

Université de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

UFR Pharmacie

Ecole Doctorale Sciences Technologies santé

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

Discipline : Parasitologie

par

Julien Portier

le 23 novembre 2012

Alaria alata (Goeze, 1782) (Platyhelminthes, Trematoda): étude des différents acteurs du cycle, épidémiosurveillance et développement d'outil de diagnostic

Jury

Pr René Chermette

Pr Jean Dupouy-Camet

Dr Jacques Cabaret

Pr Bertrand Losson

Dr Isabelle Vallée

Dr Hubert Ferté

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Directeur de thèse

N° attribué par la bibliothèque

| | R | E | I | | | | |

©

On aurait pu dire, Oh Dieu, bien des choses en somme !

Remerciements

Je tiens à exprimer ma gratitude à :

René Chermette, pour m’ avoir fait l’ insigne honneur de juger cette thèse. Veuillez trouver ici l’ expression de mon plus profond respect pour l’ incarnation que vous êtes de l’ Enseignement.

Jean Dupouy-Camet, pour m’ avoir fait l’ honneur d’ accepter de juger ce travail. Soyez assuré de ma gratitude et de mes hommages respectueux.

Jacques Cabaret, pour ses talents de relecteur avisé. Soyez assuré de mes plus vifs remerciements et mon respect le plus sincère.

Bertrand Losson, pour avoir accepté de traverser les Ardennes pour apporter sa sagacité au jugement de ce travail. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

Hubert Ferté. Vous m’ avez appris que la connaissance n’ est pas la seule qualité d’ un chercheur. Vous m’ avez appris la patience, la pondération et peut-être un peu l’ humilité bien qu’ il y ait encore du travail sur ce dernier point. Pour votre présence même en vacances, pour vos conseils même ceux que je n’ ai pas suivis, pour votre humour même parfois ; bref pour tout, Merci.

Isabelle Vallée. Vous m’ avez appris à aller à l’ essentiel, à choisir le bon acte et les bons mots surtout à ne pas me disperser. Pour tout cela et pour tout le reste à venir, soyez assurée de mes remerciements les plus sincères.

Pascal Boireau. Vous avez toujours été disponible pour discuter malgré vos occupations et préoccupations nombreuses. Pour votre gentillesse et pour toutes nos discussions dans et hors cadre, je vous serai éternellement reconnaissant.

Jérôme Depaquit : pour m'avoir fait l'honneur de m'accueillir dans ton laboratoire. Merci pour tout !

Sandrine Lacour et Damien Jouet. Vous n'étiez pas mes directeurs de thèse mais par vos actions et vos conseils vous vous êtes tous deux comportés comme mes Aînés. Merci pour tout et je souhaite que d'autres étudiants auront la chance de vous cotoyer.

Olivier Gibout, Nicolas Flon, Daniel Delorme, Régine Martin-Schaller, Philippe Wolff, Michel Thomas, les équipes du laboratoire départemental de l'Aube, des stations ONCFS du Der-Chantecoq et de Gerstheim, de la fédération des chasseurs de la Meuse. A tous merci d'avoir collaboré chacun à votre échelle pour la bonne marche des travaux, de nous avoir permis et aider à prélever sangliers, grenouilles, mollusques, veaux, vaches, cochons que sais-je. Merci !

Charlotte Dunoyer sans qui peu de choses auraient été possibles et qui m'a toujours fait confiance. Merci Charlotte pour ton amitié.

Aux filles de l'équipe Trichine et à Denis Augot. Vous avez toujours été présents quand je me perdais au laboratoire. Pour toute l'aide logistique et intellectuelle donnée pour cette thèse. Merci à vous.

Aux amis de l'ANSES, qu'ils soient de VIRO, d'UZB ou de BIPAR, qu'ils s'appellent Topette, Timon, Bobby, Tata, Kristel, Guillaume, Dar, Bathata ou même Radu. Qu'ils sachent qu'ils contribuent tous au plaisir que j'ai eu à travailler et parfois à moins travailler à l'ANSES et qu'ils sont aussi essentiels qu'un poisson sans bicyclette.

A mes amis qui ne liront de cette thèse que les remerciements.

A ma famille, nombreuse !

A la femme qu'on aime parce qu'on la connaît jusqu'au bout des doigts

Table des matières

Table des matières	96
Liste des figures	99
Liste des Tableaux	101
CHAPITRE 1 GENERALITES ALARIA ALATA /ALARIA SPP.	103
1. LES PARASITES.....	104
1.1. <i>Nomenclature et systématique</i>	104
1.1.1. Historique.....	104
1.1.2. Systématique	106
1.2. <i>Cycles de développement</i>	113
1.2.1. Les principaux traits	113
1.2.2. De l'oeuf à l'adulte	116
2. NATURE DES HOTES.....	122
2.1. <i>Les hôtes définitifs</i>	122
2.1.1. Manifestations cliniques	122
2.1.2. Prévalences et taux d'infestations	122
2.2. <i>Les hôtes intermédiaires</i>	125
2.2.1. Les hôtes mollusques	125
2.2.2. Les hôtes amphibiens d' <i>A. alata</i>	127
2.3. <i>Les hôtes paraténiques</i>	128
2.3.1. Reptiles et oiseaux	128
2.3.2. Les mammifères	129
2.3.2.1 Les Suidés.....	129
2.3.2.2 Les autres mammifères.....	129
2.4. <i>Le potentiel zoonotique des Alaria spp.</i>	131
2.5. <i>Réglementation actuelle concernant l'analyse et le traitement des carcasses de sanglier.</i> ..	133
3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	134
CHAPITRE 2 ALARIA ALATA EN FRANCE.....	135
1. DONNEES ANTERIEURES	136
2. DONNEES ACTUALISEES (2007 A 2011)	137
3. ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA CIRCULATION D' <i>A. ALATA</i> AU SEIN DES POPULATIONS DE SANGLIERS	142
4. DIVERSITE GENETIQUE	159
4.1. <i>Matériel et méthodes</i>	159
4.2. <i>Résultats et discussion</i>	160
CHAPITRE 3 MESOCERCAIRES ET HOTES INTERMEDIAIRES.....	164

1. MATERIELS ET METHODES POUR LES TRAVAUX SUR LES HOTES MOLLUSQUES ET AMPHIBIENS.....	165
1.1. Sites d'étude	165
1.1.1. Le parc de vision de la forêt d'Orient	165
1.1.2. Le lac du Der-Chantecoq	165
1.1.3. Les étangs de Laheycourt	166
1.1.4. La vallée du Rhin en Alsace	166
1.2. Approches moléculaires.....	168
2. RESULTATS DE LA RECHERCHE DES HOTES INTERMEDIAIRES MOLLUSQUES	169
3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES	171
3.1. Saisonnalité des émissions.....	171
3.1.1. Matériel et méthodes	171
3.1.2. Résultats et discussion	173
3.2. Approches écologiques	177
3.2.1. Description des sites	177
3.2.1.1 Sites alsaciens	177
3.2.1.2 Les étangs de Laheycourt.....	178
3.2.1.3 Les sites de la forêt d'Orient	179
3.2.1.4 Les sites du lac du Der-chantecoq.....	180
3.2.2. Matériel et méthodes	181
3.2.3. Résultats.....	182
3.2.4. Discussion.....	184
3.3. Infestations expérimentales sur mollusques.....	186
3.3.1. Matériel et méthodes	186
3.3.2. Résultats.....	186
3.3.2.1 Eclotions des oeufs	186
3.3.2.2 Infestations de <i>Planorbis planorbis</i>	187
3.3.2.3 Infestations d' <i>Anisus vortex</i>	188
4. RESULTATS DES TRAVAUX SUR AMPHIBIENS.....	190
4.1. Règlementation et prélèvements.....	190
4.2. Protocoles d'analyse	190
4.3. Prévalences et taux d'infestation.....	190
4.4. Localisation chez les amphibiens	192
4.5. Discussion	194
CHAPITRE 4 MESOCERCAIRES ET HOTES PARATENIQUES	196
1. CHEZ LE SANGLIER	197
1.1. Prélèvements et protocoles d'analyses.....	197
1.1.1. Méthode de migration	197
1.1.1.1 Matériel nécessaire.....	197
1.1.1.2 Echantillons.....	198

1.1.1.3 Analyse.....	198
1.1.2. Prélèvements	199
1.2. Répartition spatiale au niveau des carcasses	200
1.3. Résistance.....	210
2. INFESTATIONS EXPERIMENTALES SUR RONGEURS	217
3. EXAMEN HISTOLOGIQUE DE MESOCERCAIRES CHEZ LA SOURIS	227
3.1.1. Matériel et méthodes	227
3.1.2. Résultats.....	227
3.1.3. Discussion.....	231
4. CARACTERISATION DE LA SURVIE <i>IN VITRO</i> DES MESOCERCAIRES D' <i>A. ALATA</i>	233
4.1. Matériel et méthodes	233
4.2. Résultats	233
4.3. Discussion	234
Conclusion	236
Bibliographie	240

