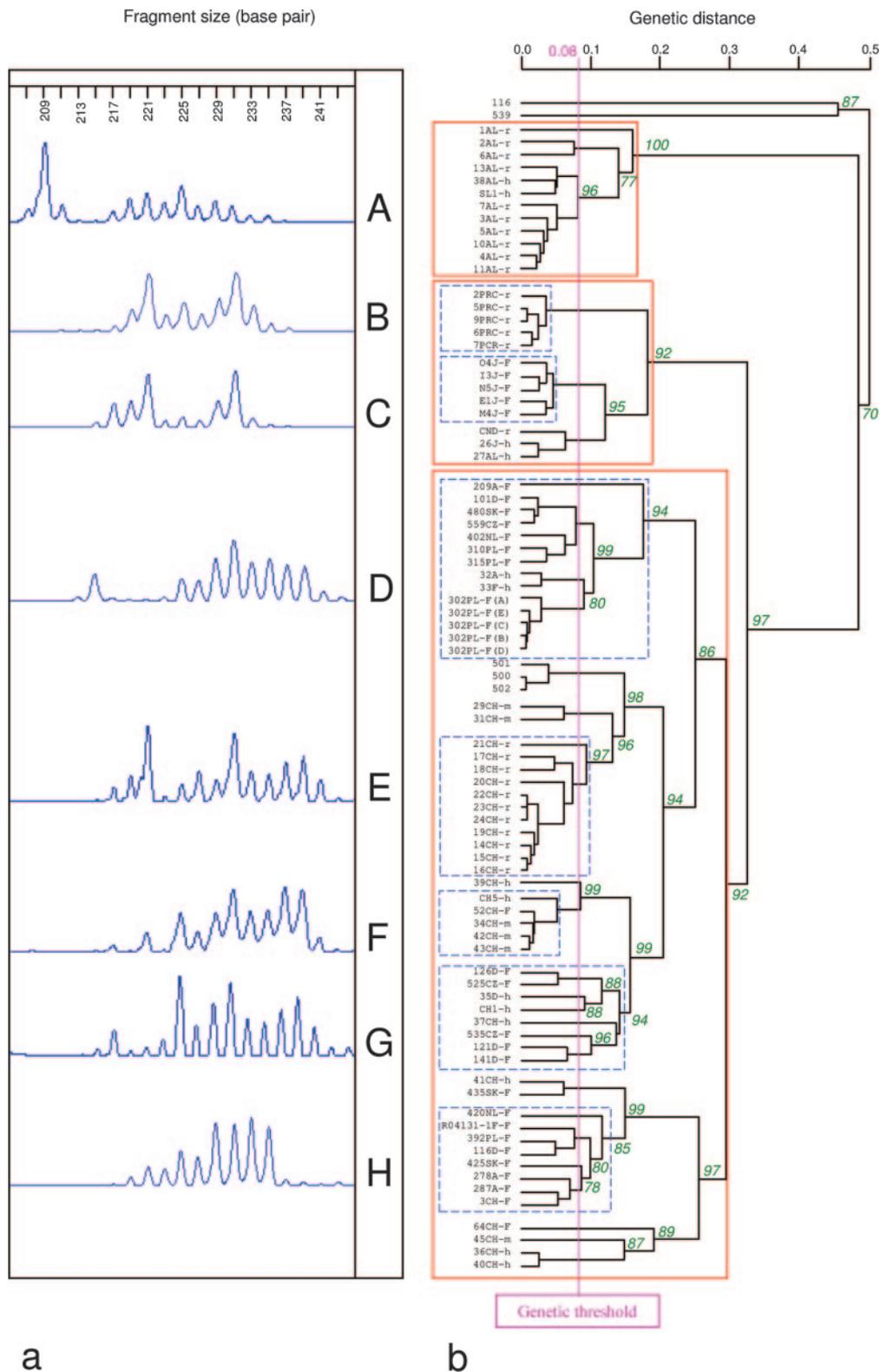


FIG. 4. *E. multilocularis* genetic classification according to EmsB results. On the left side (a), an example of electrophoregrams of EmsB loci (209 bp to 241 bp), obtained using the automatic sequencer ABI Prism 3100. On the right side (b), a dendrogram based on EmsB genotypic data, constructed by hierarchical clustering analysis (Euclidian distance, average link clustering method), with pvclust, under the R Project. The approximately unbiased P values (numbers on nodes, in percent) were calculated with a multiscale bootstrap ($B = 1,000$). The three solid-line boxes show St. Lawrence Island's samples (upper box), the Asian-North American samples (middle box), and the European samples (lower box). The electrophoregrams correspond to (A) the St. Lawrence Island profile in the genetic tree and the dotted-line boxes refer to (B) the Chinese rodent profile, (C) the Japanese fox profile, and (D through H) the main European profiles. Samples 500, 501, and 502 represent a single isolate maintained in vivo by several passages in *Meriones unguiculatus*. Sample 116 originating from a Mauritanian camel and sample 539 originating from an Algerian sheep were *E. granulosus* samples and were included as outgroup controls.

the geographical specificity and not to the host specificity of samples.

Genetic studies using microsatellites are commonly based upon multiplex analyses in which 10 to 15 targets are simultaneously amplified in the same PCR. These analyses are usually carried out in forensic investigations or in filiation studies for livestock animals. *E. multilocularis* is an organism with a particular reproduction pattern. The very low encountered heterozygosity rate indicates a predominantly self-fertilizing breeding process. This organism does not follow the Hardy-Weinberg principle, and multiplex studies are thus not appropriate. Thus, the EmsB microsatellite proved to be very useful because it provided more information with a single PCR than, for example, 10 single-locus microsatellites together. Furthermore, it yielded a high rate of positive analyses, with nearly 100% of output.

For the first time, a relevant tool is now available to study the temporal and spatial development of the parasite within different host populations, since the similarity between the profiles of definitive and intermediate hosts can be demonstrated.

Using this tool, the question of emergence or reemergence of the infection in several regions of Europe can be addressed (14). Tracking the spread of single genotypes spatially and temporally may help to identify the source of the parasites in recently described new areas of endemicity. Due to the long incubation period of AE in humans, tracing the contamination to its source has been nearly impossible so far. The next challenge will be to superimpose a genetic distribution map on eco-epidemiological data and to construct a risk map for better public health management.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to the following persons for providing parasite specimens: Peter Deplazes (Switzerland), Joke van der Giessen (The Netherlands), Thomas Romig (Germany), Andrzej Malczewski (Poland), Pavol Dubinsky (Slovak Republic), Karel Martinek (Czech Republic), Georg Duscher (Austria), Minorou Nakao and Nariaki Nonaka (Japan), and Patrick Giraudoux, Francis Raoul, and Marie-Hélène Guislain (France). We also thank Karen Haag (Brazil) for constructive comments on the manuscript.

This work was supported by the EU EchinoRisk Project QLK2-CT-2001-01995 (BBW no. 00.0586-1), the Swiss National Science Foundation (grant no. 31-111780/1), and the U.S. National Institutes of Health and National Science Foundation (program R01 TW001565-05 "Ecology of Infectious Diseases").

REFERENCES

- Bardonnet, K., R. Piarroux, L. Dia, F. Schneegans, A. Beurdeley, V. Godot, and D. A. Vuitton. 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**:383-386.
- Bart, J. M., K. Bardonnet, M. C. Elfegoun, H. Dumon, L. Dia, D. A. Vuitton, and R. Piarroux. 2004. *Echinococcus granulosus* strain typing in North Africa: comparison of eight nuclear and mitochondrial DNA fragments. *Parasitology* **128**:229-234.
- Bart, J. M., I. Breyer, B. Gottstein, T. Romig, and R. Piarroux. 2003. Development of molecular tools to explore genetic diversity in *Echinococcus multilocularis*. *Helminthologia* **40**:117-121.
- 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.
- 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.
- Bowles, J., and D. P. McManus. 1993. Molecular variation in *Echinococcus*. *Acta Trop.* **53**:291-305.
- Brack, M., K. Tackmann, F. J. Conraths, and S. Rensing. 1997. Alveolar hydatidosis (*Echinococcus multilocularis*) in a captive rhesus monkey (*Macaca mulatta*) in Germany. *Trop. Med. Int. Health* **2**:754-759.
- Bresson-Hadni, S., R. Piarroux, B. Bartholomot, J. P. Miguët, G. Manton, and D. Vuitton. 2005. Echinococcoses alvéolaires—alveolar echinococcosis. *EMC Hépatogastroentérologie* **2**:86-104.
- Bretagne, S., B. Assouline, D. Vidaud, R. Houin, and M. Vidaud. 1996. *Echinococcus multilocularis*: microsatellite polymorphism in U1snRNA genes. *Exp. Parasitol.* **82**:324-328.
- Bulle, B., L. Millon, J. M. Bart, M. Gallego, F. Gambarelli, M. Portus, L. Schnur, C. L. Jaffe, S. Fernandez-Barredo, J. M. Alunda, and P. Piarroux. 2002. Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3391-3397.
- Combes, C. 1997. Fitness of parasites: pathology and selection. *Int. J. Parasitol.* **27**:1-10.
- Craig, P. S. 2006. Epidemiology of human alveolar echinococcosis in China. *Parasitol. Int.* **55**(Suppl.):S221-S225.
- Deplazes, P., and J. Eckert. 2001. Veterinary aspects of alveolar echinococcosis—a zoonosis of public health significance. *Vet. Parasitol.* **98**:65-87.
- Eckert, J., F. J. Conraths, and K. Tackmann. 2000. Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? *Int. J. Parasitol.* **30**:1283-1294.
- Eiermann, T. H., F. Bettens, P. Tiberghien, K. Schmitz, I. Beurton, S. Bresson-Hadni, R. W. Ammann, S. F. Goldmann, D. A. Vuitton, B. Gottstein, and P. Kern. 1998. HLA and alveolar echinococcosis. *Tissue Antigens* **52**:124-129.
- Gottstein, B., F. Bettens, A. J. Parkinson, and F. Wilson. 1996. Immunological parameters associated with susceptibility or resistance to alveolar hydatid disease in Yupiks/Inupiat. *Arctic Med. Res.* **55**:14-19.
- Haag, K. L., A. M. Araujo, B. Gottstein, and A. Zaha. 1998. Selection, recombination and history in a parasitic flatworm (*Echinococcus*) inferred from nucleotide sequences. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **93**:695-702.
- Haag, K. L., A. Zaha, A. M. Araujo, and B. Gottstein. 1997. Reduced genetic variability within coding and non-coding regions of the *Echinococcus multilocularis* genome. *Parasitology* **115**:521-529.
- Hunter, P. R., and M. A. Gaston. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* **26**:2465-2466.
- Ito, A., T. Romig, and K. Takahashi. 2003. Perspective on control options for *Echinococcus multilocularis* with particular reference to Japan. *Parasitology* **127**(Suppl.):S159-S172.
- Kern, P., K. Bardonnet, E. Renner, H. Auer, Z. Pawlowski, R. W. Ammann, and D. A. Vuitton. 2003. European echinococcosis registry: human alveolar echinococcosis, Europe, 1982-2000. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:343-349.
- Nakao, M., Y. Sako, and A. Ito. 2003. Isolation of polymorphic microsatellite loci from the tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Infect. Genet. Evol.* **3**:159-163.
- 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. Vuitton, and P. L. R. Francechino. 2006. Surveillance de l'échinococcoses alvéolaires en France: bilan de cinq années d'enregistrement 2001-2005. *Bull. Epidemiol. Hebd.* **27-28/2006**:206-208.
- R Development Core Team. 2005. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.r-project.org>.
- Rehmann, P., A. Grone, A. Lawrenz, O. Pagan, B. Gottstein, and L. N. Bacciarini. 2003. *Echinococcus multilocularis* in two lowland gorillas (*Gorilla g. gorilla*). *J. Comp. Pathol.* **129**:85-88.
- Romig, T., A. Dinkel, and U. Mackenstedt. 2006. The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol. Int.* **55**(Suppl.):S187-S191.
- Schantz, P. M., C. F. von Reyn, T. Welty, and M. G. Schultz. 1976. Echinococcosis in Arizona and New Mexico. Survey of hospital records, 1969-1974. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **25**:312-317.
- Shimodaira, H. 2002. An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. *Syst. Biol.* **51**:492-508.
- Shimodaira, H. 2004. Approximately unbiased test of regions using multi-step-multiscale bootstrap resampling. *Ann. Stat.* **32**:2616-2641.
- Simpson, E. H. 1949. Measurement of diversity. *Nature (London)* **163**:688.
- Suzuki, R., and H. Shimodaira. 2005. pvclust: hierarchical clustering with *p*-values. R package version 1.0-3. <http://www.is.titech.ac.jp/~shimo/prog/pvclust/>.
- Thompson, R. C., C. M. Kapel, R. P. Hobbs, and P. Deplazes. 2006. Comparative development of *Echinococcus multilocularis* in its definitive hosts. *Parasitology* **132**:709-716.
- Vuitton, D. A., S. L. Zhang, Y. Yang, V. Godot, I. Beurton, G. Manton, and S. Bresson-Hadni. 2006. Survival strategy of *Echinococcus multilocularis* in the human host. *Parasitol. Int.* **55**(Suppl.):S51-S55.
- Vuitton, D. A., H. Zhou, S. Bresson-Hadni, Q. Wang, M. Piarroux, F. Raoul, and P. Giraudoux. 2003. Epidemiology of alveolar echinococcosis with particular reference to China and Europe. *Parasitology* **127**(Suppl.):S87-S107.



