

# Proposition d'un scénario spatio-temporel de l'expansion d'*E. multilocularis* en France grâce à la génétique

Gérald Umhang (1) (gerald.umhang@anses.fr), Jenny Knapp (2,3), Vanessa Hormaz (1), Francis Raoul (2), Franck Boué (1)

(1) Anses, Laboratoire de la rage et de la faune sauvage, Unité de surveillance et éco-épidémiologie des animaux sauvages, LNR *Echinococcus* spp., Malzéville, France

(2) Université de Bourgogne Franche-Comté, Laboratoire Chrono-environnement UMR UBFC/CNRS 6249, Besançon, France

(3) CHU de Besançon, Département de Parasitologie-mycologie, CNR échinococcose alvéolaire, Besançon, France

## Résumé

L'échinococcose alvéolaire, causée par le cestode *Echinococcus multilocularis*, est une des plus dangereuses zoonoses parasitaires en Europe. Son cycle est sylvatique et basé sur la relation proie-prédateur entre le Renard et les rongeurs. Une expansion globale de la zone d'enzootie du parasite a été constatée en Europe et notamment en France avec la description du parasite en région parisienne et jusqu'en Ille-et-Vilaine. Le microsatellite EmsB a été utilisé afin de mieux comprendre l'expansion du parasite en France. À partir de 383 vers isolés chez 128 renards, 22 profils EmsB différents ont été identifiés, dont cinq précédemment identifiés en Europe. Un déséquilibre de la diversité génétique a pu être observé entre les cinq zones échantillonnées, qui apparaissent toutefois interconnectées en raison du partage de profils communs notamment les deux profils majoritaires présents dans toutes les zones, à l'exception d'un des deux dans la zone Nord. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus au niveau européen avec la mise en évidence d'un système île-continent de transmission du parasite. Un scénario spatio-temporel de l'expansion d'*E. multilocularis* a pu être proposé avec une expansion du parasite à partir du foyer historique de la Franche-Comté vers la Lorraine, la Champagne-Ardenne et finalement le Nord. En parallèle, une seconde expansion s'est réalisée du foyer historique vers l'Ouest. La colonisation du parasite de l'Est vers le Nord et l'Ouest s'explique probablement par la migration de proche en proche de renards infestés il y a plusieurs décennies. La détection récente du parasite dans les départements nouvellement identifiés comme enzootiques s'expliquerait davantage par une surveillance plus importante que par une migration récente. La mise en ligne à venir d'une base de données des profils EmsB en Europe ainsi que la réalisation d'une large surveillance du parasite chez le Renard intégrant une analyse EmsB systématique devraient permettre une meilleure compréhension de l'expansion en France.

## Mots-clés

*Echinococcus multilocularis*, microsatellite EmsB, diversité génétique, expansion, renard, France

## Abstract

### Tracing the history of the spread of *Echinococcus multilocularis* from France's endemic area: a genetic approach

Alveolar echinococcosis, caused by the *Echinococcus multilocularis* cestode, is one of the most serious parasitic diseases for humans in Europe, with a sylvatic life cycle generally between small rodents and red foxes. The range of *E. multilocularis* has extended across Europe over the last 15 years. In France, a westward spread from the parasite's known endemic areas to encompass the Paris region, has been recently described. A genotypic approach with microsatellite EmsB was used to trace this expansion in five French areas. In all, 22 EmsB profiles were identified from 383 worms isolated from 128 foxes, five being similar to those found in other parts of Europe. An imbalance of genetic diversity was observed when comparing the five areas, which are nonetheless related through common profiles, notably the main two profiles present in all regions except one in the North. These two findings are similar to those described for Europe, highlighting the parasite's transmission by a mainland-island system. A spatio-temporal scenario of the expansion of *E. multilocularis* may be proposed describing a spread from the historical focus in eastern France to the Lorraine and Champagne-Ardenne regions and finally the North, at the same time as a westward spread from the historical focus. The parasite's colonisation of areas west and north of the historical focus is probably due to the migration of foxes several decades ago. The recent detection of the parasite in new endemic "départements" may be due to more active surveillance rather than a recent spread of the parasite. The planned on-line database of EmsB profiles in Europe and the close monitoring of this parasite among foxes, including systematic EmsB analysis, should shed light on the parasite's transmission in France.