Liste des figures

Figure 1 : Formes adultes des différents représentants des sous-genres <i>Paralaria</i> et <i>Alaria</i> , (d'après Dubois (21)	108
Figure 2 : Arbre basé sur le domaine D2.....	111
Figure 3 : Arbre basé sur le domaine ITS2.....	112
Figure 4 : Cycle d' <i>Alaria alata</i>	113
Figure 5 : Cycle d' <i>Alaria mustelae</i>	114
Figure 6 : Les différents stades d' <i>A. alata</i> : adulte (1 et 2), œuf (3 et 4), miracidium (5 et 6), sporocyste (7 et 8), furcocercaire (9 et 10) et mésocercaire (11 et 12).	115
Figure 7 : Répartition des cas d' <i>A. alata</i> chez les sangliers analysés pour la trichinellose en 2010.	139
Figure 8 : Répartition des cas d' <i>A. alata</i> chez les sangliers analysés pour la trichinellose en 2011.	140
Figure 9 : Arbre issu de l'alignement des séquences de COX de 38 mésocercaires d'origines différentes isolées en France et de 4 mésocercaires d'Allemagne.	161
Figure 10 : Lieux prospectés pour les mollusques	167
Figure 11 : Evolution du canal du Coulon au cours d'une année.	172
Figure 12 : Nombre d' <i>A. vortex</i> prélevés et émettant des furcocercaires d' <i>A. alata</i> . .	174
Figure 13 : Nombre de <i>P. planorbis</i> prélevés et émettant <i>A. alata</i>	175
Figure 14 : Répartition des sites prélevés dans la vallée du Rhin.	177
Figure 15 : Sites du lac d'Orient.	180
Figure 16 : Site d'Argentolle.	181
Figure 17 : Sites alsaciens et présence de planorbidés	182
Figure 18 : Sites alsaciens et absence de planorbidés.	183

Figure 19: Pourcentage d'oeufs d' <i>A. alata</i> éclos en fonction du temps.	187
Figure 20: Der-Chantecoq : présence de mésocercaires chez les grenouilles (état frais)	193
Figure 21: Technique de Baermann modifié : dispositif utilisé	198
Figure 22: Mésocercaire encapsulée en coloration HES	228
Figure 23: Restes nécrotiques d'une mésocercaire en coloration PAS	229
Figure 24: Mésocercaire et structure de la capsule en coloration HES	229
Figure 25: Mésocercaire quittant sa capsule en coloration PAS	230
Figure 26: Foyers inflammatoires provoqués par une mésocercaire et sa capsule en coloration PAS.	231
Figure 27: Mésocercaires d' <i>A. alata</i> encapsulées in vitro.	234

Liste des Tableaux

Tableau 1: Espèces du sous-genre <i>Alaria</i> : Hôtes définitifs et répartition	109
Tableau 2: Espèces du sous-genre <i>Paralaria</i> : Hôtes définitifs et répartition.....	110
Tableau 3: Prévalences et taux d'infestations d' <i>Alaria alata</i> adultes chez le Renard roux.....	123
Tableau 4: Trématodes à furcocercaires à ocelles non pigmentées décrites chez <i>Planorbis planorbis</i> et <i>Anisus vortex</i>	126
Tableau 5: Prévalence et taux d'infestations des mésocercaires d' <i>A. alata</i> chez les reptiles	128
Tableau 6: Divergences entre les séquences de 6 furcocercaires issues d'un même mollusque naturellement infesté.....	162
Tableau 7: Divergences entre les séquences de 9 mésocercaires issues d'un même sanglier.	163
Tableau 8: Récapitulatif du nombre de mollusques émettant des furcocercaires d' <i>A. alata</i> et du nombre total de mollusques <i>A. vortex</i> et <i>P. planorbis</i> prélevés.	173
Tableau 9: <i>Anisus vortex</i> : prévalence des différentes cercaires.	175
Tableau 10: Caractéristiques des différents sites prospectés.....	184
Tableau 11: Résultats des infestations expérimentales sur <i>P. planorbis</i>	188
Tableau 12: Résultats des infestations expérimentales sur <i>A. vortex</i>	189
Tableau 13: Mésocercaires et grenouilles du canal du Coulon et d'Argentolle.....	191
Tableau 14: Mésocercaires et têtards du canal du Coulon et d'Argentolle.	192
Tableau 15: Distribution des mésocercaires d' <i>A. alata</i> chez une grenouillette et une grenouille juvénile.....	194
Tableau 16: Matériel et réactifs nécessaires à la réalisation d'une recherche de mésocercaires par la technique de migration.	197

Introduction

Les émergences ou réémergences d'agents pathogènes sont régulièrement observées et dans la plupart des cas intéressent des virus ou des bactéries et plus rarement des parasites. L'émergence d'un trématode est exceptionnelle car elle nécessite des exigences plus importantes du fait du cycle de développement avec un ou plusieurs hôtes intermédiaires. La plupart des trématodoses transmises par les aliments concernent l'Asie et l'Amérique du Sud. En Europe, seuls deux trématodoses sont considérées comme posant un problème de santé publique : les fascioloses et à un degré moindre les opistorchioses. Aussi l'émergence d'un trématode potentiellement zoonotique méritait une attention toute particulière. Avant 2004, la dernière mention de mésocercaires du trématode *Alaria alata* dans les viandes d'un sanglier en France remonte à 1953. Cette identification a été suivie de nombreuses autres liées principalement à un changement de la législation sur un autre parasite : la Trichine, nématode zoonotique présent dans les muscles des suidés. En effet un règlement européen a instauré en 2005 une recherche obligatoire de trichine par digestion pepsique chez tous les sangliers chassés destinés à la commercialisation. Ce contrôle a permis de mettre en évidence la présence du stade mésocercaire d'*A. alata* à de nombreuses reprises en France mais également dans de nombreux autres pays européens. Cette « émergence », totalement fortuite puisque due à la systématisation de la recherche d'un autre agent pathogène, a enclenché de nombreuses questions. Le cycle du parasite n'avait jamais été complètement étudié, sa circulation chez les différents hôtes jamais vraiment évaluée. Plusieurs cas humains dus à d'autres espèces du genre *Alaria* ont été publiés outre-Atlantique et concernant *A. alata*, de nombreuses infestations expérimentales ont montré la capacité du stade mésocercaire à traverser les barrières d'espèces. L'absence de connaissances approfondies sur le parasite et surtout sur les relations qu'il entretient avec le sanglier, présenté comme potentielle source d'infestation pour l'Homme ont entraîné le lancement de plusieurs travaux de recherche en Europe. En France, le nombre élevé de sangliers porteurs dans certains départements a mené au constat qu'une étude approfondie du parasite était nécessaire. C'est grâce au soutien financier de la Fédération Nationale des Chasseurs (FNC) et à un partenariat scientifique entre l'EA 4688-USC Anses Vecpar et l'UMR BIPAR (Anses) que ce travail a été réalisé. Cette double tutelle scientifique a pour but de permettre d'aborder les aspects écologiques du cycle d'*A. alata* mais aussi les relations sanglier/mésocercaire.

Chapitre 1 Généralités *Alaria Alata* /*Alaria* spp.

1. Les parasites

1.1. Nomenclature et systématique

1.1.1. Historique

La mise en évidence du stade adulte d'*Alaria alata* remonte à la fin du 18^{ème} siècle. En revanche la reconnaissance des différentes formes larvaires et la compréhension du cycle ont demandé plusieurs décennies comme cela a été aussi le cas pour les espèces Nord-américaines.

C'est Goeze, en 1777, qui a mis en évidence pour la première fois le parasite adulte dans l'intestin d'un Renard roux (*Vulpes vulpes*) en Allemagne. En fonction de son aspect foliacé il lui donna le nom de *Planaria alata* oder *dubia* Goeze 1782. En 1788 Schrank créa le genre *Alaria* : l'espèce nommée par Goeze représente l'espèce type du genre. En 1914 le binôme *Alaria alata* est retenu par Krause et fait encore actuellement autorité. De nombreuses mises en synonymies ont été par la suite proposées pour des trématodes précédemment rangés dans différents genres.

Synonymes d'*Alaria alata* (Goeze, 1782) (forme adulte) : *Alaria vulpis* Schrank, 1788, *Festucaria alata* Schrank, 1790, *Fasciola vulpis* Gm., 1790, *Distoma vulpina* Abildg., 1790, *Distoma s. Fasciola intestinalis vulpis* Viborg, 1795, *Distoma alatum* Zeder, 1800, *Fasciola alata* (Goeze) Rud., 1801, *Distoma alatum* Rud., 1819, *Holostomum alatum* Nitzsh, 1819, *Distoma alatum* Blainv., 1824, *Holostoma alatum* Nitzsch, Blainv., 1828, *Distomum alatum* Rud., Crep., 1829, *Hemistomum alatum* Dies., 1850, *Hemistoma alatum* Dies., 1860, *Holostome alatum* Ben., 1861, *Hemistoma alatum* (Goeze) Olss., 1876, *Hemostomum alatum* Dies., Braun, 1883, *Emistomum alatum* Dies., Sons., 1889, *Hemistomum alatum* Schrank, Stoss., 1890, *Hemioistomum alatum* Anacker, 1892, *Hemistomum alatum* (Goeze) Braun, 1892-93, *Hemistoma alatum* Stiles et Hass., 1894, *Conchosomum alatum* (Goeze) Rail., 1896, *Hemistomum alatum* Rätz, 1898, *Alaria alata* Krause, 1914, *Alaria alata* (Dies.) Joy., 1936, *Alaria tetracystis* (Gastaldi, 1854) Brumpt, 1945.

Le deuxième stade à être découvert fut le stade mésocercaire à la fin du 19^{ème} siècle. Au cours de sa première description en 1854 après dissection d'une Grenouille verte (*Rana esculenta*), Gastaldi considère qu'il s'agit d'une forme adulte. La présence de quatre cellules sécrétrices fut à l'origine du nom de ce parasite : *Distoma tetracystis* Gastaldi, 1854. Toujours au 19^{ème} siècle, des formes immatures ont été découvertes chez des porcs (*Sus scrofa dom.*) lors de la recherche de trichine. Ces trématodes, découverts par G. Leunis ont été transmis à

H.C.G Duncker qui en fit une première description sous la dénomination Muskel-Distomeen : « Distomes de muscle ». Cette première description sera reprise par Duncker (1-5) et d'autres auteurs (6) et la dénomination retenue en 1896 (Duncker, 1896) pour ce stade est *Distomum musculorum suis* H.C.G Duncker, 1881 (mesocercaria). Cette dénomination est encore utilisée aujourd'hui pour désigner le stade mésocercaire d'*A. alata* chez les suidés. De nombreuses dénominations seront données aux mésocercaires d'*A. alata* avant que la correspondance entre adulte et mésocercaire soit établie.