Genetic diversity of *Echinococcus multilocularis* on a local scale[☆]

J. Knapp^{a,b,*}, M.-H. Guislain^{a,c}, J.M. Bart^a, F. Raoul^a, B. Gottstein^b, P. Giraudoux^a, R. Piarroux^a

^a Department of Chrono-Environment, CNRS 6249 usc INRA, University of Franche-Comté, Besançon, France

^b Institute of Parasitology, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Bern, Switzerland

^c 2C2A-CERFE, 5 rue de la Héronnière, 08240 Boult-aux-Bois, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 January 2008

Received in revised form 25 February 2008

Accepted 28 February 2008

Available online 4 March 2008

Keywords:

Echinococcus multilocularis

Microsatellite DNA

Red fox

Mixed infection

Genetic diversity

Endemic area

Local range

ABSTRACT

Echinococcus multilocularis is the causative agent of human Alveolar Echinococcosis (AE), and it is one of the most lethal zoonotic infections in the Northern Hemisphere. In France, the eastern and central regions are endemic areas; Franche-Comté, Lorraine and Auvergne are particularly contaminated. Recently, several human cases were recorded in the French Ardennes area, a region adjacent to the western border of the *E. multilocularis* range in France. A previous study in this focus described a prevalence of over 50% of the parasite in red foxes. The present study investigated the genetic diversity of adult worms collected from foxes in a 900 km² area in the Ardennes. Instead of a conventional mitochondrial target (ATP6), two microsatellite targets (EmsB and NAK1) were used. A total of 140 adult worms isolated from 25 red foxes were genotyped. After hierarchical clustering analyses, the EmsB target enabled us to distinguish two main assemblages, each divided into sub-groups, yielding the differentiation of six clusters or assemblage profiles. Thirteen foxes (52% of the foxes) each harbored worms from at least two different assemblage profiles, suggesting they had become infected by several sources. Using the NAK1 target, we identified 3 alleles, two found in association with the two EmsB assemblages. With the NAK1 target, we investigated the parasite breeding system and the possible causes of genetic diversification. Only one fox harbored hybrid worms, indicative of a possible (and rare) occurrence of recombination, although multiple infections have been observed in foxes. These results confirm the usefulness of microsatellite targets for assessing genetic polymorphism in a geographically restricted local range.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Alveolar Echinococcosis, a zoonosis which is life-threatening to humans, is caused by infection by the larval stage of the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis*. The red fox (*Vulpes vulpes*) acts as the main definitive host species and harbors the adult stages (Thompson et al., 2006), and arvicolid rodents act as intermediate hosts (Rausch, 1995). Humans can accidentally ingest eggs released into the environment upon definitive host defecation and subsequently develop a parasitic lesion (Bresson-Hadni et al., 2005), which resembles tumor-like tissue. They primarily infiltrate the liver and secondarily may metastasize in other organs or sites. The *E. multilocularis* tapeworm is widespread in the Northern Hemisphere and is a serious public health

problem in many endemic areas in Central Europe (Vuitton et al., 2003; Romig et al., 2006). Switzerland, France, Austria and Germany have been recognized as historical endemic countries (Eckert et al., 2000; Kern et al., 2003). In France, most human cases have been recorded in the areas of Franche-Comté, Lorraine, Auvergne and east of the Rhône-Alpes regions (Vuitton et al., 2003), and these areas have been classified as endemic (Eckert et al., 2000). A few years ago, ectopic cases appeared in regions previously considered as non-endemic, and one was the French Ardennes, which is in North-Eastern France (Piarroux et al., 2006), on the western border of the French, and European, endemic area. Here, *E. multilocularis* prevalence in foxes has reached 53% (Guislain et al., 2008). However, it is not clear if the occurrence of human cases in this area results from a recent western extension of the endemic area, or if low noise transmission has only recently been identified due to increased interest. Assessment of the polymorphism of the parasite in this focus could help to investigate the problem by showing either a homogeneous population of parasites, mono- or oligoclonal, which would argue in favor of the hypothesis of a recent introduction, or a genome-wide polymorphism which could reinforce the hypothesis of an old, undetected focus.

[☆] Nucleotide sequence data reported in this the paper are available in the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession numbers AY680860, AB100031, EU044715, EU044716, EU044717, AB018440 and AB027557.

* Corresponding author at: Department of Chrono-Environment, CNRS 6249 usc INRA, Faculty of Medicine, 19 rue Ambroise Paré, 25000 Besançon, France. Tel.: +33 3 63 08 22 36; fax: +33 3 63 08 22 32.

E-mail address: jenny.knapp@univ-fcomte.fr (J. Knapp).

Recently, microsatellite DNA tools – small tandemly repeated sequences (1–6 bp) widely dispersed in eukaryote DNA – were isolated and characterized from *Echinococcus* spp. total DNA. They have exhibited a high power of discrimination in *E. multilocularis* samples, isolated from geographically disparate areas (Bretagne et al., 1996; Bart et al., 2003, 2006; Nakao et al., 2003); classical nuclear and mitochondrial targets have failed to achieve this (Haag et al., 1997). The tandemly repeated multilocus microsatellite EmsB has proved to be a highly sensitive target for investigating the genetic diversity of samples from different geographical origins, at both continental and local focus levels (Bart et al., 2006; Knapp et al., 2007).

We assessed the genetic diversity of *E. multilocularis* in red foxes sampled in a 900 km² area in the south-eastern part of the French region of the Ardennes. Genotypes were studied by using the tandemly repeated multilocus microsatellite EmsB, the single-locus microsatellite NAK1 and the conventional mitochondrial target ATP6.

2. Materials and methods

2.1. Collection of *E. multilocularis* samples

Intestines from 149 red fox carcasses (trapped or victims of road accidents) were examined by the Sedimentation and Counting Technique (SCT) as described by Raoul et al. (2001) between January 2001 and August 2005 in a 900 km² (30 km × 30 km) area in the south-eastern part of the French region of the Ardennes and the neighboring Meuse region.

Fifty-three percent of foxes ($n_{\text{tot}} = 79$) harbored *E. multilocularis* worms. Precise worm burden intensity was determined for all foxes, and a variable number of worms were sampled for each fox (from 2 to 50 adult worms) and stored in 70% (v/v) ethanol until use.

Foxes were *a posteriori* classified into two worm burden categories: foxes harboring under 10,000 adult worms (low to medium worm burden, $n = 72$ foxes) and foxes harboring more than 10,000 worms (high worm burden, $n = 7$ foxes). According to the number of worms available, up to 5 worms were selected from each fox with a low to middle burden, and up to 10 worms from each fox with a high burden. More samples were isolated from foxes with high burdens in order to (i) assess the possibility of colonization by different genotypes in the small intestine of foxes as shown by Nakao et al. (2003) and (ii) screen for the presence of heterozygosity, which may occur after mating between two worms (Haag et al., 1998).

Upon microscopic examination of intestinal mucosa, single worms exhibiting the presence of at least 3 intact proglottids, with at least one gravid (with visible eggs) among them, were carefully isolated.

We included in this study only foxes in which at least 5 gravid adult worms were isolated.

2.2. *E. multilocularis* DNA extraction

Each individual worm was separately processed by washing it three times in sterile distilled water. Total DNA of each single adult-stage worm was extracted and purified with the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) according to manufacturer's protocol. Purified DNA was eluted in 50 µl elution buffer (provided by the manufacturer). DNA concentrations were checked with a spectrophotometer apparatus (BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). DNA was stored at –20 °C before being used for PCR.

2.3. Investigation for *E. multilocularis* polymorphism and recombination events by microsatellite targets

The genetic diversity of *E. multilocularis* was assessed by fluorescent PCR, followed by fragment size analyses with the tandem repeated multilocus microsatellite target EmsB (GenBank accession no. AY680860). This target is composed of thousands of tandemly repeated sequences, each of which contains two repeated and juxtaposed motifs (CA)_i and (GA)_j, where *i* and *j* are the number of repetitions (Bart et al., 2006). Due to the size polymorphism of each sequence, a multipeak pattern is obtained after a single PCR. This pattern may vary from one worm to another, and different genotypes can thus be identified (Knapp et al., 2007).

Because of its complex pattern, EmsB cannot be used to assess the cross-fertilization status of *E. multilocularis*. Therefore, genotyping of *E. multilocularis* was also carried out using the single-locus NAK1, previously isolated and described by Nakao et al. (2003). This target is composed of the following repeated motifs: (CAC)_k (CGC)_i (CAC)_m (TAC)_n (TAT)_o, where *k*, *l*, *m*, *n* and *o* are the number of repetitions.

For each fox presenting at least one worm with a heterozygote NAK1 profile, additional worms were isolated and tested. The anterior scolex and the posterior gravid segment of these worms were individually separated by dissection under a microscope and isolated. Fragment size analyses were carried out for the two parts using EmsB and NAK1 targets.

PCR was carried out in a 30 µl reaction mixture containing between 20 and 50 ng of purified DNA of one whole single worm or scolex/gravid segment for additional worms, 200 µM of each dNTP (GeneAmp dNTP, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0.4 µM of fluorescent forward primer, 5'-labeled with specific fluorescence dye, EmsB A* and 0.7 µM of classical reverse primers, EmsB C (Table 1), 0.5 U of AmpliTaq DNA Polymerase enzyme, associated with GeneAmp 1X PCR Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ and 0.001% gelatin) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The hot-start enzyme, AmpliTaq Gold DNA Polymerase enzyme (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), was used for the NAK1 target to improve the amplification reaction (Knapp et al., 2007).

Table 1
Primer sequences and characteristics of DNA targets

Primer name ^a	Primer sequence	Fragment size (bp)	T _m (°C)	Repetition	Designed origin
atp6Em/F atp6Em/R	5'-GGTTATTGTGAATGATTTTGGTTC-3' 5'-AATGATCAATCGAAAAATCCAA-3'	512	60	/	In-house (from AB018440)
EmsB A* EmsB C	5'-GTGTGGATGAGTGTGCCATC-3' 5'-CCACCTCCCTACTGCAATC-3'	209–241	60	(CA) _i (GA) _j	In-house (AY680860)
NAK1 A* NAK1 B	5'-GGTAGCCAATGCTGTGGTIT-3' 5'-GCGAGGTCACGAAATGTAT-3'	189–201	60	(CAC) _k ; (CGC) _i ; (CAC) _m (TAC) _n ; (TAT) _o	Nakao et al. (2003, 2007) (AB100031)
M13	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	165 (without the insert)	55	/	Provided by the TOPO TA cloning Kit (Invitrogen)
M13r	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'				

^a Asterisk (*) indicates dye primers.

The amplification reaction was performed in a Biometra thermocycler (Whatman Biometra, Goettingen, Germany), under the following conditions: a pre-amplification step at 94 °C for 13 min, followed by 45 cycles with denaturing at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s and extension at 72 °C for 1 min, and for the final elongation of DNA strands, an ending-extension at 72 °C for 45 min. Size polymorphism of PCR products was studied using an automatic sequencer, type ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Fluorescence signals generated by marked primers were read by colorimetric analysis. Correspondences were automatically established to assess size of the amplified fragments using the Genotyper 3.7 software.

Stability of EmsB electrophoregrams was checked by repeated tests (5 times) on two samples selected randomly from the *E. multilocularis* panel and the standard deviation (σ) was calculated on the genetic distance values between each repetition.