## Keywords

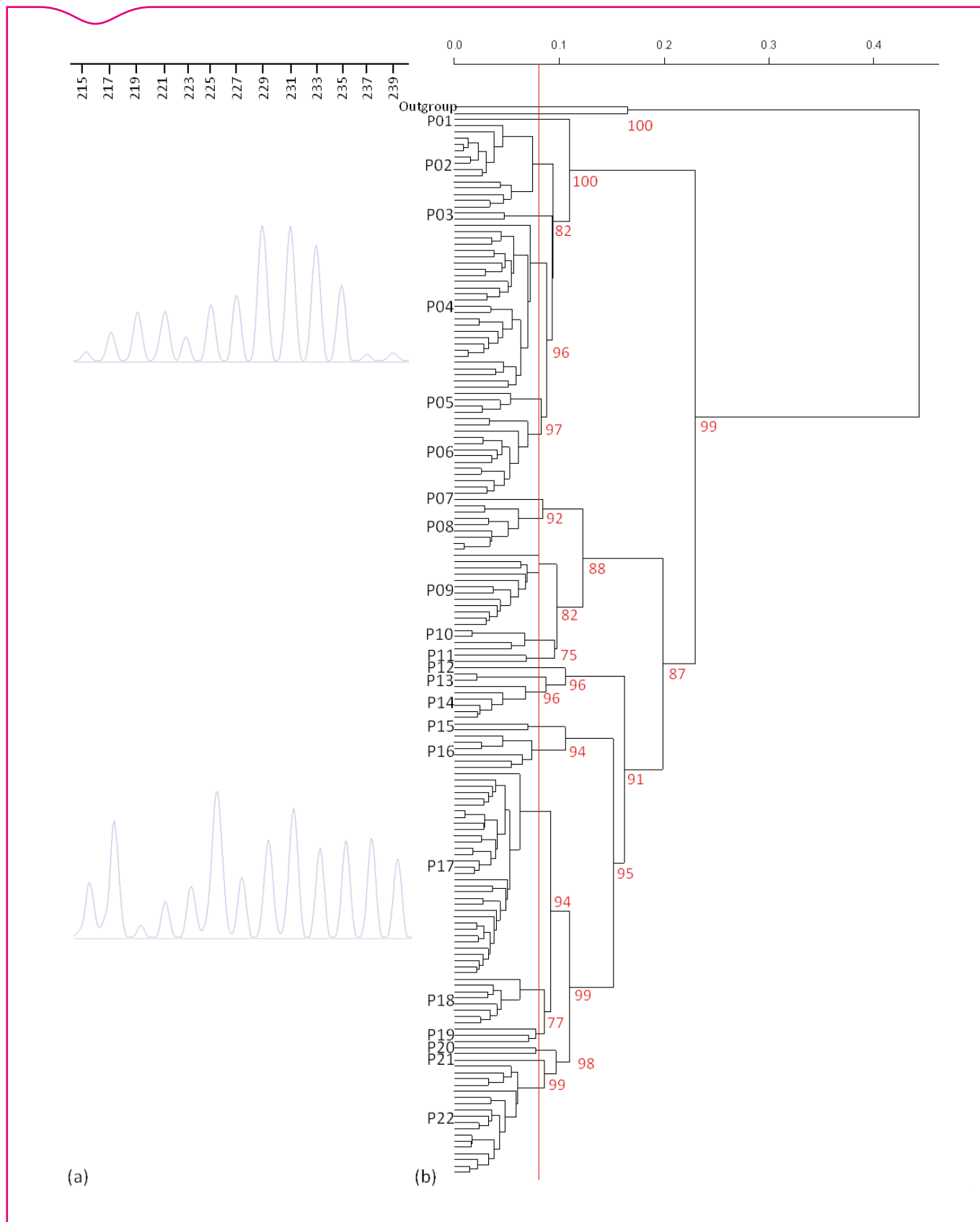
*Echinococcus multilocularis*, EmsB microsatellite, Genetic diversity, Parasite expansion, Red fox, France