Synonymes d'*Alaria alata* (Goeze, 1782) (stade mésocercaire) : *Distoma tetracystis* Gastaldi, 1854 ; *Distomum tetracystis Ranae esculentae* Gastaldi of Diesing, 1855 ; *Distomum tetracystis* Gastaldi of Diesing, 1855 ; *Distomum tetracystis* Gastaldi of Braun, 1893 ; *Agamodistomum tetracystis* (Gastaldi, 1854) Hughes, 1928 ; *Distomum putorii* Molin, 1858 ; *Agamodistomum putorii* (Molin, 1855) Stossich, 1892 ; *Tetracotyle factorii* Linstow, 1876 ; *Diplostomulum putorii*, Linstow, 1877 ; *Trematodae* (s.l.) *putorii larvae*, Morosov, 1937 ; Distomien in Schweinefleisch of Duncker, 1881, Muskel Distomien of Duncker, 1881 ; *Distomum* sp., Duncker of Braun, Synonymes du stade mésocercaire : *Distoma tetracystis* Gastaldi, 1854 ; *Distomum tetracystis Ranae esculentae* Gastaldi of Diesing, 1855 ; *Distomum tetracystis* Gastaldi of Diesing, 1855 ; *Distomum tetracystis* Gastaldi of Braun, 1893 ; *Agamodistomum tetracystis* (Gastaldi, 1854) Hughes, 1928 ; *Distomum putorii* Molin, 1858 ; *Agamodistomum putorii* (Molin, 1855) Stossich, 1892 ; *Tetracotyle factorii* Linstow, 1876 ; *Diplostomulum putorii*, Linstow, 1877 ; *Trematodae* (s.l.) *putorii larvae*, Morosov, 1937 ; Distomien in Schweinefleisch of Duncker, 1881, Muskel Distomien of Duncker, 1881 ; *Distomum* sp., Duncker of Braun, 1893 ; *Distomum musculorum suis* Duncker, 1896 ; *Agamodistomum suis* Stiles, 1898 ; leberegel aus dem Schweinefleisch of Kästenbaum, 1899 ; *Alaria tetracystis* (Gastaldi, 1854) Brumpt, 1945 ; metacercaria *Alaria alata* (d'après Potekhina, 1950)

C'est à Ruzskowski que nous devons les premières informations sur le cycle d'*A. alata*. Il a utilisé des œufs d'*Holostomata alata* Diesing récoltés sur des renards pour faire éclore des miracidia et tenter d'infester plusieurs espèces de mollusques aquatiques (7). Il donne une première description d'un sporocyste d'*A. alata*. Il démontre expérimentalement que le planorbidae *Planorbis vortex* [= *Anisus vortex* (8)] est premier hôte intermédiaire d'*A. alata*. En 1931, Bosma décrit le cycle parasitaire d'*Alaria mustelae* (espèce nord-américaine) grâce à une succession d'infestations expérimentales et ainsi le premier cycle parasitaire d'une

espèce du genre *Alaria* (9). Elle considère les stades adultes « *Agamodistomum* » comme des stades larvaires et leur donne le nom de « mésocercaire ». Sur la base des données acquises sur les espèces Nord-américaines (Bosma, 1931; Odlaug, 1940), la recherche des mésocercaires fut largement facilitée. Bugge démontre le lien entre les mésocercaires présentes chez les grenouilles et mesocercaria chez les porcs (11). En 1953, Dollfus et Chabaud supposent que *Distomum musculorum suis* est bien la mésocercaire d'*A. alata* ce qui est démontré par Stefanski et Tarcsynski au cours de la même année. C'est à cette période que le cycle complet d'*A. alata* est élucidé (12-17) en exURSS grâce à des infestations expérimentales partant d'œufs d'*Alaria alata* récoltés sur des carnivores. Ces expérimentations donneront le cycle d'*A. alata* tel qu'il est connu aujourd'hui. Le sanglier ainsi qu'un grand nombre de mammifères, d'oiseaux et de reptiles sont désignés comme hôtes paraténiques pour le stade mésocercaire d'*A. alata* (18, 19). Depuis l'élucidation du cycle d'*A. alata*, de nombreux articles font état de la découverte de ce parasites chez diverses espèces et dans de nombreux pays mais peu d'études portent sur les relations hôte-parasite, quelque soit le stade.

1.1.2. Systématique

Alaria alata (Goeze, 1782) est un ver plat non segmenté (Platyhelminthes, Trematoda) de la famille des Alariidae. La famille des Alariidae appartient aux *Diplostomoidea* Poirier, 1896 (19) (= *Strigeoidea* Railliet, 1919). Quatre types de cercaires sont reconnus en fonction du système excréteur dont le type *Diplostomulum*, caractéristique du stade métacercaire, présent chez les *Diplostomidae* Poirier, 1886. En pratique cette famille est scindée en deux en fonction de la nature des hôtes définitifs : *Crassiphialinae* et *Diplostominae* chez les oiseaux, *Alariinae* Hall et Wigdor, 1918 chez les mammifères qui comprend 11 genres (GIBSON et Coll., 2002) :

Sous-famille: Alariinae Hall et Wigdor, 1918

- *Podospathalium* Dubois, 1932 : *Didelphiidae* - Brésil

- *Bursotrema* Szidat, 1960 : Marsupiaux - Argentine

- *Pharyngostomum* Ciurea, 1922 : Carnivores - Europe, Asie, Afrique

- *Pharyngostomoides* Harkema, 1942 : Procyonidés - USA

- *Procyotrema* Harkema et Miller, 1959 : Raton laveur -USA

- *Fibricola* Dubois, 1932 : Mammifères -Australie, Amérique du Nord, Asie
- *Prudhoella* Beverley-Burton, 1960 : Loutre -Afrique
- *Cynodiplostomum* Dubois, 1936 : Carnivores - Afrique
- *Didelphodiplostomum* Dubois, 1944 : Didelphis - Amérique du Nord
- *Paralaria* Krause, 1914 : Loutre - Amérique du nord et du Sud
- *Alaria* Schrank, 1788 (= *Conchosomum* Railliet, 1896)

Parmi ceux-ci, le type Diplostomulum est rencontré chez les genres *Pharyngostomum*, *Pharyngostomoides*, *Fibricola*, *Didelphodiplostomum*, *Paralaria* et *Alaria*.

Si *A. alata* est le seul représentant des Alariinae en Europe, cinq espèces ont été décrites en Amérique du Nord (*A. americana*, *A. mustelae*, *A. michiganensis*, *A. marciana* et *A. arisaemoides*), deux au Brésil (*A. clathrata* et *A. pseudoclathrata*) et une au Mexique (*A. nasuae*) en tenant compte des mises en synonymies adoptées par la plupart des auteurs (20).

Ces espèces se répartissent selon deux sous genres, *Alaria* et *Paralaria* (Krause 1914), en fonction de la présence d'auricules à l'extrémité antérieure pour le genre *Alaria* et la présence de pseudo-ventouses à cette même extrémité pour le genre *Paralaria*. D'autres critères morphologiques comme la forme des testicules peuvent être pris en considération : les espèces du sous-genre *Alaria* présentent des testicules multilobés alors que le sous-genre *Paralaria* présente des testicules bilobés. Les adultes des espèces appartenant aux deux sous-genres sont présentés dans la **Figure 1**. Skrjabin (19) a rejeté cette séparation en raison du polymorphisme observé pour les auricules : chez certaines espèces ils sont réduits lorsque le parasite est attaché à l'intestin et ne deviennent visibles qu'après fixation. Aussi il considère qu'un seul genre est valide, le genre *Alaria* qui regrouperait toutes les espèces présentées ici.

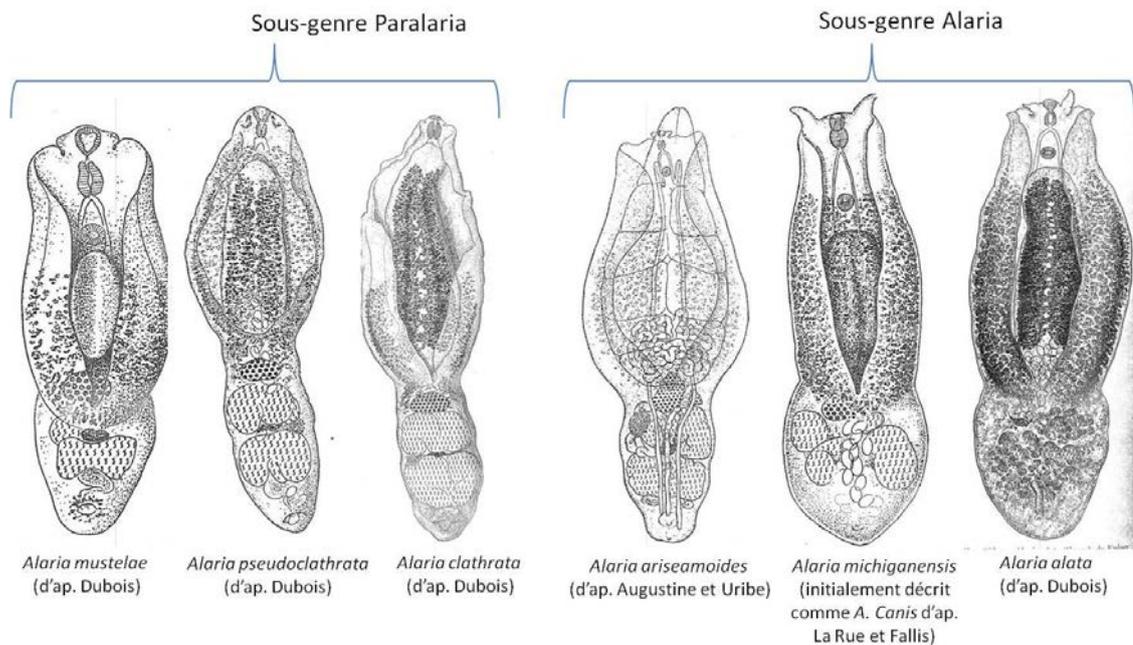


Figure 1 : Formes adultes des différents représentants des sous-genres *Paralaria* et *Alaria*, (d'après Dubois (21))