In order to study the origin of the polymorphism, the NAK1 alleles were sequenced. Both strands of PCR products were sequenced using Sanger's method with the Genome Lab DTCS Quick Start kit (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and the primers described above (Table 1), followed by detection with a Beckman CEQ 8000 automaton (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

For doubtful sequences, NAK1 amplification products were studied following the cloning protocol. PCR products were inserted into pCR4-TOPO plasmids, which were transformed into TOP10 *E. coli* cells, using the TOPO TA Cloning Kit for sequencing (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. After 24 h of incubation on Mueller–Hinton medium containing 50 µg/ml kanamycin, the clones obtained were suspended in 200 µl of bi-distilled water. PCR was performed under the same conditions as NAK1 amplification, with 2 µl of the suspended solution and M13/M13r primers, provided in the kit (Table 1). Sequencing reaction was performed on positive PCR products.

2.4. Mitochondrial genotyping by ATPase 6 dehydrogenase

In order to compare the reliability of the microsatellite targets to that of markers traditionally used for genotyping of *E. multilocularis*, the protein-coding gene adenosine triphosphate subunit 6 (*atp6*) was amplified for all samples. This gene exhibits a higher polymorphism than all the other mitochondrial genes, when discriminating between *Echinococcus* spp. (Nakao et al., 2007) and within *E. multilocularis* (Yang et al., 2005). The primers *atp6Em/F* and *atp6Em/R*, defined from the mitochondrial genome (GenBank accession no. AB018440) (Nakao et al., 2002) were designed to amplify a 512 bp fragment. PCR conditions were the same as described above.

2.5. Genotype determination and cladistic analysis

For the EmsB target, electrophoregrams present a series of peaks that correspond to alleles. The presence of peaks and their heights were recorded as previously described (Bart et al., 2006; Knapp et al., 2007). These data were used to distinguish assemblages and clusters by hierarchical clustering analysis, using the Euclidean distance and the UPGMA method (Legendre and Legendre, 1998). Stability of clusters was tested by a multiscale bootstrap resampling ($B = 1000$), resulting in approximately unbiased p -values (Shimodaira, 2002, 2004). Clustering analyses were performed by using the R software (R Development Core Team, 2005) and *pvclust* library (Suzuki and Shimodaira, 2005).

A genetic distance threshold, previously defined by Bart et al. (2006) and Knapp et al. (2007) was applied to the dendrogram to delineate genotypic clusters. This threshold was calculated as the mean of samples no. 500, 501 and 502 (Knapp et al., 2007), which

were obtained from a single strain, maintained *in vivo* in *Meriones unguiculatus* between March 1991 and February 1992 (Knapp et al., 2007), after intraperitoneal metacestode transplantation (Eckert et al., 1983).

Single-locus NAK1 microsatellite alleles were plotted according to fragment analyses and specified for 'homozygote' or 'heterozygote' genotypes.

NAK1 and ATP6 sequences were analyzed using the BioEdit version 5.0.9 software (Hall, 1999) to locate the possible mutations. NAK1 results were compared to the referenced sequences from different origins (GenBank accession no. AB100031 (Japanese isolate), EU044715 (German), EU044717 (Polish) and EU044716 (Swiss)).

3. Results

3.1. Isolation of gravid adult worms

One hundred and forty intact gravid adult worms were isolated from 25 red foxes (part of the collection of 79 *E. multilocularis*-infected foxes). For red foxes with low and medium worm burden ($n = 21$), 5 worms were isolated and for those with a high worm burden ($n = 4$), 10 worms were isolated. Fox no. R03056 presented a high worm burden (18,630 worms), but only 5 worms could be isolated (Table 2). The total parasitic biomass was 175,897 worms.

3.2. Assessment of *E. multilocularis* polymorphism

3.2.1. The tandemly repeated multilocus microsatellite EmsB

EmsB amplification was successful for the entire sample collection. The repeatability of the method was assessed by performing PCR and fragment size analysis 5-fold on isolates R05147-2 and R05151-4. The calculated standard deviation (σ) was 4.4×10^{-3} for R05147-2 and 3.5×10^{-3} for R05151-4, which is in agreement with previous published data (Knapp et al., 2007).

The *E. multilocularis* panel presented two EmsB assemblages, A and B illustrated by electrophoregrams (Fig. 1a). These two assemblages were confirmed by cladistic analysis, which showed a genetic distance of 0.21 between worm samples (Table 2 and Fig. 1a). The genetic distance threshold of 0.08 was applied to the dendrogram and six distinct clusters, or EmsB assemblage profiles (α – ζ in Fig. 1b and Table 2), were identified. Two assemblage profiles (26.4% of the sample collection), belonging to assemblage A, were characterized by an allele at 215 bp, followed by a series of alleles from 225 to 239 bp. The four assemblage B profiles (73.6% of the sample collection) were characterized by a succession of alleles from 225 to 235 bp. Seven foxes harbored worms from both A and B assemblages and 13 foxes harbored worms with at least 2 different assemblage profiles. Two foxes harbored only assemblage A profiles, and 16 foxes harbored only assemblage B profiles (Table 2).

3.2.2. The single-locus microsatellite NAK1

Amplification of the NAK1 target was possible for 125 samples; the 15 non-amplifiable samples were EmsB assemblage B. Three alleles were found, showing three 'homozygote' genotypes (195, 198 and 201 bp) and one 'heterozygote' genotype (198–201 bp) (Table 2 and Fig. 2). Only samples harboring EmsB assemblage A had NAK1 genotype 195 bp, whereas NAK1 genotypes 198 bp and 201 bp were found in both assemblages. The heterozygote genotype (198–201 bp) was found only in worms from fox R05170, which harbored the greatest worm burden (73,380 worms). In this fox, worms presented EmsB assemblage A and B profiles.

To investigate the heterozygote patterns, another 26 gravid worms were selected from fox R05170. For each individual worm,

Table 2
Description and characteristics of the red fox panel and respective parasitic burdens

Code fox	Code region ^a	Sex	Total Em ^b burden	Date of sampling	No. of worms	EmsB assemblages		NAK1 genotypes				
						A	B	195	198	201	198–201	NA ^c
<u>R02030</u>	[55]	F	4,247	24/02/2002	5	0	5 ^δ	0	5	0	0	0
<u>R03056</u>	[08]	F	18,630	10/02/2003	5	0	5 ^δ	0	5	0	0	0
R03061	[08]	F	1,290	09/03/2003	5	0	5 ^α	0	0	0	0	5
R03064	[08]	F	1,797	04/04/2003	5	0	5 ^δ	0	4	0	0	1
R04126	[08]	F	1,230	02/11/2004	5	3 ^{ε:ζ}	2 ^{α:δ}	3	1	0	0	1
R04131	[08]	M	46	19/11/2004	5	0	5 ^{β:δ}	0	5	0	0	0
R04136	[55]	M	30	07/12/2004	5	0	5 ^α	0	0	0	0	5
R04138	[08]	M	190	18/12/2004	5	0	5 ^δ	0	4	0	0	1
<u>R05147</u>	[08]	M	16,510	15/01/2005	10	8 ^ε	2 ^{β:δ}	0	10	0	0	0
<u>R05149</u>	[08]	M	14	30/01/2005	5	3 ^ε	2 ^δ	3	2	0	0	0
R05151	[08]	F	1,430	07/02/2005	5	0	5 ^δ	0	5	0	0	0
R05152	[08]	F	38	13/02/2005	5	0	5 ^{β:δ}	0	3	1	0	1
R05153	[08]	F	2,470	14/02/2005	5	0	5 ^δ	0	5	0	0	0
R05154	[08]	M	4,697	15/02/2005	5	1 ^ε	4 ^β	1	4	0	0	0
R05156	[08]	M	3,522	16/02/2005	5	0	5 ^β	0	5	0	0	0
R05157	[08]	M	420	17/02/2005	5	1 ^ε	4 ^{β:δ}	1	4	0	0	0
R05161	[08]	M	1,820	03/03/2005	5	2 ^ε	3 ^{γ:δ}	2	3	0	0	0
R05163	[08]	F	26	07/03/2005	5	0	5 ^δ	0	5	0	0	0
R05164	[08]	F	18	10/03/2005	5	0	5 ^δ	0	0	5	0	0
R05167	[08]	M	6,520	27/04/2005	5	5 ^{ε:ζ}	0	0	5	0	0	0
R05169	[08]	M	117	04/05/2005	5	0	5 ^{β:δ}	0	4	0	0	1
<u>R05170</u>	[08]	F	73,380	13/05/2005	10	4 ^ε	6 ^{β:δ}	0	0	4	6	0
<u>R05172</u>	[08]	M	4,870	16/05/2005	5	0	5 ^{β:δ}	0	5	0	0	0
<u>R05173</u>	[08]	F	32,520	10/06/2005	10	10 ^{ε:ζ}	0	10	0	0	0	0
R05174	[08]	M	65	13/06/2005	5	0	5 ^δ	0	5	0	0	0

Fox codes underlined represented individuals with high worm burden. α, β, γ, δ, ε, and ζ for EmsB assemblage profiles.

^a Code region: [08] for Ardennes, [55] for Meuse.

^b Em, *E. multilocularis*.

^c NA, no amplification achieved.

the scolex and the gravid segment presented the same EmsB and NAK1 assemblage profiles. For the scolex as well as for the gravid segment, 20 worms presenting EmsB assemblage B profiles harbored the NAK1 heterozygote genotype at 198–201 bp. Five worms presenting EmsB assemblage A profiles were homozygote (NAK1 genotype 201 bp). One single worm presenting an assemblage B profile was homozygote (NAK1 genotype 198 bp).

Sequencing was performed for each NAK1 allele. For the 195-bp allele, 2 samples were studied. Sequencing of the 198-bp allele was done for 5 EmsB assemblage A profile samples and 5 assemblage B profile samples. For the 201-bp allele, 1 EmsB assemblage A profile sample and 2 EmsB assemblage B profile samples were studied. The alignment of the fragments was carried out with referenced sequences from Switzerland, Poland, Japan and Germany (Table 3). Differentiation between the NAK1 alleles was located on the second triplet (CAC) for the French isolates and the reference strains from Switzerland and Germany. The Polish and Japanese reference sequences presented mutations on other triplets (Table 3). For samples with EmsB assemblage A profiles and NAK1 alleles 198 bp or 201 bp, an overlapping was found in the electrophoregrams at nucleotide position 8 in the (CGC) triplet (data not shown), indicated by the letter R (Table 3). The PCR products of samples R05147-3 and R05167-5 (EmsB assemblage A profiles, NAK1 198-bp allele with the succession of motifs: (CAC)₂ (CRC)₁ (CAC)₁₂ (TAC)₇ (TAT)₂) and as a control R05156-3 (EmsB assemblage B profile, NAK1 198-bp allele with the succession of motifs: (CAC)₂ (CGC)₁ (CAC)₁₂ (TAC)₇ (TAT)₂) were studied to better understand the phenomenon of overlapping. For each sample, after the cloning protocol twenty clones were sequenced in order to test for artefact occurrence, which could have produced overlapping in position 8 of the NAK1 fragments. No double signal was detected on the cloned fragments from either EmsB assemblage A or B (data not shown). For R05147-3 and R05167-5, the isolated PCR products presented different numbers of

repetitions for the third motif (CAC)_m ($m = 10-15$) and the fourth motif (TAC)_n ($n = 6-8$). For R05156-3 isolated PCR products, the phenomenon also occurred at same positions ($m = 10-12$; $n = 6-8$).

3.2.3. Mitochondrial genotyping by ATPase 6 dehydrogenase

The DNA from a total of 32 worms was sequenced for the ATP6 target, from the 25 foxes (1 worm per each EmsB assemblage, per fox), and was subsequently examined (Table 4). Thirty sequences presented 100% homology with the reference sequence (AB027557). Only two worms (R05170-16, R05172-3) presented one mutation, and neither the EmsB assemblages nor NAK1 genotypes could be distinguished.