L'échinococcose alvéolaire est une zoonose causée par le cestode *Echinococcus multilocularis* et est considérée comme l'une des plus dangereuses maladies parasitaires pour l'Homme en Europe. L'ingestion orale d'œufs de parasite de taille microscopique (30 µm de diamètre) entraîne le développement de vésicules interconnectées principalement dans le foie, avec une croissance similaire à celle d'une tumeur, envahissant et détruisant les tissus et organes voisins. La maladie est généralement asymptomatique pendant cinq à quinze ans, compliquant le traitement et rendant quasiment impossible l'identification des sources et du lieu d'infection. En Europe, le cycle parasitaire repose principalement sur la relation proie-prédateur entre les renards (*Vulpes vulpes*) et des rongeurs (principalement *Microtus arvalis* et *Arvicola terrestris*). À l'image de nombreuses autres espèces de mammifères (primates, lémurins, suidés, ...), l'Homme est considéré comme un hôte aberrant et constitue une impasse parasitaire. L'ingestion des œufs par les rongeurs entraîne le développement du stade larvaire avec notamment la production des protoscolex qui se développeront en vers dans l'intestin de l'hôte

définitif après prédation de l'hôte intermédiaire parasité. Les œufs de parasite sont ensuite disséminés dans le milieu extérieur via les fèces de l'hôte définitif entraînant la contamination environnementale permettant la perpétuation du cycle parasitaire.

À l'image de l'Europe, une expansion vers l'ouest de la zone d'endémie d'*E. multilocularis* a été constatée en France englobant la région parisienne et atteignant l'Ille-et-Vilaine (Combes *et al.*, 2013; Combes *et al.*, 2012). Dans ce contexte, une étude d'épidémiologie moléculaire basée sur l'utilisation du microsatellite EmsB a été mise en œuvre pour tenter d'expliquer ce phénomène d'expansion. Cet outil moléculaire a permis précédemment de décrire la transmission du parasite en Europe, sur la base d'un système île-continent<sup>(1)</sup> régi par des événements fondateurs dans les zones périphériques en

(1) Dans le système île-continent de transmission d'*E. multilocularis* en Europe, le foyer historique d'Europe centrale (continent) est le cœur de la diversité génétique duquel les souches parasitaires s'exportent grâce à la dispersion des renards vers les zones périphériques (îles) ayant donc une diversité génétique moindre, mais des profils communs avec la zone continent.



**Figure 1.** (a) Electrophorégrammes des loci d'EmsB pour les deux profils majoritaires P04 et P17. (b) Dendrogramme construit à partir des données EmsB, où les vers provenant d'un même renard et avec le même profil EmsB ont été regroupés. Deux échantillons d'*E. granulosus sensu stricto* ont été utilisés comme exogroupe afin d'enraciner l'arbre avec une espèce génétiquement proche. Les valeurs de bootstrap sont indiquées en rouge et ont été calculées avec 1000 répétitions

provenance du foyer historique d'Europe centrale (Allemagne, Suisse, Autriche) (Knapp *et al.*, 2009). De la même manière, l'origine autochtone d'un foyer d'*E. multilocularis* dans les Alpes italiennes a également pu être établie grâce à cet outil (Casulli *et al.*, 2009). En France, l'utilité du microsatellite EmsB avait été testée au niveau local dans les Ardennes, mais la diversité génétique des autres

zones d'enzootie n'avait jamais été explorée. Une étude a donc été entreprise pour estimer la diversité génétique du parasite dans les zones d'enzootie historiques ainsi que dans les zones nouvellement identifiées comme enzootiques, afin de pouvoir proposer un scénario spatio-temporel de l'expansion d'*E. multilocularis* en France (Umhang *et al.*, 2014).