L'ensemble des espèces du genre reconnues par Skrjabin (1960) sont présentées dans le **Tableau 1** (sous-genre *Alaria* avec 4 espèces) et dans le **Tableau 2** (sous-genre *Paralaria* avec 5 espèces). Seules trois espèces ont été signalées en Europe : *Alaria alata*, *A. mustelae* et *A. asoviensis*. *A. mustelae* a été identifié à une seule occasion chez des visons d'Amérique importés pour leur fourrure en Allemagne (19). *A. asoviensis* a été identifié une seule fois sous une forme immature chez un chat au bord de la mer d'Azov (Yamaguti, 1971). Les mises en synonymie proposées par Yamaguti (1971) sont également indiquées dans le tableau. En cas de reconnaissance de deux sous-genres, les espèces rangées dans le sous genre *Paralaria* sont : *A. mustelae*, *A. clathrata*, *A. michiganensi*, *A. pseudoclathrata* et *A. nasuae*.

Espèce	Hôte		Région
<i>Alaria alata</i> (Goeze, 1782)	Chien	<i>Canis familiaris</i>	Eurasie
	Loup	<i>Lupus lupus</i>	
	Renard	<i>Vulpes vulpes</i>	
	Renard polaire	<i>Alopex lagopus</i>	
	Chat forestier	<i>Felis sylvestris</i>	Egypte Brésil Australie
	Chien viverrin	<i>Nyctereutes procyonides</i>	
	Fennec	<i>Fennecus zerda</i>	
Renard brésilien	<i>Canis azare</i>		
Chien des savannes	<i>Thous cancrivorus</i>		
<i>Alaria arisaemoides</i> Augustine et Uribe, 1927	Chien	<i>Canis familiaris</i>	Etats-Unis Canada
	Coyote	<i>Canis latrans</i>	
	Renard argenté	<i>Urocyon cineroargenteus</i>	
	Renard roux américain	<i>Vulpes fulva</i>	
Synonyme : <i>Alaria oregonensis</i> La Rue et Barone, 1927	Coyote	<i>Canis latrans</i>	Etats-Unis
<i>Alaria marciana</i> La Rue, 1917	Chat	<i>Felis domesticus</i>	Etats-Unis
Synonyme : <i>Alaria minnesotae</i> Chandler, 1954	Chien	<i>Canis familiaris</i>	Etats-Unis
	Chien	<i>Canis familiaris</i>	
	Loup	<i>Canis lupus lycaon</i>	
	Renard roux	<i>Vulpes fulva</i>	
	Chat domestique	<i>Felis domesticus</i>	
Synonyme <i>Alaria canis</i> La Rue et Falis, 1934	Chien	<i>Canis familiaris</i>	Etats-Unis Canada
	Coyote	<i>Canis latrans</i>	
	Loup	<i>Lupus lupus</i>	
	Lynx du Canada	<i>Lynx canadensis</i>	
	Lynx rouge	<i>Lynx rufus</i>	
	Marte	<i>Martes pennansi</i>	
	Renard argenté	<i>Urocyon cineroargenteus</i>	
Renard roux américain	<i>Vulpes fulva</i>		
Synonyme <i>Alaria americana</i> Hall and Wigdor, 1918	Chien	<i>Canis familiaris</i>	Etats-Unis, Asie
<i>Alaria asoviensis</i> Skrjabin, 1923	?*	?*	Nord de la mer d'Azov

Tableau 1: Espèces du sous-genre *Alaria* : Hôtes définitifs et répartition

* : la description de cette espèce repose sur l'observation de formes immatures chez un chat.

Espèce	Hôte		Région
<i>Alaria mustelae</i> Bosma, 1931	Coyote	<i>Canis latrans</i>	Etats-Unis Canada
	Belette du Sud vison américain	<i>Ictis noveboracensis</i> <i>Mustela vison</i>	
	Chien*	<i>Canis familiaris</i>	
	Chat domestique*	<i>Felis domesticus</i>	Eurasie
	Hermine	<i>Mustela erminea</i>	
	Putois	<i>Mustella putorius</i>	
	Rat musqué	<i>Ondatra zibethicus</i>	
Synonyme <i>Alaria canadensis</i> Webster et Wolfgang, 956	Mouffette	<i>Mephistis mephistis</i>	Canada
Synonyme <i>Alaria intermedia</i> Oliver et Odlaug, 1938	Mouffette	<i>Mephistis mephistis</i>	Etats-Unis
	Renard argenté	<i>Urocyon cineroargenteus</i>	
	Chien*	<i>Canis familiaris</i>	
	Chat domestique*	<i>Felis domesticus</i>	
Synonyme <i>Alaria minuta</i> Chandler et Rausch, 1946	Vison américain	<i>Mustela vison</i>	Etats-Unis
Synonyme <i>Alaria taxidae</i> Swanson et Erickson, 946	Blaireau	<i>Taxidea taxus</i>	Etats-Unis Canada
	Mouffette	<i>Mephistis mephistis</i>	
	Hermine	<i>Mustela erminea</i>	
	Putois	<i>Mustella putorius</i>	
<i>Alaria michiganensis</i> Hall et Wigor, 1918	Chien	<i>Canis familiaris</i>	Etats-Unis
<i>Alaria clathrata</i> Diesing, 1850	Loutre brésilienne	<i>Lutra brasiliensis</i>	Brésil
<i>Alaria pseudoclathrata</i> Diesing, 1850	Loutre brésilienne	<i>Lutra brasiliensis</i>	Brésil
<i>Alaria nasuae</i> La Rue and Townsend, 1927	Chien	<i>Canis familiaris</i>	Mexique Zoo de Washington
	Coati	<i>Nasua nasica</i>	

Tableau 2: Espèces du sous-genre *Paralaria* : Hôtes définitifs et répartition

Sur la base des données moléculaires actuellement disponibles dans Genbank, la position de différents membres du genre *Alaria* a pu être clarifiée pour deux domaines ribosomiaux : le domaine D2 et le domaine ITS2 (internal transcribed spacer 2). La **Figure 2** présente l'arbre construit pour le domaine D2 par la méthode du *Neighbor Joining*. L'échelle montre le nombre de substitutions nucléotidiques par site entre les séquences. Le premier chiffre est donné pour

le *neighbor joining*, le deuxième pour le maximum *likelihood* et le troisième pour le minimum *evolution*. *Isthmiophora* sp. a été choisi comme *outgroup*.

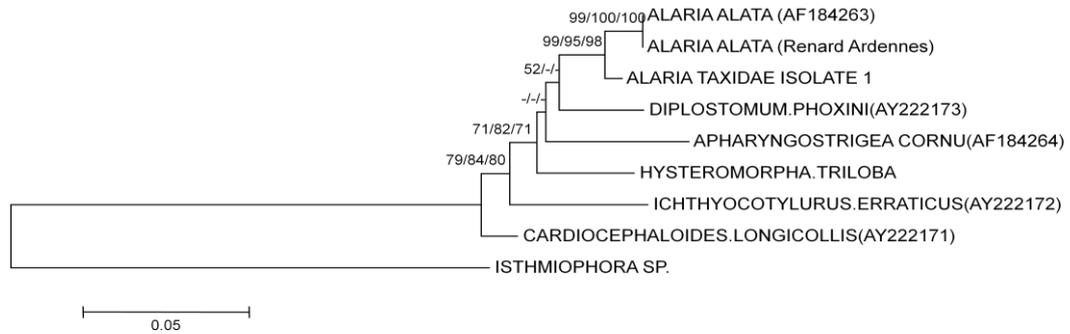


Figure 2: Arbre basé sur le domaine D2

Toutes les séquences obtenues à partir d'*Alaria* européenne étaient homologues pour le domaine ITS2. La **Figure 3** présente l'arbre obtenu pour le domaine ITS2 par la méthode du *Neighbor-joining*. L'échelle montre le nombre de substitutions nucléotidiques par site entre les séquences. Le premier chiffre est donné pour le nombre de substitutions nucléotidiques par site entre les séquences. Le premier chiffre est donné pour le *neighbor joining*, le deuxième pour le maximum *likelihood* et le troisième pour le minimum *evolution*. Un représentant du genre *Ornithodiplostomum* sp. a été choisi comme *outgroupe*.

Pour les deux domaines, la séparation des deux taxons *Alaria alata* et *Alaria taxidae* est soutenue.