4. Discussion

The aim of our study was to assess the genetic diversity of *E. multilocularis* in a local range by using two recently developed typing tools, EmsB and NAK1, which have been proved to be more discriminant than those previously available (Bretagne et al., 1996; Nakao et al., 2003; Bart et al., 2006; Knapp et al., 2007). However, the *E. multilocularis* genome is characterized by a restricted genetic variation (Haag et al., 1997; Bart et al., 2003), which has been interpreted as resulting from the recent spread of the parasite from the Arctic to Subarctic and temperate regions (Romig et al., 2006). Our results obtained with the ATP6 mitochondrial target confirmed the genetic homogeneity of the sampled worms. However, results also show that, by using appropriate tools, the genetic diversity of *E. multilocularis* can be described, even within a restricted geographical area such as the one in the present study. We found four distinct genotypes using the NAK1 target, and 6 clusters or assemblage profiles using EmsB, even though it was not possible to exactly match the EmsB assemblage profiles with the NAK1 genotypes. This may be due to the high degree of similarity between some of the EmsB profiles obtained in our study. The

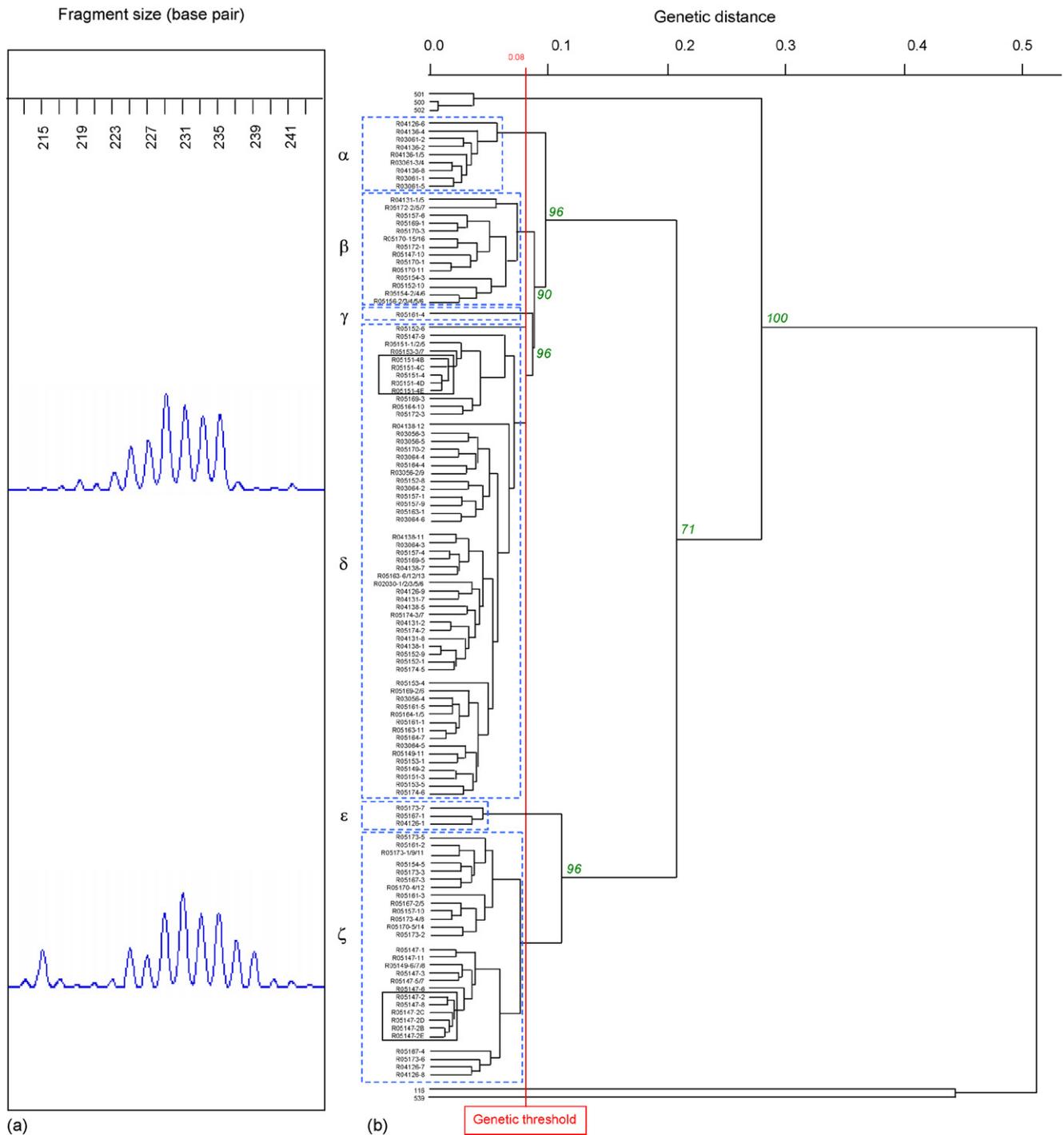


Fig. 1. (a) Electrophoregrams of EmsB loci, using automatic sequencer ABI Prism 3100. The main profiles are shown in two electrophoregrams (Assemblage A lower electrophoregram; Assemblage B: upper electrophoregram). Peaks less than 10% of the highest peak were considered as artifacts. (b). Dendrogram drawn from EmsB amplification data, by hierarchical cluster analysis. Approximately unbiased *p*-values in italics (numbers on nodes, in per cent), calculated with a multiscale bootstrap (*B* = 1000). Samples discriminated by a genetic distance of less than 0.025 were pooled, to simplify the tree. Sample 116 from a Mauritanian camel and sample 539 from an Algerian sheep were *E. granulosus* samples and were included as an out-group control. Samples 500, 501 and 502 (strain repeatedly maintained *in vivo* in *Meriones unguiculatus* by serial intraperitoneal passages) were used to calculate the genetic threshold. The 6 dotted-line boxes refer to discriminate clusters (α , β , γ , δ , ϵ and ζ). The solid-line boxes represent the 5-fold repetitions of R05147-2 and R05151-4 samples.

different clusters obtained for a given EmsB assemblage were separated by a slight genetic distance (Fig. 2). This is in contrast with a previous work by Knapp et al. (2007), in which EmsB assemblage profiles were separated by a greater distance and different regional profiles could thus clearly be distinguished. However, in this previous paper, the study area was much larger, including samples from Europe, Asia and North America.

In our study it was possible, by the sequencing of isolated NAK1 PCR products, to describe fragments with different compositions of repeated motifs. To our knowledge, this is the first description of a size homoplasy which occurred in NAK1 sequences; the event occurred for the NAK1 195-bp allele in the French samples and the Japanese sequence AB100031, and for the 198-bp allele in the French samples and Polish sequence EU044717 (Table 3). The

Heterozygosity was detected for only one fox (R05170), which presented the highest parasitic burden. In order to further investigate the cross-fertilization hypothesis, we carried out a genetic study on 26 new worms. DNA, extracted from scoleces and proglottids, was amplified separately. No difference was observed between scolex DNA and egg-containing proglottid DNA. Mating could have occurred previously during colonization of a fox intestine by worms harboring different NAK1 genotypes, leading to recombinations transmitted and multiplied during the parasite cycle. This hypothesis could explain what we observed in fox R05170. It should also be kept in mind that a double peak detected with fragment size analysis does not categorically demonstrate a mating event. The mutation of an allele on one strand, which occurs during the asexual stage, followed by polyembryony, could lead to the production of a large population of clones formed from a single mutation, and transmitted to the fox (Smyth and Smyth, 1964). A possible surface contamination of the scolex by male gametes could also be responsible for a bias in the results, but our washing procedure (each worm was washed 3 times) makes this hypothesis unlikely. Even though mixed parasite populations do occur frequently in foxes, we only found one fox in the sample collection which harbored worms presenting a possible heterozygote pattern. Cross-fertilization, in any case, seems to be a rare event in *E. multilocularis*, certainly due to co-habitation of different developmental stages, and our findings provide lower scores than previously described (Haag et al., 1998; Nakao et al., 2003). This raises the question of the frequency of sexual exchanges within the genus *Echinococcus* and of the viability of heterozygote parasites throughout generations.

In conclusion, our results obtained with EmsB and NAK1 show that they are complementary targets and their combined use produces a relevant tool. EmsB was able to show infections with parasites of multiple assemblage profiles in foxes, but was not efficient in detecting heterozygosity. Because of the rarity, or perhaps the absence of true genetic recombinations, the EmsB target could be driven by clonal transmission, and thus remains stable over time. This relevant tool could be used at different spatio-temporal scales, in assessment of the distance migration, the implication of peculiar intermediate species on the life cycle or also in parasite colonization patterns in hosts, to study the *E. multilocularis* transmission processes. These results underline the complementary usefulness of microsatellite targets for subtyping related isolates which are geographically close.

Acknowledgements

We are very grateful to the following people for their technical help and support: Shumei Ma, Saratou Gerard and Marie-Louise Glowatzki.

This work was financially supported by the PPF Program of the University of Franche-Comté (Programme Pluri-Formations “Milieux naturels, milieux anthropisés”) and by the Swiss National Science Foundation (grant no. 31-111780/1).

We are grateful to Lois Rose for editorial assistance.

References

- Artois, M., 1989. Le Renard roux (*Vulpes vulpes*, Linnaeus, 1758). In: Artois, M., Delatre, P. (Eds.), *Encyclopédie des carnivores de France*. Nort/Erdre: SFPEM, 90 pp.
- Bart, J.M., Breyer, I., Gottstein, B., Romig, T., Piarroux, R., 2003. Development of molecular tools to explore genetic diversity in *Echinococcus multilocularis*. *Helminthologia* 40, 117–121.
- Bart, J.M., Knapp, J., Gottstein, B., El-Garch, F., Giraudoux, P., Glowatzki, M.L., Berthoud, H., Maillard, S., Piarroux, R., 2006. EmsB, a tandem repeated multi-loci microsatellite, new tool to investigate the genetic diversity of *Echinococcus multilocularis*. *Infect. Genet. Evol.* 6, 390–400.
- Bresson-Hadni, S., Piarroux, R., Bartholomot, B., Miguet, J.P., Manton, G., Vuitton, D., 2005. Echinococcosse alvéolaire—Alveolar echinococcosis. *EMC—Hépatogastroentérologie* 2, 86–104.
- Bretagne, S., Assouline, B., Vidaud, D., Houin, R., Vidaud, M., 1996. *Echinococcus multilocularis*: microsatellite polymorphism in U1 snRNA genes. *Exp. Parasitol.* 82, 324–328.
- Eckert, J., Thompson, R.C., Mehlhorn, H., 1983. Proliferation and metastases formation of larval *Echinococcus multilocularis*. I. Animal model, macroscopical and histological findings. *Z. Parasitenkd.* 69, 737–748.
- Eckert, J., Conraths, F.J., Tackmann, K., 2000. Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? *Int. J. Parasitol.* 30, 1283–1294.
- Giraudoux, P., 1991. Utilisation de l'espace par les hôtes du ténia multiloculaire (*Echinococcus multilocularis*): conséquences épidémiologiques. PhD Thesis. University of Bourgogne, 90.
- Guislain, M.H., Raoul, F., Giraudoux, P., Terrier, M.E., Froment, G., Ferté, H., Poule, M.L., 2008. Ecological and biological factors involved in the transmission of *Echinococcus multilocularis* in the French Ardennes. *J. Helminthol.*, accepted.
- Haag, K.L., Zaha, A., Araujo, A.M., Gottstein, B., 1997. Reduced genetic variability within coding and non-coding regions of the *Echinococcus multilocularis* genome. *Parasitology* 115 (Pt 5), 521–529.
- Haag, K.L., Araujo, A.M., Gottstein, B., Zaha, A., 1998. Selection, recombination and history in a parasitic flatworm (*Echinococcus*) inferred from nucleotide sequences. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 93, 695–702.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Kern, P., Bardonnet, K., Renner, E., Auer, H., Pawlowski, Z., Ammann, R.W., Vuitton, D.A., 2003. European echinococcosis registry: human alveolar echinococcosis, Europe 1982–2000. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 343–349.
- Knapp, J., Bart, J.M., Glowatzki, M.L., Ito, A., Gerard, S., Maillard, S., Piarroux, R., Gottstein, B., 2007. Assessment of microsatellite polymorphism for improving the spatial distribution tracking of *Echinococcus multilocularis*. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2943–2950.
- Legendre, P., Legendre, L., 1998. *Numerical Ecology*. 2nd English edition. Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- Nakao, M., Yokoyama, N., Sako, Y., Fukunaga, M., Ito, A., 2002. The complete mitochondrial DNA sequence of the cestode *Echinococcus multilocularis* (Cyclophyllidae: Taeniidae). *Mitochondrion* 1, 497–509.
- Nakao, M., Sako, Y., Ito, A., 2003. Isolation of polymorphic microsatellite loci from the tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Infect. Genet. Evol.* 3, 159–163.
- Nakao, M., McManus, D.P., Schantz, P.M., Craig, P.S., Ito, A., 2007. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* 134, 713–722.
- Piarroux, M., Bresson-Hadni, S., Capek, I., Knapp, J., Watelet, J., Dumortier, J., Abergel, A., Minello, A., Gérard, A., Beytout, J., Piarroux, R., Kantelip, B., Delabrousse, E., Vaillant, V., Vuitton, D., FrancEchino, P.L.R., 2006. Surveillance de l'échinococcosse alvéolaire en France: bilan de cinq années d'enregistrement 2001–2005. *BEH* no. 27–28/2006, 206–208.
- R Development Core Team, 2005. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.r-project.org>.
- Raoul, F., Deplazes, P., Nonaka, N., Piarroux, R., Vuitton, D.A., Giraudoux, P., 2001. Assessment of the epidemiological status of *Echinococcus multilocularis* in foxes in France using ELISA coprotests on fox faeces collected in the field. *Int. J. Parasitol.* 31, 1579–1588.
- Rausch, R.L., 1995. In: *Echinococcus, hydatid disease*, Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J. (Eds.), *Life-cycle Patterns and Geographic Distribution of Echinococcus Species*. CAB International, Wallingford, Oxon, pp. 89–134.
- Romig, T., Dinkel, A., Mackenstedt, U., 2006. The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol. Int.* 55 Suppl., S187–S191.
- Shimodaira, H., 2002. An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. *Syst. Biol.* 51, 492–508.
- Shimodaira, H., 2004. Approximately unbiased test of regions using multistep-multiscale bootstrap resampling. *Ann. Stat.* 32, 2616–2641.
- Shinde, D., Lai, Y., Sun, F., Arnheim, N., 2003. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. *Nucleic Acids Res.* 31, 974–980.
- Smyth, J.D., Smyth, M.M., 1964. Natural and Experimental Hosts of *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*, with Comments on the Genetics of Speciation in the Genus *Echinococcus*. *Parasitology* 54, 493–514.
- Suzuki, R., Shimodaira, H., 2005. pvclust: hierarchical clustering with *p*-values. R package version 1.0-3 <http://www.is.titech.ac.jp/~shimo/prog/pvclust/>.
- Thompson, R.C., Kapel, C.M., Hobbs, R.P., Deplazes, P., 2006. Comparative development of *Echinococcus multilocularis* in its definitive hosts. *Parasitology* 132, 709–716.
- Vuitton, D.A., Zhou, H., Bresson-Hadni, S., Wang, Q., Piarroux, M., Raoul, F., Giraudoux, P., 2003. Epidemiology of alveolar echinococcosis with particular reference to China and Europe. *Parasitology* 127 Suppl., S87–S107.
- Yang, Y.R., Rosenzvit, M.C., Zhang, L.H., Zhang, J.Z., McManus, D.P., 2005. Molecular study of *Echinococcus* in west-central China. *Parasitology* 131, 547–555.