**Tableau 1.** Nombre de vers et de renards échantillonnés pour chacune des cinq zones ainsi que leurs prévalences vulpines pour *E. multilocularis*

	Foyer historique	Régions			
		Lorraine	Champagne-Ardennes	Nord	Ouest
Départements investigués	Jura (39) Savoie (73) Doubs (25) Ain (1)	Moselle (57) Meurthe -et-Moselle (54)	Aube (10) Ardennes (8) Marne (51)	Nord (59) Somme (80) Oise (60)	Calvados (14) Ille-et-Vilaine (35) Manche (50)
Nombre de vers	185	79	45	23	51
Nombre de renards	59	27	14	12	16
Prévalence vulpine en % [IC95%]	36,3 [31,7-41,2]	42,8 [35,9-50,0]	22,2 [17,8-27,3]	11,8 [8,5-16,2]	11,5 [8,2-15,9]

## Matériels et méthodes

Les échantillons d'ADNs nécessaires à l'étude ont été obtenus à partir des vers d'*E. multilocularis* envoyés au LNR *Echinococcus spp.* par les laboratoires vétérinaires départementaux pour confirmation de l'infestation des renards, dans le cadre de l'enquête de surveillance menée chez cette espèce par l'Entente de lutte interdépartementale contre les zoonoses, (Eliz) l'université de Franche-Comté et le LNR (Combes *et al.*, 2013). Un maximum de cinq vers par renard a été retenu pour analyse. Le panel final a été composé de 383 vers provenant de 128 renards, collectés entre 2007 et 2012 et provenant de quinze départements regroupés en cinq zones (Tableau 1).

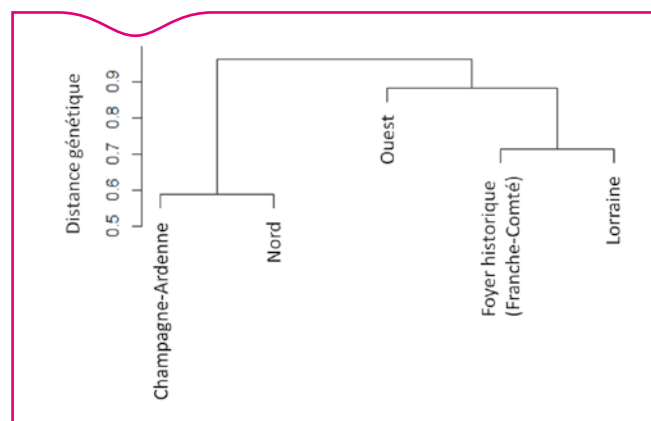
Le microsatellite EmsB est constitué de 40 copies toutes situées sur le chromosome 5 du parasite (Valot *et al.*, 2015). L'amplification par PCR de l'ensemble de ces copies est réalisée en une seule réaction à l'aide d'un couple d'amorces nucléotidiques, dont l'une est couplée à un fluorochrome permettant d'identifier la taille du fragment amplifié lors d'une électrophorèse capillaire. Un profil microsatellite EmsB est constitué de plusieurs pics qui correspondent chacun à un allèle compris entre 209 et 241 pb. Ensuite une analyse quantitative basée sur la présence et la hauteur de chacun des pics permet de caractériser le profil EmsB de chaque échantillon (Knapp *et al.*, 2007). Une analyse de clustering hiérarchique utilisant la distance euclidienne et la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Averages) (Legendre et Legendre, 1998) a été utilisée grâce au logiciel R afin de produire un dendrogramme. Un seuil de distance génétique de 0,08 a été utilisé pour différencier les échantillons. Ce seuil a été précédemment déterminé en évaluant la variabilité temporelle observée d'une souche d'*E. multilocularis* après plusieurs passages successifs chez des gerbilles par infestation intra-péritonéale (Knapp *et al.*, 2007). La diversité génétique (diversité  $\alpha$ ) a été calculée pour chacune des zones en utilisant l'index de Simpson (1/D). Comme le nombre de vers disponibles pour chacune des zones n'était pas identique, une procédure de rarefaction a été utilisée afin de réaliser l'analyse avec le nombre de vers le plus faible (n=23). La diversité  $\beta$  a été estimée en utilisant l'indice de Bray-Curtis et une analyse de clustering par lien complet permettant d'obtenir une représentation sous la forme de dendrogramme (Magurran, 2004).