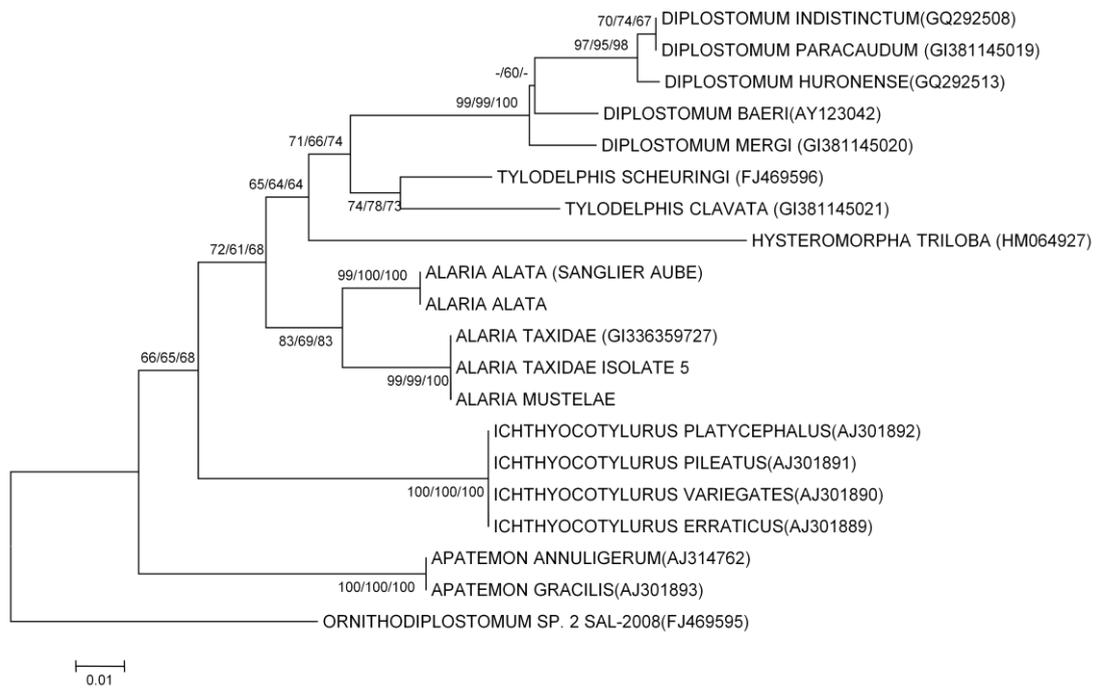


Figure 3: Arbre basé sur le domaine ITS2

1.2. Cycles de développement

1.2.1. Les principaux traits

Contrairement aux autres trématodes, un stade supplémentaire, la mésocercaire, vient s'intercaler entre la cercaire (du type furcocercaire) et la métacercaire dans le cycle des *Alaria sensus lato*. Cette mésocercaire peut-être observée chez divers hôtes paraténiques successifs mettant en jeu le principe d'infestation « Proie - Prédateur » dans le cycle de développement d'*Alaria alata* (Figure 4). Ces hôtes paraténiques feraient défaut chez les espèces reconnues comme appartenant au sous-genre *Paralaria* (*Alaria mustelae*) (Figure 5).

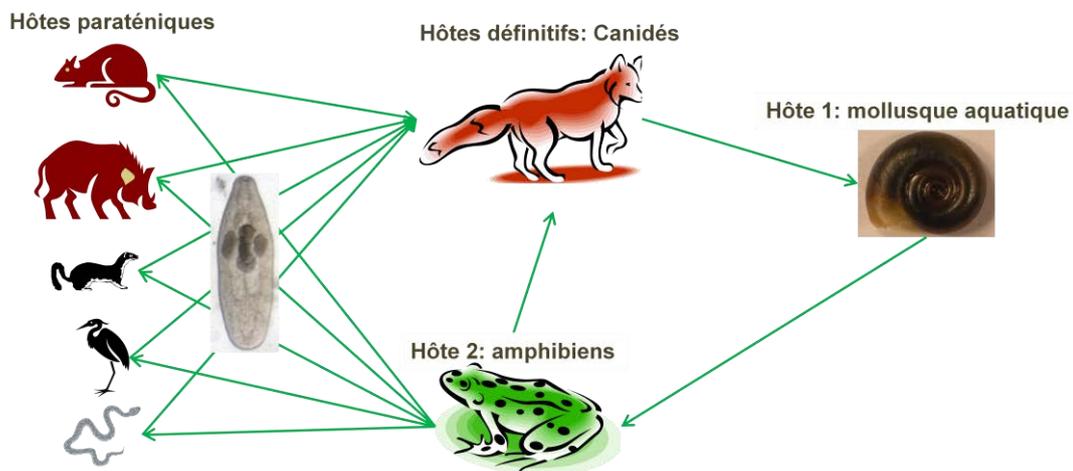


Figure 4: Cycle d'*Alaria alata*.

Les cycles d'*Alaria marciana*e et *Alaria arisaemiodes* sont très proches de celui d'*A. alata*, seuls les spectres des espèces hôtes définitifs ou intermédiaires changent (22, 23). Toutefois celui d'*Alaria marciana*e se singularise par la transmission de mésocercaires via l'allaitement pour les nouveaux nés à la fois chez les mammifères hôtes définitifs (Raton laveur, *Procyon lator*) ou chez les hôtes paraténiques (Souris, *Mus musculus*, Primates, *Callithrix jacchus*) (24-27).

Chez les *Paralaria* sp., trois véritables hôtes intermédiaires sont nécessaires à l'accomplissement du cycle et l'hôte définitif s'infeste par ingestion du stade métacercaire présent chez des rongeurs voire chez des d'autres carnivores. Chez les *Alaria* (dont *A. alata*)

cette infestation se réalise au stade mésocercaire, cette dernière après migration *in situ* jusqu'au niveau pulmonaire, se transforme en métacercaire.

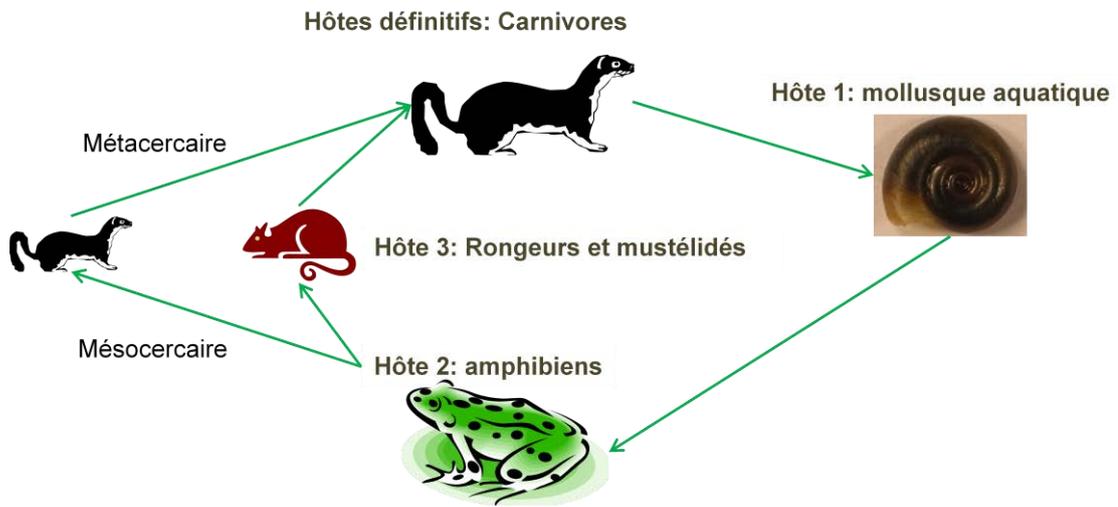


Figure 5: Cycle d'*Alaria mustelae*

Les cycles d'*A. clathrata* et *A. pseudoclathrata* ne sont pas connus. Ces deux espèces ont été décrites d'après des adultes retrouvés chez la Loutre brésilienne (*Lutra brasiliensis*). Il n'existe pas plus de données sur le cycle d'*A. michiganensis*, parasite de chien (*Canis familiaris*) (19), sur *A. nasuae*, parasite du Coati (*Nasua nasica*) et sur le cycle d'*A. asoviensis*.

La **Figure 6** présente l'ensemble des stades d'*A. alata* à l'exception du stade métacercaire.