J. M. Bart · S. Morariu · J. Knapp · M. S. Ilie ·
M. Pitulescu · A. Anghel · I. Cosoroaba · R. Piarroux

Genetic typing of *Echinococcus granulosus* in Romania

Received: 23 August 2005 / Accepted: 2 September 2005 / Published online: 17 November 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract In Romania, cystic echinococcosis is endemic and affects, besides humans, various animal species including sheep, cattle, and swine. As yet, no molecular-genetic typing has been carried out to clearly identify the putative strains being transmitted there. Parasite samples (protoscoleces or germinal layers) were collected from infected intermediate hosts and subsequently analyzed by comparing the PCR-amplified DNA sequences of three targets: one nuclear (*BG1/3*) and two mitochondrial (*cox1* and *nadI*). Three strains were identified with the mitochondrial sequences: (i) the common sheep strain (G1) which circulates between sheep and cattle and is infective for humans, (ii) the Tasmanian sheep strain (G2) infecting sheep and cattle, and (iii) the pig strain (G7) predominantly found in swine. To our knowledge, this is the first report which demonstrates the occurrence of the Tasmanian sheep strain in cattle and the sympatric occurrence of these three strains (G1, G2, and G7) in Europe.

Introduction

Echinococcus granulosus, the cestode responsible for cystic echinococcosis (CE), can be found worldwide. Several

molecular studies performed in some of the main foci (Australia, South America, Africa, Asia, the Middle East) of CE have found the sheep strain (G1 genotype) to be the most widely spread strain (McManus and Thompson 2003). In the European focus, this strain, highly infective for humans (Eckert and Thompson 1997), has recently been identified genetically in Bulgaria (Breyer et al. 2004). However, studies dealing with strain typing of hydatid cysts extracted from pigs and humans in Eastern Europe have demonstrated the presence of the pig strain (G7 genotype) (Kedra et al. 1999; Snabel et al. 2000; Turcekova et al. 2003). Another genotype (G9) was found in Poland by Scott, but it has never been detected in other foci (Scott et al. 1997).

In Romania, CE poses health, ecological, and economic problems (Malczewski 2002). Livestock involved in the transmission pattern in this country includes sheep (*Ovis aries*), cattle (*Bos taurus*), and swine (*Sus scrofa*). Field data collected in Timis District slaughterhouses from 1998 to 2003 showed active transmission in these hosts (Morariu 2004). For sheep, 674 carcasses out of the 11,543 that were checked were positive (5.83%). For cattle, 8,783 carcasses out of 39,272 were positive (22.36%). For pigs, 93,276 carcasses out of 2,157,600 were positive (4.32%) (Morariu 2004). The fertility rate was 10% for cattle, 30% for sheep, and 60% for swine. These data confirmed the hyperendemic circulation of *E. granulosus* in Romania. A survey performed throughout Romania revealed prevalences ranging between 33 and 40% in both sheep and cattle (Olteanu et al. 1997). The most recent studies on CE in humans having undergone surgery in the hospitals in three of the districts included in our study (Timiș, Arad, Caras Severin) reported 505 adult cases from 1985 to 1995 (Iacobiciu et al. 1996). A survey carried out in the Caras Severin district showed that the surgical incidence rate reached 8.63/100,000 inhabitants (Iacobiciu et al. 2003). In 2000, Junie et al. reported 250 surgical CE cases between 1994 and 1999, especially in children. Investigations performed with other diagnostic tools (ELISA or imaging examination) indicated slightly higher prevalences (Malczewski 2002).

Characterization of the putatively *E. granulosus* strain(s) involved in the epidemiology of CE in Romania could

J. M. Bart (✉) · J. Knapp · R. Piarroux
SERF Team (Equipe Santé Environnement Rural
Franche-Comté), Parasitology Department,
College of Medicine of Besançon,
19 rue Ambroise Paré,
25000 Besançon, France
e-mail: jmbart2000@yahoo.fr
Tel.: +33-3-63082236
Fax: +33-3-63082232

S. Morariu · M. S. Ilie · I. Cosoroaba
Parasitology Department,
College of Veterinary Medicine,
Timisoara, Romania

M. Pitulescu · A. Anghel
Biochemistry Department,
Victor Babes University of Pharmaceutical Medicine,
Timisoara, Romania

provide useful information about the parasite transmission patterns. Morphological studies carried out on adult *E. granulosus* of sheep, cattle, and swine origin have defined three distinct strains for each of these hosts (Morariu 2000; Morariu et al. 1999). But because parasite morphology is plastic, results must be corroborated by DNA studies, which are not influenced by the host environment (Hobbs et al. 1990). The aim of our study was to determine, by molecular-genetic strain typing, which *E. granulosus* genotypes are present in intermediate hosts in Romania. For the analysis, we used one nuclear (*BG1/3*) and two mitochondrial (*cox1* and *nad1*) sequences: these markers have already been successfully applied for identifying *E. granulosus* strains in other areas (Bardonnet et al. 2003).

Materials and methods

Sample collection

During the summer of 2003, a total of 36 hydatid cysts were collected in four different districts in western Romania (Fig. 1). They were all checked under a microscope for the presence of parasitic fertile elements (protoscolexes and hooks) in the respective hydatid fluids. Cyst characteristics are shown in Table 1. All samples (protoscolexes and germinal layers) were preserved in 70% ethanol prior to laboratory processing.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from protoscolexes obtained from individual hydatid cysts using the High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) based on Proteinase K digestion. For nonfertile lesions (i.e., cysts without protoscolexes), three cycles of "freezing–defreezing" at -20°C were performed to separate the germinal layer from the laminated layer. The ger-

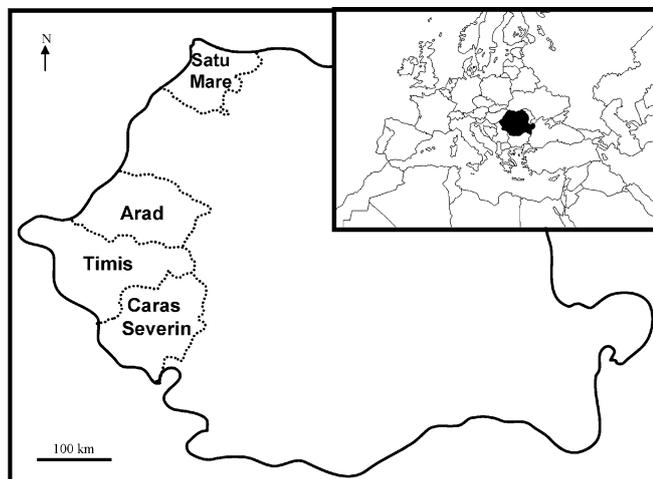


Fig. 1 Study area and origin of samples

Table 1 Main characteristics of the *E. granulosus* isolates analyzed in this study

Sample number	Host	Origin	Parasited organ	Fertility ^a
1	Sheep	Timis	Liver	+
2	Sheep	Timis	Liver	+
3	Sheep	Timis	Liver	+
4	Sheep	Timis	Lung	+
5	Sheep	Timis	Lung	+
6	Sheep	Timis	Lung	+
7	Cattle	Timis	Liver	–
8	Cattle	Timis	Liver	–
9	Cattle	Timis	Liver	–
10	Cattle	Timis	Liver	–
11	Cattle	Timis	Liver	–
12	Cattle	Timis	Liver	–
13	Cattle	Timis	Lung	–
14	Cattle	Timis	Lung	–
15	Cattle	Timis	Lung	–
16	Cattle	Satu Mare	Liver	–
17	Cattle	Satu Mare	Liver	–
18	Cattle	Satu Mare	Liver	–
19	Cattle	Satu Mare	Liver	–
20	Cattle	Satu Mare	Liver	–
21	Cattle	Satu Mare	Liver	–
22	Cattle	Caras Severin	Liver	–
23	Cattle	Arad	Liver	–
24	Human	Arad	Liver	–
25	Human	Timis	Liver	–
26	Pig	Timis	Liver	+
27	Pig	Satu Mare	Liver	+
28	Pig	Satu Mare	Liver	–
29	Pig	Satu Mare	Liver	–
30	Pig	Satu Mare	Liver	+
31	Pig	Satu Mare	Liver	–
32	Pig	Caras Severin	Liver	+
33	Pig	Caras Severin	Liver	+
34	Pig	Arad	Liver	+
35	Pig	Arad	Liver	–
36	Pig	Timis	Lung	–

^aPresence of protoscolexes

minal layers were subsequently minced and broken up into three consecutive liquid nitrogen baths. Each sample was incubated in lysozyme at 37°C , for 1 h. Then SDS was added to Proteinase K and lysis buffer and incubated overnight at 55°C . Manufacturer's recommendations were carefully followed for the last part of the extraction process.

Molecular analysis

Each sample was amplified with three targets: *cox1* (Bowles et al. 1992), *nad1* (Bowles and McManus 1993), and *BG1/3* (Gottstein and Mowatt 1991). For the mitochondrial targets, some modifications in primer sequences were made to increase the specificity of the PCRs. The new primers EgCOI

1: 5'-TTT TTT ggC CAT CCT gAg gTT TAT-3'; EgCOI 2: 5'-TAA CgA CATA AAC ATA Atg AAA ATG-3', and EgNDI 1: 5'-AgT CTC gTA Agg gCC CTA ACA-3'; EgNDI 2: 5'-CCC gCT gAC CAA CTC TCT TTC-3', derived from the original primers, were redesigned from the complete mitochondrial genome G1 (GenBank number: AF297617). They presented one to six different nucleotides compared to initial primers. The PCR programs contained 40 cycles with, for each cycle, a denaturation step (30 s at 94°C), a hybridization step (30 s at 60°C for EgCOI 1/2 and 56°C for EgNDI 1/2 and *BG1/3*), and an elongation step (30 s at 72°C). For each PCR reaction, 2 µl of genomic DNA was mixed with 2.5 µl PCR buffer 10× (Sigma, St. Louis, MO, USA), 20 µM dNTP (dNTPset, MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), 20 pmol of each primer (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Scotland), and 0.5 U *Taq* polymerase (REDTaq-Polymerase) in a 25-µl final volume. After confirmation of the amplification in 1.5% agarose gel, 5 µl of each amplified fragment was purified using 2 µl ExoSAP-IT enzyme (Amersham Pharmacia Biotech Europe, Orsay, France). The purified DNA was then sequenced using the DYEnamic ET terminator cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiberg, Germany).