## Résultats

Au total en France, 22 profils EmsB différents ont été décrits, regroupant de un à 82 vers (Figure 1). En parallèle, des courbes d'accumulation de profils ont été réalisées pour chacune des zones, l'obtention d'une asymptote correspondant à un échantillonnage représentatif. Si l'asymptote était obtenue pour la Champagne-Ardenne, les courbes des autres régions tendaient à l'atteindre démontrant que l'échantillonnage réalisé s'approchait d'une représentativité correcte. Les profils P04 et P17 sont les plus représentés, regroupant à eux deux 33,9 % des vers. Ce sont les deux seuls profils présents dans les cinq zones d'étude, à l'exception du Nord, où le profil P04 n'a pas été retrouvé. Deux profils (P08 et P09) sont présents uniquement en Lorraine, Champagne-Ardenne et dans le Nord, alors que six profils seulement ont été détectés

**Tableau 2.** Nombre de profils observés et extrapolés ainsi que la diversité génétique (indice de Simpson calculée sur la base de 23 vers, correspondant à la plus faible taille d'échantillon) pour chacune des régions

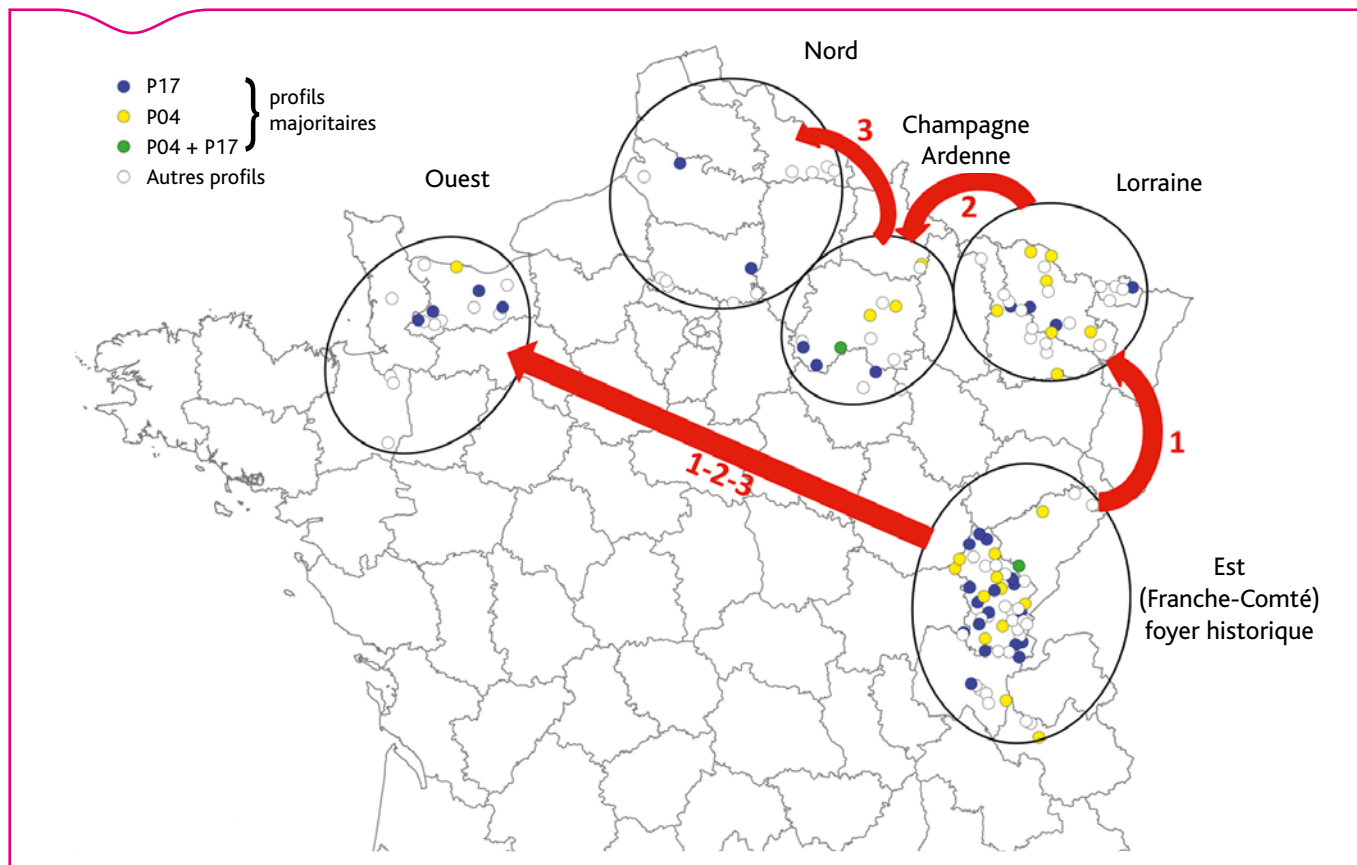
Région/Zone	Nombre de vers	Nombre de profils EmsB observés	Nombre total de profils EmsB estimés (erreur standard)	Diversité génétique (indice de Simpson)
Ouest	51	6	7,96 (1,39)	2,50
Nord	23	5	6,91 (1,35)	2,77
Champagne-Ardenne	45	6	6,00 (NA)	4,65
Lorraine	79	10	12,96 (1,71)	3,82
Foyer historique (Franche-Comté)	185	13	15,98 (1,72)	5,13