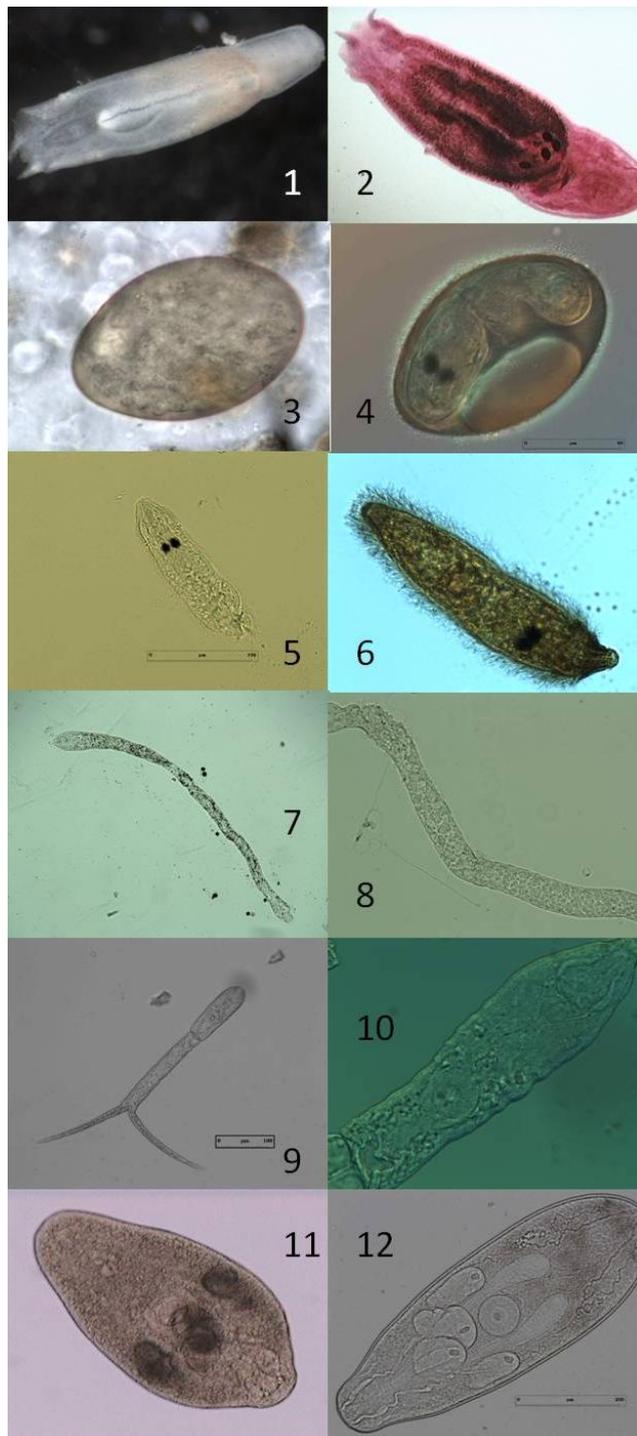


Figure 6: Les différents stades d'*A. alata* : adulte (1 et 2), œuf (3 et 4), miracidium (5 et 6), sporocyste (7 et 8), furcocercaire (9 et 10) et mésocercaire (11 et 12).

(Photos originales : H.FERTE : ©HF-Vecpar/URCA)

1.2.2. De l'oeuf à l'adulte

Les œufs sont d'un jaune comparable à celui observé chez *Fasciola hepatica*. Ils sont operculés et non embryonnés. Paradoxalement la taille des œufs d'après les données de certains auteurs présente un polymorphisme inhabituel, lié très certainement aux techniques d'enrichissement et éventuellement aux solutions denses utilisées pour leur mise en évidence : 98-125µm/62-81µm (28) ; 110-140µm/70-80µm (29, 30). En règle générale, la taille admise est de 100 à 130 µm de long pour 70 à 80µm de large (31). Les œufs d'*A. alata* sont de plus grande taille que la plupart des œufs d'autres trématodes retrouvés chez le Chien (*Canis familiaris*). Les Hétérophidés, les Opistorchiidés produisent des œufs de longueur inférieure à 50µm. Les Troglotrema produisent des œufs d'environ 90µm de long. Certains œufs d'Echinostomidés sont plus proches en taille (90-150µm de long pour 60-80µm de large) et peuvent être confondus avec les œufs d'*A. alata*, en particulier les œufs d'*Isthmiophora melis* parasite que l'on peut retrouver à l'état adulte chez les carnivores (32, 33).

Leur développement, de la ponte à l'éclosion du miracidium, est variable selon les conditions du milieu. Les œufs se développent *in vitro* à des températures comprises entre 15 et 40°C. A température ambiante, les miracidia émergent au bout de 27 jours d'après Ruzskowski (1921). Le développement est raccourci si la température est augmentée. Plus précisément Potekhina (1951) donne un délai de 11 à 15 jours entre la ponte et l'émergence du miracidium à 20-27°C. L'œuf est très sensible à la dessiccation (14). Ruzskowski indique qu'à 37°C les miracidia apparaissent rapidement mais n'émergent pas.

Le miracidium émerge de l'œuf en milieu humide. Le corps est pointu au bord antérieur et arrondi au bord postérieur, mesure 150 à 180 µm de long et de 32 à 38 µm de large. Le système excrétoire est formé de deux paires de protonéphridies, se succédant derrière les ocelles (14). Une paire d'ocelles (12 µm de long) est visible à environ 42 µm du bord antérieur. A notre connaissance, peu de trématodes présentent des miracidiums à ocelles pigmentées à l'exception des représentants du genre *Alaria sensu lato* et d'*Isthmiophora melis* (34, 35).

C'est à Potekhina (1951) que l'on doit la description du sporocyste d'*A. alata*. La deuxième génération de sporocyste mesure de 0,628 à 4,5mm de long pour 0,031 à 1,720mm de large. Ces sporocystes sont en forme de sacs avec 30 à 40 des corps germinatifs. La

première génération de sporocystes apparaît après 9 jours d'infestation. La deuxième génération est présente après 16 jours d'infestation.

La cercaire d'*A. alata* est une furcocercaire à ocelles non pigmentées comme celles observées chez la plupart des Strigeata. Potekhina (1951) a mesuré les différentes parties (corps, queue et fourchon). L'ensemble de la cercaire mesure entre 424 et 565µm de long pour 94 à 157µm de large. La queue mesure entre 173 et 235µm de long et les fourchons entre 141 et 173µm de long. Ruzzkowski donne des mesures légèrement différentes : la tête mesure 171µm de long pour 43µm de large, la queue mesure 199µm de long pour 26µm de large et les fourchons mesurent 199µm de long pour 14µm de large. Les éléments morphologiques permettant de distinguer la cercaire d'*A. alata* des autres furcocercaires décrites par Faltynkova, Nasincova (36) sont les suivants :

- présence de deux paires de cellules glandulaires en avant de la ventouse ventrale
- formule du système excrétoire: $2[(2 + 2 + 2) + (2 + 2 + 2)] = 24$
- absence de grandes épines autour de la cavité buccale
- corps intégralement spinulé
- deux rangées de petites épines formant une couronne autour de la ventouse ventrale.

La formule du système excrétoire ainsi que les deux rangées d'épines autour de la ventouse ventrale sont repris par Combes (37) pour la diagnose de la cercaire d'*A. alata*.

Le délai entre la pénétration du miracidium et l'émission de la cercaire est fonction de la température du milieu aquatique. A 18-19°C, ce développement dure 77 jours et il est plus court si les températures sont plus élevées, 35 à 45 jours à 22-24°C. A ces températures, l'émission se poursuit jusqu'à 22 jours. Toutes ces expérimentations ont porté sur des infestations de mollusques naïfs c'est-à-dire non parasités par d'autres trématodes.

Le corps de la mésocercaire est ovale et plat. Ces dimensions varient car la mésocercaire est mobile et avance par reptation (contractions-extensions du corps). Les mesures effectuées par Dollfus et Chabaud donnent une longueur comprise entre 460 et 525 µm et une largeur comprise entre 118 et 338 µm.

Les mésocercaires d'*A. alata* présentent les mêmes particularités morphologiques que les cercaires. Le corps est intégralement recouvert de fines épines qui sont resserrées sur le bord antérieur. La ventouse ventrale est munie sur ses bords de deux rangées serrées d'épines. La mésocercaire dispose également, en région médiane de 4 cellules glandulaires de grande taille et munies d'un grand noyau et situées en avant de la ventouse ventrale. Deux caeca sont également visibles. Le système excréteur est formé de chaque côté par 4 groupes d'ampoules à flamme vibratile. Un pore excréteur est visible en position terminale ou sub-terminale sur lequel aboutissent deux poches dilatées qui se prolongent antérieurement par le canal collecteur. A la coloration à l'hémalun, un massif de cellule apparaît à mi-chemin entre la terminaison des caeca et l'extrémité postérieure du corps. Ce sont les ébauches de structures du stade adulte (appareil génital et organe tribocytique).

Seuls les amphibiens sont reconnus comme deuxième hôte intermédiaire d'*A. alata*. Plusieurs tentatives d'infestations expérimentales sur différents hôtes potentiels avec des *Alaria* européennes ou américaines (7, 9, 14) semblent montrer que les furcocercaires d'*Alaria* sont capables de pénétrer uniquement la peau des amphibiens (têtards et adultes). Comme pour la plupart des furcocercaires seule la tête pénètre et va se loger dans l'ensemble des muscles et organes de l'amphibien hôte (38). Aucune étude sur le devenir du parasite après pénétration n'a été effectuée jusqu'à maintenant chez les amphibiens pour *A. alata*. En revanche, des études ont été menées outre-Atlantique sur les espèces américaines.

D'après Hofer et Johnson (1970), les mésocercaires d'*Alaria mustelae*, *A. marciana* et *A. arisaemoides* sont présentes sous forme encapsulées chez les grenouilles (*Rana pipiens*). D'après ces auteurs, la capsule est une réaction de l'hôte et non du parasite. Une coque fibroblastique enveloppe une capsule remplie d'une substance muqueuse positive à la coloration PAS (*Periodic Acid Schiff*) ou au bleu Alcian. Cette substance est a priori un gel de mucopolysaccharides et est exempte de protéines. Les auteurs considèrent que l'ensemble de la capsule (coque fibreuse et mucosubstance) est synthétisé par l'hôte parce que les mésocercaires ne possèdent pas de cellules productrices de mucus et que les glandes sécrétoires des mésocercaires sont bien positives aux colorations PAS et bleu Alcian mais présentent aussi des protéines, absentes de la substance muqueuse. La nature de l'encapsulation est variable selon l'espèce considérée. Pour *A. mustelae* (sous-genre *Paralaria*) les mésocercaires sont encapsulées individuellement dans des capsules laissant beaucoup d'espace au parasite qui bouge au sein de cet ensemble. Pour *A. arisaemoides*

(sous-genre *Alaria*), la capsule semble plus petite et le parasite moins libre de ses mouvements. Les mésocercaires d'*A. marciana* (sous-genre *Alaria*) sont elles encapsulées en masse, entourées par une coque fibroblastique épaisse dont des travées forment des compartiments contenant une ou deux larves. La substance muqueuse est absente pour cette espèce. Quelle que soit l'épaisseur de la coque fibreuse, les mésocercaires des trois espèces sont capables de sortir activement des capsules quand elles sont placées en solution saline proche du soluté physiologique (7%). L'hypothèse de ces mêmes auteurs sur les mésocercaires est qu'elles sont certes encapsulées mais qu'elles sont capables de sortir de ces capsules pour se déplacer à nouveau au sein de l'hôte et s'encapsuler ailleurs. Skrjabin (19) considère que ce sont les mésocercaires qui produisent cette capsule par le biais de cellules productrices situées sous la cuticule. D'après ce même auteur, les mésocercaires sont parfois capables de produire une capsule pendant leurs mouvements à travers l'hôte, formant une capsule en forme de sac allongé autour de la larve.