Sequence analysis

The sequences were manually checked and then aligned using the BioEdit software (Hall 1999).

The *cox1* and *nad1* sequences obtained for each genotype were added, and a dendrogram was calculated with "fastDNAm1" software (version 1.2.2, January 3, 2000) (Felsenstein 1981; Olsen et al. 1994). Subsequently, TreeView (Page 1996), a drawing software, was used to design the tree.

Results

DNA extraction

For sterile cysts, DNA was extracted from germinal layers. The problem of inhibition, which was occasionally en-

countered with these cysts, was solved by discarding the laminated layer which is composed of polysaccharides that can inhibit PCR reactions (Kamenetzky et al. 2000). The three different targets were applied successfully on these DNA samples, proving that DNA extraction was of good quality.

Molecular analysis

Nuclear target

A band of 298 bp was amplified for all the samples. Two main genotypes were identified by sequencing this band. The first genotype included the 26 human, sheep, and cattle samples. Three samples (15, 25 and 26) had a 100% homology with the "sheep strain" reference sequence taken from an Algerian sheep isolate (GenBank reference: AF408684). The rest of the 23 isolates were separated into three subgenotype groups with one (AY686554 and AY686555) to two (AY686556) nucleotide substitutions (Table 2). The second genotype (named "pig strain") included 8 swine samples presenting 100% homology with a sequence previously obtained from isolates collected in Mauritanian dromedaries (AF408685). One isolate from Timis (sample 36, AY686557) and one from Arad (sample 34, AY686558) exhibited, respectively, a T and a T/C at the 205th nucleotide position, instead of a single C, as in the other swine samples. As in camel samples from a previous study (Bardonnet et al. 2003), a second band at 165 bp was observed for all the swine isolates. Both strains presented a 98.3% homology.

mt targets

The redesign of *E. granulosus*-specific primers (EgCOI 1/2 and EgNDI 1/2) due to the publication of the complete mitochondrion sequence (Le et al. 2002) improved the quality of the sequences, especially for the G1 genotype isolates sequenced for the *nad1* fragment. This improved complementarity between the DNA matrix, and the primers was demonstrated by the higher annealing temperature of the *nad1*-PCR (from 45 to 56°C).

Table 2 Comparison of the *BG1/3* sequences obtained from the intermediate hosts studied with a "sheep strain" reference sequence (GbR 408684)

Number of isolates	Hosts	Origin	<i>BG1/3</i> GbR 408684							GenBank (variant's name)	
			57	88	103	152	195	205	215		252
			T	G	C	T	T	T	C	A	
2	Human #24/25	T									AF408684 (SS) ^a
1	Cattle #15	T									
6	Sheep	T								T	AY686554 (SSA) ^a
14	Cattle	T/SM/CS/A								T	
1	Cattle #11	T				C					AY686555 (SSB) ^a
1	Cattle #16	SM				C					
1	Cattle #14	T					A		G		AY686556 (SSC) ^a
8	Pig	SM/CS/A		A	T		C	C	T		AY408685 (PS) ^a
1	Pig #34	A		A	T		C	C/T	T		AY686558 (PSA) ^a
1	Pig #36	T		A	T		C		T		AY686557 (PSB) ^a

^aSS Sheep strain, PS Pig strain (A, B and C are variants)

cox1

Nucleotide sequences of the mt *cox1* gene were obtained for all 36 *E. granulosus* isolates (Fig. 2a and 3). In a cluster containing the 26 human, sheep, and cattle isolates, two strains were identified. Twelve cattle and sheep isolates had a 100% homology with the common sheep strain (G1 genotype, AF297617). Three isolates, two human (G1 A/C, AY686564/65), and one cattle (G1B, AY686562) produced one or two nucleotide differences when compared to the above G1 genotypic sequence. Seven cattle and sheep isolates exhibited a genotype (AY686559) presenting a 100% homology with the Tasmanian strain (G2 genotype, M84663). Three isolates, two cattle (G2A/C, AY686561/63), and one sheep (G2B, AY686560) produced one or two differences when compared to the above G2 genotypic sequence. The G1 and G2 strains were separated from two to three nucleotide variations. A third strain was detected among the 10 cysts extracted from swine. The sequences were exactly identical to the pig strain (G7 genotype, AF458876) for 7 isolates. The two pigs from Caras Severin exhibited the same mutation (G7B, AY686567). A pig from Satu Mare had a T base instead of a G at the 307th position (G7A, AY686566). The genotypes G1/G2 and G7 presented a 92% homology.

nad1

Nucleotide sequences of the mt *nad1* gene were obtained for the 36 *E. granulosus* isolates (Fig. 2b and 3). As for the *cox1* gene, the same 12 cattle and sheep isolates and 1 human isolate had a 100% homology with the common domestic sheep strain (G1 genotype, AF297617). The other human and cattle samples (AY686569) had one mutation when compared to the G1 genotype. The rest of the 10 cattle and sheep isolates (AY686568) had the same Tasmanian strain (G2 genotype, AJ237633). It presented two mutations when compared to the G1 genotype. The third genotype found was identical in the 10 swine samples. Its sequence presented a 100% homology with the *nad1* sequence characterizing the pig strain (G7 genotype, AJ241223). Genotypes G1/G2 and G7 presented an 85% homology.

To synthesize the mitochondrial data, the sequences obtained for the *cox1* and *nad1* genes were cumulated (812 bp in total). Fig. 3 shows the genetic distances between the eight G1/G2 and the three G7 haplotypes thus generated. With the tree, we were able to distinguish the G1 genotype from the G2 genotype, both differing from four to five nucleotides.

Discussion

Above, we have presented data obtained from mitochondrial and nuclear markers investigated on *E. granulosus* isolates collected in West Romania. The mitochondrial results demonstrated the presence of three *E. granulosus* strains: the common sheep strain (G1), the Tasmanian sheep

strain (G2), and the pig strain (G7). This is the first time to our knowledge that these three genotypes, living in sympatry, have been genetically characterized in Central and Eastern Europe.

The common sheep strain (G1) was detected in the sheep and cattle samples collected in the four districts studied (Timis, Satu Mare, Arad, and Caras Severin). This strain is implicated in human CE cases: two human cysts typed identically. More data from patients will be needed to clarify the role of this strain in the epidemiology of human CE. The presence of the sheep strain in Eastern Europe has been recently confirmed genetically in several intermediate and definitive hosts in Bulgaria (Breyer et al. 2004), a country bordering Romania.

The Tasmanian sheep strain (G2) was found in cattle and sheep collected from Timis and Arad slaughterhouses. This G2 genotype was detected for the first time in sheep from the state of Tasmania in Australia (Bowles et al. 1992). More recently, this strain has been identified in humans and sheep in the Tucuman Province in Argentina (Rosenzvit et al. 1999). However, this is the first time that this strain has been found in cattle isolates. Further studies should be carried out to identify the precise origin of this strain. Import/export of living animals (especially of sheep) between Europe and Australia may be a factor in explaining the occurrence of this strain on both continents (Draganescu 1997).

The pig strain (G7) was found in all the pigs in our study. Molecular analysis performed by several authors in Eastern European countries such as Poland, the Slovak Republic, and Ukraine, showed the presence of this genotype in swine (Kedra et al. 1999; Scott et al. 1997; Snabel et al. 2000; Turcekova et al. 2003). This strain was also found in Castor fiber, wild boar and cattle (Kedra et al. 1999; Kedra et al. 2000; Turcekova et al. 2003).

Given the restrictive number of human samples available for our study, we could not detect G7 in patients. However, its involvement in human CE has been confirmed by several authors (Pawlowski and Stefaniak 2003; Turcekova et al. 2003).

As in other studies performed in South America and North Africa (Bart et al. 2004; Haag et al. 2004; Kamenetzky et al. 2002), mitochondrial microvariants or haplotypes were found. In the present study, they were specific for the Romanian focus and were detected for the three G1, G2, and G7 genotypes. These mutations were not found elsewhere with the BLAST search. Due to the low number of samples, no relationship could be drawn between these haplotypes and biological factors such as infectivity, antigenicity, virulence or sensitivity to treatment, or geographic origin.

When comparing mitochondrial and nuclear results, there are some discrepancies which require explanation and discussion. In mitochondrial analyses, the majority of the G1 haplotypes belonged to sheep strain A variant (10 out of 12 samples), whereas the variants found with the nuclear *BG1/3* target were more complex (SSA, SSB, and SSC) and thus did not match those of the mitochondrial haplotypes. As can be seen in Table 3, the G1 samples (identified by mtDNA) were divided into three different sheep strain

nuclear genotypes (SS, SSA, and SSB). The same trichotomy occurred for the G2 samples (divided among SS, SSA, and SSC). Conversely, the “sheep strain A” samples belong to six mitochondrial haplotypes (G1, G1B, G2, G2A, G2B, and G2C). Thus, the Tasmanian strain could not be distinguished from other sheep strains with the nuclear data. The failure to separate G1 from G2 with the nuclear marker is in agreement with the findings of other studies that failed to discriminate between them using nuclear markers such as MDH, ITS1, or TREG (Kamenetzky et al. 2002; Rosenzvit et al. 1999). The inconsistency between nuclear and mitochondrial DNA data has been well documented for gonochoric organisms (Arnaud-Haond et al. 2003; Shaw 2002;

Boissinot and Boursot 1997). The most likely explanation is interspecific hybridization (Lemaire et al. 2005). For hermaphrodite organisms like *Echinococcus*, cross-fertilization occurs less frequently, but this could explain the nuclear rearrangements: They do not exist for the mitochondrial genome because of its clonal heredity.

In the countries which belonged to or were under control of the former Soviet Union, CE in humans is now described as a reemerging disease (Shaikenov et al. 2003; Torgerson and Budke 2003). In Bulgaria, due to the decrease in control programs and the change in husbandry practices, human and animal echinococcosis has reemerged in recent years (Todorov and Boeva 1999). In Kazakhstan and

Fig. 2 Mitochondrial nucleotide sequence alignments for the *E. granulosus* Romanian isolates analyzed in the study. Partial *cox1* (a) and *nad1* (b) sequences were organized according to the haplotypes shown in Fig. 3. *E.m.* corresponds to *E. multilocularis* mitochondrial complete genome (AB018440). *G6* corresponds to *E. granulosus* camel strain (AF408689 for *nad1* fragment and AF408687 for *cox1* fragment)

A

G1	1	TTTGGTATAA	TTAGTCATAT	TTGTTTGGAGT	ATTAGTGCTA	ATTTTGTATGC	GTTTGGGTTTC	TATGGGTTGT	TGTTTGCTAT
G1A	1
G1B	1T
G1C	1T
G2	1T
G2A	1T
G2B	1T
G2C	1GT
G7	1G.TGTGTTTT
G7A	1G.TGTGTTTT
G7B	1G.TGTGTTTT
G6	1G.TGTGTTTT
E.m	1AAGTT
G1	81	GTTTTCATATA	GTGTGTTTGG	GTAGCAGGGT	TTGGGGTCAT	CATATGTTTA	CTGTTGGGTT	GGATGTGAAG	ACGGCTGTTT
G1A	81
G1B	81
G1C	81
G2	81
G2A	81
G2B	81
G2C	81
G7	81ATTAAAT
G7A	81ATTAAAT
G7B	81ATTAAAT
G6	81ATTAAAT
E.m	81AGTTG
G1	161	TTTTTACGCTC	TGTTACTATG	ATTATAGGGG	TTCTACTGG	TATAAAGGTG	TTTACTTGGT	TATATATGTT	GTTGAATTCC
G1A	161C
G1B	161
G1C	161
G2	161
G2A	161G
G2B	161G
G2C	161
G7	161TTGA
G7A	161TTGA
G7B	161TCGA
G6	161TGA
E.m	161TGTGGC
G1	241	AGTGTTAATG	TTAGTGATCC	GGTTTTGTGA	TGGGTTGTTT	CITTTATAGT	GTTGTTTACG	TTTGGGGGAG	TTACGGGTAT
G1A	241G
G1B	241
G1C	241
G2	241C
G2A	241C
G2B	241
G2C	241C
G7	241ACTGATAC
G7A	241ACTGATAC
G7B	241ACTGATAC
G6	241ACTGATAC
E.m	241AAAGTAGAT
G1	321	AGTTTTGCTC	GCTTGTGTGT	TAGATAATAT	TTTGCATGAT	ACTTGGTTTG	TGGTGGCT
G1A	321
G1B	321
G1C	321
G2	321
G2A	321
G2B	321
G2C	321
G7	321GGA
G7A	321GGA
G7B	321GGA
G6	321GGA
E.m	321AGGACA