**Figure 2.** Dendrogramme basé sur la distance génétique entre les assemblages de profils des différentes régions

dans le foyer historique et trois autres régions: la Lorraine (P10, P11, P14), le Nord (P16) et l'Ouest (P02, P20). Les douze autres profils ne sont retrouvés chacun que dans une seule région et sont généralement peu représentés. Un profil dominant est présent uniquement dans le Nord (P08) et dans l'Ouest (P06), représentant respectivement 52,2 % et 59,5 % des vers de la zone concernée.

À partir de la richesse en profils de chacune des zones, l'extrapolation du nombre de profils attendus et l'estimation de la diversité génétique ( $\alpha$ ) ont été calculées (Tableau 2). Ces données suggèrent une forte richesse de profils dans le foyer historique, une richesse moyenne en Lorraine et une richesse plus faible dans l'Ouest, le Nord et la Champagne-Ardenne. Cela est légèrement différent concernant la diversité génétique qui est la plus élevée dans le foyer historique et diminue progressivement en Champagne-Ardenne puis Lorraine pour atteindre les valeurs les plus faibles dans le Nord et l'Ouest. L'analyse des assemblages de profils au sein de chaque région (diversité- $\beta$ ) révèle que le foyer historique et la Lorraine (10 profils communs) sont



**Figure 3.** Distribution des deux profils majoritaires P04 et P17. En rouge est indiquée la succession des étapes d'expansion d'*E. multilocularis* à travers les différentes régions

regroupés, tout comme la Champagne-Ardenne (3 profils communs) et le Nord. Par contre, la région Ouest est plus proche génétiquement du groupe formé par le foyer historique et la Lorraine que de celui groupant les deux autres régions (Figure 2).