Chez l'hôte définitif, les mésocercaires migrent du tube digestif vers les poumons pour passer au stade métacercaire. Nous ne savons pas quelles sont les voies de dissémination des mésocercaires chez les hôtes paraténiques et définitifs. Une expérimentation de filtration du sang de chiens a montré que des mésocercaires étaient présentes dans le sang mais ce n'est pas suffisant pour affirmer qu'il s'agit de cette voie pour la migration de ce stade (39). La migration des mésocercaires chez les hôtes paraténiques et les hôtes définitifs suit peut-être les même voies jusqu'à un certain point. Toutes les mésocercaires, qu'elles soient issues de leur hôte intermédiaire amphibien ou d'un hôte paraténique, sont capables de se développer aux stades suivants (14, 40). Savinov (In Skrjabin) a suivi la migration des mésocercaires chez des chiens. Dix heures après ingestion, les mésocercaires étaient dans la paroi stomacale et étaient sorties du système digestif après 15 heures. Après 20 à 26 heures, les mésocercaires se trouvaient majoritairement dans la cavité abdominale puis dans la cavité thoracique après 28 heures. Du deuxième au 12^{ème} jour, la quasi-totalité des larves étaient présentes dans les poumons seules quelques unes se trouvant dans d'autres organes des cavités thoracique et abdominale. Par ses expériences, Savinov montre la migration dite transentéro-pulmo-entérale d'*A. alata* chez son hôte définitif. Les changements morphologiques accompagnant le passage du stade mésocercaires à métacercaire sont apparents à partir du quatrième jour jusqu'au 11^{ème} jour auquel la larve présente la forme externe ailée d'un adulte et les caractéristiques de la forme « diplostomulum » spécifique des membres des genres *Diplostomum*, *Neodiplostomum* et *Alaria* (41).

Au cours de ces changements, la métacercaire acquiert un aspect bi-segmenté avec une partie antérieure ovale et concave et une partie postérieure plus petite et conique. La métacercaire mature mesure 0,9 à 1,17mm de long pour 0,558 à 0,683mm de large. Les glandes et canaux sécrétoires régressent complètement. L'organe tribocytique se développe et devient très allongé et en forme de langue. Les auricules surplombant la ventouse buccale se développent. L'ébauche génitale passe d'un aspect ovale à un aspect multi-lobé. Le prépharynx et l'œsophage sont courts. Le pharynx est ovale dans la longueur du corps. La ventouse ventrale est antérieure à la moitié du corps. (19).

Toujours d'après les expériences de Savinov, les métacercaires poursuivent leur développement dans les poumons de l'hôte définitif jusqu'à 19 à 20 jours post-infestation. A maturité, les métacercaires traversent les bronches et passent dans le système digestif en remontant la trachée et en passant par le larynx. Les métacercaires atteignent ensuite l'intestin grêle et poursuivent leur maturation sexuelle qui est atteinte à 30-32 jours post-infestation.

Les adultes d'*A. alata* mesurent entre 2,89 et 4,32mm de long et sont bisegmentés. Le segment antérieur mesure de 2 à 3mm de long pour 0,81 à 1,95mm de large et est concave ventralement : les bords sont recourbés vers la face ventrale. La ventouse buccale est entourée de deux auricules saillants. Le segment postérieur mesure 0,96 à 2mm de long pour 0,74 à 1,71 mm de large et est ovoïde et séparé du segment antérieur par une constriction transversale. Le prépharynx et l'œsophage sont courts. La ventouse buccale est légèrement plus petite que la ventouse ventrale qui se situe au cinquième de la longueur du segment antérieur. L'organe tribocytique est très développé, de forme elliptique et arrondi aux deux extrémités. Un sillon médian est bien visible sur cet organe. Le bord antérieur de l'organe tribocytique atteint la partie postérieure de la ventouse ventrale. Les follicules vitellogènes, situés dans le segment antérieur, sont dans les parties latérales de ce segment jusqu'à l'extrémité antérieure de l'organe tribocytique. L'ovaire se situe à la jonction des deux segments, sa face postérieure est trilobée. Les testicules sont mutilobés.

Stefanski and Tarczynski (40) ont procédé à l'infestation expérimentale d'un chien par des mésocercaires (120 à 150 larves) issues de sangliers. Ils ont observé les premiers œufs à partir du 23^{ème} jour post-infestation, atteignant des niveaux maximum d'excrétion entre le deuxième et le quatrième mois post-infestations. Des œufs étaient encore excrétés lorsque le chien fut euthanasié, au cours du onzième mois. L'ensemble du cycle peut être complété en

92 à 114 jours (30). Dans l'intestin, les *Alaria* adultes se fixent aux villosités intestinales par le biais des auricules et des ventouses.

2. Nature des hôtes

2.1. Les hôtes définitifs

2.1.1. Manifestations cliniques

Les hôtes définitifs sont les seuls pour lesquels la présence du parasite semble avoir un impact. Le passage de métacercaires peut provoquer des signes pulmonaires et les adultes provoquent des lésions de l'intestin grêle (42). La présence d'*A. alata* a provoqué des pertes économiques importantes chez des producteurs de fourrures de renard en ex-URSS (19). C'est surtout la présence massive d'adultes dans les intestins des canidés qui provoque une importante inflammation due aux lésions causées sur les villosités intestinales. Les villosités apparaissent élonguées et oedémateuses. L'épithélium est lésé, les capillaires sanguins sont gonflés. Cette atteinte se manifeste par une perte de poids et d'appétit, une faiblesse générale. Des cas de pneumonies dues à la présence de métacercaires sont rapportés sur des chiens viverrins (*Nyctereutes procyonides*) (19).

2.1.2. Prévalences et taux d'infestations

C'est le Renard roux (*Vulpes vulpes*) qui est reconnu comme le principal hôte définitif d'*A. alata*. Le Renard roux a fait l'objet de très nombreux inventaires parasitaires du fait de son implication en tant qu'hôte définitif dans l'échinococcose alvéolaire et ainsi la présence des adultes d'*Alaria alata* a pu être mentionnée. L'ensemble des prévalences d'*A. alata* chez le Renard roux sont est présenté dans le **Tableau 3**.

Pays	Prévalence (%)	Taux d'infestations (min-max)	
Allemagne	0.1		Loos-Frank and Zeyhle (43)
Allemagne	28.3		Saar (44)
Allemagne	29.7		Lucius, Böckeler (30)
Autriche	18.4		Hinaidy (45)
Biélorussie	42.6	2-600	Shimalov and Shimalov (46)
Bulgarie	2.1		Jancev and Ridjakov (47)
Danemark	15.4		Saeed, Maddox-Hyttel (48)
Danemark	26.0		Guildal and Clausen (49)
Espagne	1,5		Criado-Fornelio, Gutierrez-Garcia (50)
Finlande	9.6		Freeman (51)
Hollande	10.9	0-18	Borgsteede (52)
Hongrie	48		(Széll, 2004)
Irlande	27.3	0-308	Wolfe, Hogan (53)
Pays de Galles	13.0		Williams (54)
Pologne	88.0		Kozłowska (55)
Pologne	76.5		Furmaga and Wysocki (56)
Pologne	31.6		Balicka-Ramisz, Ramisz (57)
Pologne	2.2		Balicka-Ramisz, Ramisz (57)
Portugal	27.4		Eira, Vingada (58)
Suède	40.6		Persson and Christensson (59)
Yougoslavie	64.5		Lozanic (60)

Tableau 3: Prévalences et taux d'infestations d'*Alaria alata* adultes chez le Renard roux.

Le Loup (*Canis lupus*) (61) a été trouvé porteur d'*A. alata* avec des prévalences parfois supérieures à 80% (62, 63).

Le dernier hôte majeur est le chien viverrin (*Nyctereutes procyonides*), canidé introduit en ex-URSS pour la production de fourrure et dont la répartition atteint maintenant l'Est de la France (64). Les prévalences rapportées pour cet hôte sont toujours supérieures à 20% (65-68).

Chez le Chien domestique, les prévalences observées sont faibles (moins de 5%) (69-71). La faible exposition des animaux domestiques aux sources potentielles d'infestations explique très certainement ces faibles prévalences. Le lynx (72) a aussi été trouvé naturellement porteur.

D'autres espèces sont citées par Skrjabin comme hôtes définitifs : le Fennec (*Fennecus zerda*), le Renard des savanes (*Cerdocyon thous azarae*, *Cerdocyon thous cancrivorus*), le Renard polaire (*Vulpes lagopus*). Hormis le Renard polaire, ces espèces ne sont pas présentes en Europe (*Fennecus zerda* et *Cerdocyon thous cancrivorus* en Afrique du Nord et *Cerdocyon thous azarae* au Brésil).