Fig. 2 (continued)

B

G1	1	GAGGTTTGCT	GATCTATTGA	AGTTGGTAAT	TAAGTTTAAG	TGTTTTTACT	TCCAAAGTCG	TAGGTATGTT	GGTTTGTITG
G1A	1
G1B	1
G1C	1
G2	1G.
G2A	1G.
G2B	1G.
G2C	1G.
G7	1C	...T.G...	...A...	AA.....	...T.G...A...
G7A	1C	...T.G...	...A...	AA.....	...T.G...A...
G7B	1C	...T.G...	...A...	AA.....	...T.G...A...
G6	1C	...T.G...	...A...	AA.....	...T.G...A...
E.m	1	...A.....	...T.G.A.	...A.G.	C.....	AA.....	...T.G...A...G.
G1	81	GTGTTGIGTT	ATTAATGGCT	TTGGTGATG	TTTATTCATT	TATTTATGGT	AGATATTATA	GAGCTAGTTA	TAGAGGCCTC
G1A	81
G1B	81C...
G1C	81C...
G2	81
G2A	81
G2B	81
G2C	81
G7	81	...T....	G..G.A.T.	...TG.G.	.G....G.T....	...TATG..T
G7A	81	...T....	G..G.A.T.	...TG.G.	.G....G.T....	...TATG..T
G7B	81	...T....	G..G.A.T.	...TG.G.	.G....G.T....	...TATG..T
G6	81	...T....	G..G.A.T.	...TG.G.	.G....G.T....	...TATG..T
E.m	81	.C..T.T.	G....AAT.	...T...A	A....T.T.T.....	..ATA.T..T
G1	161	TCCGTTGTTG	GGTTTTTGGC	TGCCGCCAGA	ACATCTAGGT	ATTCTTTGTT	GTGTACTGGT	TGGGGTGGTT	ACAACAATTA
G1A	161
G1B	161
G1C	161
G2	161
G2A	161
G2B	161
G2C	161
G7	161	.T....A.	A....A.	...TT.T.	..TT....	...C....A...	...T.G...
G7A	161	.T....A.	A....A.	...TT.T.	..TT....	...C....A...	...T.G...
G7B	161	.T....A.	A....A.	...TT.T.	..TT....	...C....A...	...T.G...
G6	161	.T....A.	A....A.	...TT.T.	..TT....	...C....A...	...T.G...
E.m	161	.A.A....	...A....	..TT.T..T	..TT....	...G....A...	...T.A...
G1	241	TTCATTTTTA	AGTCCGGTTC	GATGTGCTTT	TGGATCTGTT	AGGTTTGAGG	CTTGTITTIAT	GTGTGTGGTG	ATTTTTTGTG
G1A	241
G1B	241
G1C	241
G2	241
G2A	241
G2B	241
G2C	241
G7	241	...T....T....	...T....	...C....
G7A	241	...T....T....	...T....	...C....
G7B	241	...T....T....	...T....	...C....
G6	241	...T....T....	...T....	...C....
E.m	241	...G....	...T..T.G....A.A....	...T....
G1	321	CTTTGTGTAG	TTGTAGGTAT	AAITTAATTG	ATTTTATATTA	TAAT'IGTTGA	TTAAGTTTGT	TATTAATTTCC	ATTAATTTAT
G1A	321
G1B	321
G1C	321
G2	321
G2A	321
G2B	321
G2C	321
G7	321	...A..CT.	...G....G..AC..G	...G....GA.	...C....
G7A	321	...A..CT.	...G....G..AC..G	...G....GA.	...C....
G7B	321	...A..CT.	...G....G..AC..G	...G....GA.	...C....
G6	321	...A..T.	...G....G..AC..G	...G....GA.	...C....
E.m	321	...TA	C.....	...G....G..AC..G	...G....GA.	...C....	...G....
G1	401	GTGTTATTTT	TAATATGTAT	ATTGTGTGAA	ACTA
G1A	401
G1B	401
G1C	401
G2	401G....
G2A	401G....
G2B	401G....
G2C	401G....
G7	401	.G....C.	.GG.G...G.	G..A....G
G7A	401	.G....C.	.GG.G...G.	G..A....G
G7B	401	.G....C.	.GG.G...G.	G..A....G
G6	401	.G....C.	.GG.G...G.	G..A....G

Kyrgyzstan, prior to independence, livestock farming was organized on large state-run farms with slaughtering of animals under close veterinary supervision. Nowadays, livestock is divided into small herds and home; clandestine

or unregulated slaughtering is widespread (Torgerson et al. 2003; Torgerson et al. 2002). A similar pattern of husbandry exists in Romania especially on pig farms (Morariu, personal data).

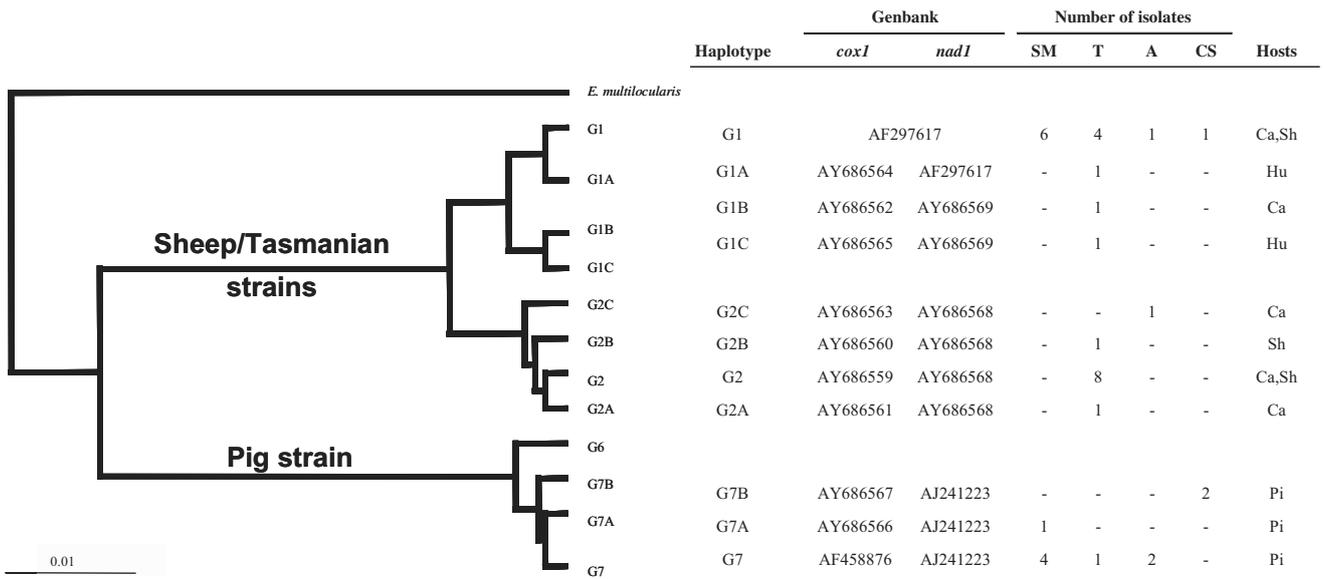


Fig. 3 Genetic, host, and geographical *E. granulosus* haplotype distribution. The *cox1* and *nad1* sequences obtained for each different haplotype were added, and their genetic distance was calculated with “fastDNAmP” software (version 1.2.2, January 3, 2000) (Felsenstein 1981; Olsen et al. 1994). TreeView (Page, 1996)

was used to draw the tree presented at the left side. In the right side, the host (*Hu* human, *Sh* sheep, *Ca* cattle, *Pi* Pig) and geographical (*SM* Satu Mare, *T* Timis, *A* Arad, *CS* Caras Severin) origin of the 36 Romanian isolates were described

The results of our molecular tracking study, combined with human and animal epidemiological data, suggest (i) that *E. granulosus* transmission occurs actively in Romania and (ii) that sheep and swine could play a role in the human transmission cycle. Complementary studies will have to be performed to demonstrate the role of the Tasmanian and pig

strains in human disease. The sympatrical circulation of three *E. granulosus* strains also needs to be investigated to assess the possibility of crossbreeding.

Acknowledgements We are extremely grateful to Dr. Petre Brăilă from Reșița, Dr. Gheorghe Ciobanu from Arad, Dr. Petru Muntean from Timișoara, and Dr. Eugen Avram from Satu-Mare for assistance and for supplying the material for our study.

Table 3 Table summarizing the nuclear vs mitochondrial data conflict

Nuclear genotypes	Sample number	Mitochondrial genotypes
SS	15	G2
	25	G1A
	26	G1C
SSA	2, 3, 4, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24	G1
	12	G1B
	1, 6, 7, 8, 10, 13	G2
	9	G2A
	5	G2B
	23	G2C
SSB	16	G1
	11	G2
SSC	14	G1
PS	27, 28, 30, 31, 35	G7
	29	G7A
	32, 33	G7B
PSA	34	G7
PSB	36	G7

SS Sheep strain, PS pig strain (A, B, and C are variants)

References

Arnaud-Haond S, Bonhomme F, Blanc F (2003) Large discrepancies in differentiation of allozymes, nuclear and mitochondrial DNA loci in recently founded Pacific populations of the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *J Evol Biol* 16:388–398

Bardonnet K, Benchikh-Elfegoun MC, Bart JM, Harraga S, Hannache N, Haddad S, Dumon H, Vuitton DA, Piarroux R (2003) Cystic echinococcosis in Algeria: cattle act as reservoirs of a sheep strain and may contribute to human contamination. *Vet Parasitol* 116:35–44

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* 128:229–234

Boissinot S, Boursot P (1997) Discordant phylogeographic patterns between the Y chromosome and mitochondrial DNA in the house mouse: selection on the Y chromosome? *Genetics* 146: 1019–1034

Bowles J, McManus DP (1993) NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *Int J Parasitol* 23:969–972

Bowles J, Blair D, McManus DP (1992) Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol* 54:165–173

Breyer I, Georgieva D, Kurdova R, Gottstein B (2004) *Echinococcus granulosus* strain typing in Bulgaria: the G1 genotype is predominant in intermediate and definitive wild hosts. *Parasitol Res* 93:127–130