## Discussion

Le statut du foyer historique d'enzootie en France a été confirmé par l'observation de la plus forte diversité génétique et de la plus grande richesse de profils. Les valeurs de ces deux paramètres génétiques diminuent dès lors qu'on s'éloigne de cette zone. La présence de profils dominants dans le Nord et l'Ouest reflète une colonisation plus récente de ces deux régions. Néanmoins, bien que ces deux régions soient géographiquement proches, les isolats d'*E. multilocularis* n'apparaissent pas liés génétiquement, ce qui laisse envisager l'hypothèse d'une colonisation de ces régions par deux processus différents et qui pourraient être potentiellement contemporains vu leur diversité génétique similaire.

Sur la base de toutes ces données fournies par la génétique, il est possible de proposer un scénario spatio-temporel de l'expansion d'*E. multilocularis* en France. À partir du foyer historique, l'expansion du parasite aurait débuté par la Lorraine pour atteindre la Champagne-Ardenne et finalement le Nord. Une deuxième expansion à partir du foyer historique réalisée en parallèle serait à l'origine de la présence du parasite dans l'Ouest (Figure 3). Néanmoins, la possibilité de la colonisation de la Lorraine, de la Champagne-Ardenne et du Nord par des renards infestés provenant des pays frontaliers notamment du sud de la Belgique et du nord de l'Allemagne n'est pas à exclure. Si ces deux régions sont considérées comme enzootiques depuis les années 1990, les niveaux de prévalence chez le Renard y sont considérés comme faibles et aucune donnée de profil EmsB n'est disponible actuellement. L'échelle de temps associée à la dispersion du parasite d'une zone à une autre peut être estimée grâce au développement récent de modèles mathématiques. Des valeurs similaires de vitesse de dispersion, autour de 3 km/an, ont été obtenues par des études menées en Allemagne et

aux Pays-Bas (Denzin *et al.*, 2014; Takumi *et al.*, 2008). L'identification dans l'Ouest ou le Nord du même profil EmsB que dans le foyer historique, distants de plusieurs centaines de kilomètres, démontrent que la colonisation du parasite est due à la migration de proche en proche de renards infestés il y a déjà plusieurs décennies. La détection très récente du parasite dans le Nord et l'Ouest s'expliquerait alors par une recherche plus active du parasite, qui était inexistante auparavant, plutôt que par une migration récente.

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

Les études de surveillance menée dans différents pays, notamment en Europe, sont désormais souvent complétées par l'exploration de la diversité génétique et participent ainsi à la multiplication des données de profils EmsB. La mise en place d'une centralisation de ces données EmsB dans une base de données accessible en ligne sera bientôt faite par le CNR échinococcose alvéolaire du CHU de Besançon en coopération avec le LNR afin de disposer d'une vision la plus exacte possible de la transmission d'*E. multilocularis* (<http://dataosu.obs-besancon.fr/>). Dans ce contexte, le LNR et le CNR œuvrent actuellement à l'amélioration de la disponibilité de données EmsB provenant de pays de l'Europe de l'Est, jusqu'ici en faible nombre. Cela est indispensable à la compréhension globale du système de transmission île-continent du parasite et l'évaluation d'une influence différente de celle du foyer historique.

En France, la réalisation en cours d'une nouvelle enquête de surveillance du parasite chez le Renard dix ans après la précédente (Combes *et al.*, 2012) permettra cette fois l'intégration de l'ensemble

des données nationales pour la réalisation d'analyses d'épidémiologie moléculaire par le microsatellite EmsB afin de mieux comprendre la dynamique d'expansion d'*E. multilocularis*. Ainsi, les futures analyses d'échantillons provenant du foyer d'enzootie du Cantal identifié dès la fin des années 1980 (Petavy and Deblock, 1983; Rey *et al.*, 1977) devraient permettre de mieux connaître l'origine enzootique de cette zone qui semble actuellement isolée. L'obtention d'échantillons provenant de zones nouvellement décrites comme enzootiques telles que le département des Hautes-Alpes (Umhang *et al.*, 2016) étoffera encore la compréhension de l'expansion du parasite en France et/ou sa présence ancienne.

## Remerciements

Les auteurs remercient les fédérations départementales des chasseurs et les laboratoires vétérinaires départementaux pour l'obtention des échantillons, l'Eliz pour la transmission des données spatiales des renards et Céline Richomme (Anses Nancy) pour la réalisation de la figure 3.

## Références bibliographiques

Casulli, A., Bart, J.M., Knapp, J., La Rosa, G., Dusher, G., Gottstein, B., Di Cerbo, A., Manfredi, M.T., Genchi, C., Piarroux, R., Pozio, E., 2009. Multi-locus microsatellite analysis supports the hypothesis of an autochthonous focus of *Echinococcus multilocularis* in northern Italy. *Int. J. Parasitol.* 39, 837-842.

Combes, B., Comte, S., Raton, V., Raoul, F., Boue, F., Umhang, G., Favier, S., Dunoyer, C., Woronoff-Rehn, N., Giraudoux, P., 2013. Expansion géographique du parasite *Echinococcus multilocularis* chez le renard en France. *Bull. Epid. Santé Anim. Alim.* 16-18.

Combes, B., Comte, S., Raton, V., Raoul, F., Boue, F., Umhang, G., Favier, S., Dunoyer, C., Woronoff, N., Giraudoux, P., 2012. Westward spread of *Echinococcus multilocularis* in foxes, France, 2005–2010. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 2059-2062.

Denzin, N., Schliephake, A., Fröhlich, A., Ziller, M., Conraths, F.J., 2014. On the move? *Echinococcus multilocularis* in red foxes of Saxony-Anhalt (Germany). *Transbound. Emerg. Dis.* 61, 239-246.

Knapp, J., Bart, J.M., Giraudoux, P., Glowatzki, M.L., Breyer, I., Raoul, F., Deplazes, P., Duscher, G., Martinek, K., Dubinsky, P., Guislain, M.H., Cliquet, F., Romig, T., Malczewski, A., Gottstein, B., Piarroux, R., 2009. Genetic diversity of the cestode *Echinococcus multilocularis* in red foxes at a continental scale in Europe. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e452.

Knapp, J., Bart, J.M., Glowatzki, M.L., Ito, A., Gerard, S., Maillard, S., Piarroux, R., Gottstein, B., 2007. Assessment of use of microsatellite polymorphism analysis for improving spatial distribution tracking of *Echinococcus multilocularis*. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2943-2950.

Legendre, P., Legendre, L., 1998. *Numerical Ecology*, second ed. Elsevier, Amsterdam.

Magurran, A.E., 2004. *Measuring Biological Diversity*. Blackwell Science Ltd., Oxford.

Petavy, A.F., Deblock, S., 1983. Connaissance du foyer auvergnat d'échinococcose alvéolaire. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 58, 439-453.

Rey, M., Morin, B., Petavy, A.F., Cambon, M., Baril, A., 1977. Premières observations auvergnates d'échinococcose alvéolaire. *Nouv. Presse Med.* 43, 4070-7071.

Takumi, K., de Vries, A., Chu, M.L., Mulder, J., Teunis, P., van der Giessen, J., 2008. Evidence for an increasing presence of *Echinococcus multilocularis* in foxes in The Netherlands. *Int. J. Parasitol.* 38, 571-578.

Umhang, G., Comte, S., Hormaz, V., Boucher, J.M., Raton, V., Favier, S., Raoul, F., Giraudoux, P., Combes, B., Boue, F., 2016. Retrospective analyses of fox feces by real-time PCR to identify new endemic areas of *Echinococcus multilocularis* in France. *Parasitol. Res.*, sous presse.

Umhang, G., Knapp, J., Hormaz, V., Raoul, F., Boue, F., 2014. Using the genetics of *Echinococcus multilocularis* to trace the history of expansion from an endemic area. *Infect. Genet. Evol.* 22, 142-149.

Valot, B., Knapp, J., Umhang, G., Grenouillet, F., Millon, L., 2015. Genomic characterization of EmsB microsatellite loci in *Echinococcus multilocularis*. *Infect., Genet. Evol.* 32, 338-341.