- Draganescu C (1997) Romanian sheep production spectacular past decline, uncertain future. In: Sheep and goat husbandry in the Central and Eastern European Countries, Budapest, Hungary
- Eckert J, Thompson RC (1997) Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans. *Acta Trop* 64:19–34
- Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17:368–376
- Gottstein B, Mowatt MR (1991) Sequencing and characterization of an *Echinococcus multilocularis* DNA probe and its use in the polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 44:183–193
- Haag KL, Ayala FJ, Kamenetzky L, Gutierrez AM, Rosenzvit M (2004) Livestock trade history, geography, and parasite strains: the mitochondrial genetic structure of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *J Parasitol* 90:234–239
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp* 41:95–98
- Hobbs RP, Lymbery AJ, Thompson RC (1990) Rostellar hook morphology of *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) from natural and experimental Australian hosts, and its implications for strain recognition. *Parasitology* 101(Pt 2):273–281
- Iacobiciu I, Stefanoiu V, Lazar Z, Olariu R, Negrutiu L, Nitu A, Birsan M, Radus S, Dan L (1996) Aspects of hydatidosis in the adult population in Banat. *Roum Arch Microbiol Immunol* 55:263–274
- Iacobiciu I, Siko-Barabasi S, Olariu R, Stefanoiu V, Darabus G, Tirnea L (2003) Investigations on spread of hydatidosis in humans in Caras-Severin county. *J Rom Parasitol* 13:27–30
- Junie M, Coroiu Z, Costache C (2000) Epidemiological aspects on hydatidosis in Cluj-Napoca. *J Rom Parasitol* 10:8–11
- Kamenetzky L, Canova S, Guarnera E, Rosenzvit M (2000) *Echinococcus granulosus*: DNA extraction from germinal layers allows strain determination in fertile and nonfertile hydatid cysts. *Exp Parasitol* 95:122–127
- 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* 2:129–136
- Kedra AH, Swiderski Z, Tkach V, Dubinski P, Pawlowski Z, Stephaniak J, Pawlowski J (1999) Genetic analysis of *Echinococcus granulosus* from humans and pigs in Poland, Slovakia and Ukraine. A multicenter study. *Acta Parasitol* 44:248–254
- Kedra AH, Tkach VV, Swiderski ZP, Pawlowski Z, Emets A, Pawlowski J (2000) Molecular characterisation of *Echinococcus granulosus* from a wild boar. *Acta Parasitol* 45:121–122
- Le TH, Pearson MS, Blair D, Dai N, Zhang LH, McManus DP (2002) Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse–dog and sheep–dog strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 124:97–112
- Lemaire C, Versini JJ, Bonhomme F (2005) Maintenance of genetic differentiation across a transition zone in the sea: discordance between nuclear and cytoplasmic markers. *J Evol Biol* 18:70–80
- Malczewski A (2002) CE and AE in Eastern Europe. In: Craig P, Pawlowski Z (eds) *Cestode zoonoses: echinococcosis and cysticercosis, an emergent and global problem*. IOS, Amsterdam, The Netherlands, pp 81–89
- McManus DP, Thompson RC (2003) Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology* 127(Suppl):S37–S51
- Morariu S (2000) Morphological characteristics of adult *Echinococcus granulosus* of cattle origin. In: I Congresso Iberico de Hidatidologia, VII Congresso Nacional de Hidatidologia, Beja, Portugal
- Morariu S (2004) Etiologic and epidemiologic study and parasitic control. PhD Thesis Faculty of Veterinary Medicine, Timisoara, Romania
- Morariu S, Cosoroaba I, Darabus G, Oprescu I, Radbea N (1999) Morphological characteristics of adult *Echinococcus granulosus* of pig and sheep origin from western Romania. *Arch Int Hidatid* 33:324
- Olsen GJ, Matsuda H, Hagstrom R, Overbeek R (1994) fastDNAmL: a tool for construction of phylogenetic trees of DNA sequences using maximum likelihood. *Comput Appl Biosci* 10:41–48
- Olteanu C, Panaitescu D, Ghernian I (1997) Echinococcosis/hydatidosis (E/H) in man and animals in Romania. *Arch Int Hidatid* 32:292–293
- Page RD (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12:357–358
- Pawlowski Z, Stefaniak J (2003) The pig strain of *Echinococcus granulosus* in humans: a neglected issue? *Trends Parasitol* 19:439
- Rosenzvit MC, Zhang LH, Kamenetzky L, Canova SG, Guarnera EA, McManus DP (1999) Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology* 118:523–530
- 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
- Shaikenov BS, Torgerson PR, Usenbayev AE, Baitursynov KK, Rysmukhambetova AT, Abdybekova AM, Karamendin KO (2003) The changing epidemiology of echinococcosis in Kazakhstan due to transformation of farming practices. *Acta Trop* 85:287–293
- Shaw KL (2002) Conflict between nuclear and mitochondrial DNA phylogenies of a recent species radiation: what mtDNA reveals and conceals about modes of speciation in Hawaiian crickets. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:16122–16127
- Snabel V, D'Amelio S, Mathiopoulos K, Turcekova L, Dubinsky P (2000) Molecular evidence for the presence of a G7 genotype of *Echinococcus granulosus* in Slovakia. *J Helminthol* 74:177–181
- Todorov T, Boeva V (1999) Human echinococcosis in Bulgaria: a comparative epidemiological analysis. *Bull WHO* 77:110–118
- Torgerson PR, Budke CM (2003) Echinococcosis—an international public health challenge. *Res Vet Sci* 74:191–202
- Torgerson PR, Burtisurnov KK, Shaikenov BS, Rysmukhambetova AT, Abdybekova AM, Ussenbayev AE (2003) Modelling the transmission dynamics of *Echinococcus granulosus* in sheep and cattle in Kazakhstan. *Vet Parasitol* 114:143–153
- Torgerson PR, Shaikenov BS, Baitursinov KK, Abdybekova AM (2002) The emerging epidemic of echinococcosis in Kazakhstan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96:124–128
- Turcekova L, Snabel V, D'Amelio S, Busi M, Dubinsky P (2003) Morphological and genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in the Slovak Republic. *Acta Trop* 85:223–229

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 / Published online: 3 October 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'-gTCTTCCCTCTATCgTggg-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 (CEQ 8000 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

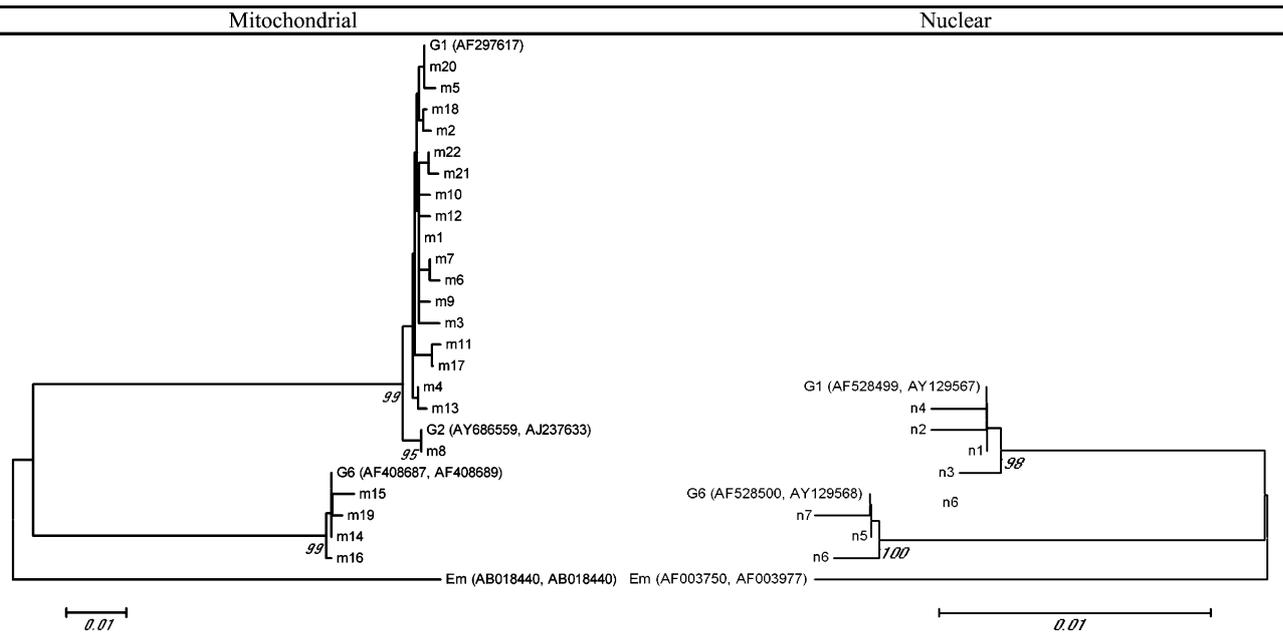


Fig. 1 Comparison of the two dendrograms drawn with the mitochondrial and nuclear genotypes identified in this study. These genotypes were defined by combining the results obtained with the four different typing targets (*cox1*, *nad1*, *actII*, and *hbx2*). The phylogenetic trees

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 *actII*, 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 micro-satellite 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, Guarnera 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

RESUME

Echinococcus multilocularis est un parasite nécessitant pour survivre un passage successif entre les carnivores, comme le renard et les micro-mammifères. Le parasite est responsable chez l'homme de l'Echinococcose Alvéolaire, une maladie mortelle si elle n'est pas prise en charge. Uniquement décrit dans l'hémisphère nord (Chine, Japon, Europe et Amérique du Nord), la distribution spatiale du parasite semble connaître une évolution récente, notamment en Europe, où l'Arc alpin est décrit comme le foyer historique d'*E. multilocularis* dans cette région. Le génotypage a été choisi pour étudier la diffusion du parasite en Europe. Cependant, le manque d'outils de détection du polymorphisme du parasite nécessitait la recherche et la caractérisation de marqueurs possédant un haut pouvoir discriminant. Après caractérisation et validation de la cible EmsB multilocus répétée en tandem, la diversité génétique du parasite en Europe a été étudiée à différentes échelles spatiales d'analyse. A l'échelle micro-locale (rongeurs parasités d'une même pâture), les isolats présentaient une faible diversité génétique entre eux, évoquant une contamination des rongeurs par une même source infectieuse (e.g. les fèces d'un même renard parasité). A l'échelle locale (900 km²), 140 parasites de 25 renards ont été étudiés. Les parasites présentaient une diversité génétique permettant de distinguer 6 profils EmsB. La présence simultanée de différents profils chez le renard a été décrite de manière fréquente, évoquant des infestations répétées des renards. Un faible taux d'hétérozygotie a été trouvé chez le parasite, ce qui pourrait être expliqué par un mode de reproduction principalement clonal. A l'échelle continentale (9 sous-régions européennes de la zone endémique historique et de la périphérie de celle-ci) la diversité génétique et la structure spatiale du polymorphisme ont été étudiées à partir de 653 isolats (596 vers adultes isolés de 129 renards, 57 lésions opérés chez des patients et des animaux vivant en captivité). Une grande diversité génétique a été observée en Europe, avec la description de 54 profils EmsB. Des profils transversaux ont été trouvés de part et d'autre de la zone d'étude alors que d'autres plus endémiques étaient limités spatialement. L'étude de la composition génétique au sein des sous-régions européennes a permis de mettre en évidence une plus grande diversité génétique dans le foyer historique par rapport à sa zone périphérique, où quelques profils représentaient la majorité des parasites. Cette distribution évoque une dispersion du parasite à partir de la zone centrale vers la zone périphérique dans un système de transmission « continent-île ». Chez l'homme et l'animal en captivité des profils EmsB décrits comme endémiques ont été trouvés sur plusieurs années, montrant une contamination de manière locale par une même souche. Cette étude constitue la première application d'un marqueur microsatellite multilocus pour l'étude de la circulation d'un helminthe à l'échelle continentale.

Mots-clés : *Echinococcus multilocularis*, échinococcose alvéolaire, transmission, marqueurs moléculaires, ADN microsatellite multilocus répété en tandem, EmsB, pouvoir discriminant, traçabilité moléculaire.

ABSTRACT

Echinococcus multilocularis is a parasite involving carnivores, as mainly the fox, and rodents, as the micro-mammals in its life cycle. The human contamination by the parasite causes the Alveolar Echinococcosis, a lethal disease when untreated. The cestode is only found in the Northern Hemisphere (China, Japan, Europe and North America). Its spatial distribution seems to know a recent evolution, notably in Europe, where the Alpine Arch is described as the main *E. multilocularis* historical focus. The genotyping was chosen to study the parasite dispersion in Europe. However, the lack of relevant tools to track parasite polymorphism required the investigation and characterisation of markers with a high power of discrimination. After the characterisation and validation of the tandemly repeated multilocus microsatellite target EmsB, the genetic diversity in Europe was assessed at different geographical scales. At the micro-local scale (infested rodents from the same field), the isolates presented together a low diversity, suggesting a common contamination of rodents by the same infectious source (e.g. faeces from one infected fox). At a local scale (900 km²), 140 parasites from 25 red foxes were studied. The parasites harboured a genetic diversity which allowed us to distinguish 6 EmsB profiles. The simultaneous presence of different profiles together in fox was frequently observed and suggests repeated infections of foxes. The low rate of heterozygosity was shown and could be explained by a dominant clonally reproduction pattern. At continental scale (9 European sub-regions in the historical endemic zone and new endemic zones, in the peripheral area of the former), the genetic diversity and its spatial signification were studied with 653 isolates (596 adult worms from 129 red foxes, 57 lesions surgically removed for humans and animals in captivity). A great variability was observed in Europe, with the description of 54 EmsB profiles. Transversal EmsB profiles were found on both sides of the European field of work. However, endemic profiles were found geographically limited into the different sub-regions. The study of genetic composition into the different European sub-regions showed a bigger genetic diversity in the historical focus compared to the peripheral zone, where few profiles represented almost all the genetic diversity in these peripheral sub-regions. This distribution indicates a dispersion of the parasite from the central zone to peripheral zones in a "mainland-island" system of transmission. But this dispersion could have taken place on an important time scale. For human and animals in captivity, endemic EmsB profiles were found during several years, highlighting a putative local contamination by the same infectious strain. These findings constitute the first application of a multilocus microsatellite marker for the study of a helminth at a continental scale.

Keywords: *Echinococcus multilocularis*, Alveolar Echinococcosis, transmission, molecular marker, tandemly repeated multilocus microsatellite, EmsB, power of discrimination, molecular tracking.