Ainsi seuls les canidés et certains félidés semblent être en mesure de compléter le cycle parasitaire d'*A. alata*. Contrairement à d'autres espèces d'*Alaria sensu lato*, il semble que les mustélidés ne soient pas des hôtes définitifs. Pour l'ensemble des espèces considérées ici, les prévalences et taux d'infestations sont extrêmement variables selon les lieux de l'étude et peut-être également en fonction du moment de l'étude. Nous remarquerons cependant que les prévalences peuvent être extrêmement élevées (89% chez le loup en Estonie, 88% chez le Renard en Pologne) et que les taux d'infestations peuvent également être considérés comme élevés avec plus de 1000 individus chez un même hôte. Cette forte variabilité est probablement la conséquence d'un cycle qui nécessite des zones humides convenant aux exigences écologiques des hôtes et du parasite.

Le parasite est présent chez les hôtes définitifs sur l'ensemble de l'Europe mais il a aussi été décrit chez des chiens en Chine (73) dans la province du Hunan, chez des chats domestiques en Uruguay (74) et au Brésil (75) ainsi que chez des renards roux au Japon (76). Toutes ces identifications sont sujettes à caution car les localités sont très éloignées des limites de distribution d'*Alaria alata*.

2.2. Les hôtes intermédiaires

2.2.1. Les hôtes mollusques

Les premiers hôtes intermédiaires d'*A. alata* sont des gastéropodes aquatiques de la famille des planorbidae. Malgré de nombreux inventaires parasitologiques réalisés sur des mollusques (77), il n'existe qu'une seule publication rapportant la présence d'*A. alata* chez des mollusques *in natura*.

En Polésie (région partagée entre le Sud de la Biélorussie, le Sud de la Pologne et le Nord de l'Ukraine), des gastéropodes de la famille des *Anisus* et des *Gyraulus* ont été trouvés naturellement porteurs d'*A. alata* (78) : *Anisus vortex*, *Anisus contortus* (appelé *Bathymphalus contortus* par Glöer (8)), *Anisus spirorbis*, *Gyraulus laevis* et *Gyraulus albus*. Cette publication porte sur cinquante années de données et ne donne aucune indication quant aux moyens d'identification mis en œuvre pour les mollusques ou pour les cercaires. Il est possible que tous les mollusques cités ne soient pas hôtes d'*A. alata* mais hôtes de trématodes voisins.

Une publication rapporte des infestations expérimentales réussies où les miracidia ont pénétré le mollusque et se sont développés en sporocystes (pas d'émission de cercaires). Cette publication concerne *Planorbis vortex* (rattaché à *Anisus vortex* par Glöer (8)), *Planorbis marginatus* (rattaché à *Planorbis planorbis* par Glöer (8)) et *P. septemgyratus* (7). Plusieurs espèces ont été testées en conditions expérimentales et se sont révélées réfractaires à l'infestation par les miracidia d'*A. alata* : *Amphipeplea glutinosa*, *Bythinia tentaculata*, *Limnea stagnalis*, *Limnea ovata*, *Limnea palustris*, *Physa fonctinalis*, *Planorbis corneus*, *Planorbis rotundatus*.

Toutes les espèces de mollusques potentiellement hôtes d'*A. alata* sont présentes en France (79) et pourraient donc participer au cycle d'*A. alata* en France. Si les autres hôtes d'*A. alata* sont présents sur une grande variété de biotopes, les mollusques hôtes d'*A. alata* sont présents sur des biotopes précis (80).

Les mollusques cités précédemment comme hôte potentiel d'*A. alata* sont également hôte intermédiaires d'autres trématodes qui ont la forme furcocercaire non occellée et qui peuvent être confondus avec *A. alata*. Nous avons indiqué ici les coparasites d'*Anisus vortex* et de *Planorbis planorbis* d'après plusieurs études menées en Europe centrale (36, 37). Les

espèces citées dans le **Tableau 4** produisent toutes des cercaires de type « furcocercaire à ocellée non pigmentées » similaire à la cercaire d'*A. alata*.

Mollusque	Furcocercaires non ocellées parasites de ce mollusque
<i>Planorbis planorbis</i>	<i>Strigea strigis</i> (81)
	<i>Neodiplostomum spathoides</i> (82)
	<i>Australapatemon minor</i> (83)
	<i>Apatemon gracilis</i> (84)
	<i>Codonocephalus urniger</i> (85)
	<i>Parastrigea robusta</i> (86)
	<i>Strigea falconis</i> (82)
	<i>Strigea sphaerula</i> (Combes, 1980)
	<i>Cotylurus brevis</i> (Combes, 1980)
	<i>Diplostomum micradenum</i> (Combes, 1980)
	<i>Pharyngostomum cordatum</i> (Combes, 1980)
<i>Posthodiplostomum brevicaudatum</i> (Combes, 1980)	
<i>Posthodiplostomum cuticola</i> (Combes, 1980)	
<i>Anisus vortex</i>	<i>Australapatemon burti</i> (83)
	<i>Apatemon gracilis</i> (84)
	<i>Codonocephalus urniger</i> (85)
	<i>Parastrigea robusta</i> (86)
	<i>Strigea sphaerula</i> (Combes, 1980)
	<i>Strigea strigis</i> (Combes, 1980)
	<i>Apharyngostrigea cornu</i> (Combes, 1980)
<i>Strigea falconis</i> (Combes, 1980)	
<i>Neodiplostomum attenuatum</i> (Combes, 1980)	

Tableau 4: Trématodes à furcocercaires à ocelles non pigmentées décrites chez *Planorbis planorbis* et *Anisus vortex*.

2.2.2. Les hôtes amphibiens d'*A. alata*

Plusieurs espèces de grenouilles ont été trouvées naturellement infestées : Grenouille verte (*Rana esculenta*), Grenouille rousse (*Rana temporaria*), Grenouille des champs (*Rana arvalis*), Pélobate brun (*Pelobates fuscus*), Grenouille rieuse (*Rana ridibunda*), (11, 14, 38, 87). Par ailleurs, *A. alata* a été retrouvée chez des crapauds : Crapaud commun (*Bufo bufo*), Crapaud vert (*Bufo viridis*), Crapaud calamite (*Bufo calamita*) (88) et chez les tritons (*Triturus* sp.) (89). Les prévalences peuvent être très élevées (jusqu'à 68%) et les taux d'infestations peuvent atteindre 1600 mésocercaires par individu (88-90). La contamination de ces hôtes intermédiaires n'est peut être pas liée uniquement à la pénétration de cercaires mais aussi au cannibalisme et à la prédation observés chez les amphibiens. Johnson (22) a évoqué cette possibilité pour la transmission d'*A. marciana*e d'amphibien à amphibien. La possibilité d'infestation par consommation de mollusques observée pour certains trématodes reste posée.

La distribution des mésocercaires chez les amphibiens semble être très large : les parasites se logent entre les fibres musculaires, dans les muscles de la langue et des membres, le palais, le cœur, le foie, les reins (38) (Skrjabin, 1965).

Si l'on sait que les furcocercaires peuvent pénétrer la peau d'amphibiens, l'état physiologique ou le degré de maturité peuvent influencer le succès de l'infestation. Johnson (22) a procédé à des infestations expérimentales de grenouilles adultes et de têtards par des cercaires d'*A. marciana*e et a retrouvé des mésocercaires uniquement chez les têtards. Il en a déduit que les grenouilles adultes étaient réfractaires à l'infestation.

La présence de mésocercaires chez les grenouilles ne semble pas avoir d'impact clinique. Des grenouilles adultes infestées par *A. mustelae* au stade têtard ne présentaient pas d'anomalies ni de mortalité anormale alors que d'autres trématodes avaient eu un impact notable (91).

2.3. Les hôtes paraténiques

A l'heure actuelle, l'ensemble des animaux consommant régulièrement ou occasionnellement des amphibiens sont potentiellement des hôtes paraténiques au rang desquels nous retrouvons des reptiles et des oiseaux c'est-à-dire des sauropsidés et également des mammifères. Même si des mésocercaires d'*A. alata* (ou appartenant à une autre espèce d'*Alaria*) n'ont jamais été retrouvé chez les poissons, Leiper en 1920 a rapporté l'obtention expérimentale d'*Alaria* adultes après ingestion par de jeunes chiens de poissons siluroïdes (*Schilbe mystus*). Ces poissons mesurent moins de 35 cm et peuvent consommer d'autres petits poissons et éventuellement des petits batraciens. Ils sont répartis sur l'ensemble des grands bassins africains.

2.3.1. Reptiles et oiseaux

Parmi les reptiles, les espèces suivantes ont été signalées comme porteuses naturellement de mésocercaires d'*A. alata* (**Tableau 5**): Couleuvre à collier (*Natrix natrix*) (92, 93), Couleuvre tesselée (*Natrix tessellata*) (93), Vipère péliade (*Vipera berus*) (93), Vipère d'Orsini (*Vipera ursini*). Si les prévalences sont relativement faibles, en revanche les taux d'infestations sont élevés ce qui tend à dire que la proie héberge un grand nombre de parasites. De plus expérimentalement le Lézard des souches (*Lacerta agilis*) a été infesté avec succès. Chez les reptiles, la distribution des larves est généralement cantonnée aux graisses entourant les muscles de la queue.

Hôte	Pays ou région	Prévalence (%)	Taux d'infestations (min-max)	Référence
Couleuvre à collier (<i>Natrix natrix</i>)	Roumanie	4	72	Mihalca et al., 2007
Lézards	Biélorussie	10.4	>500	Shimalov et al., 2000a
Couleuvre à collier (<i>Natrix natrix</i>)	Biélorussie	21.2	>500	Shimalov and Shimalov, 2000a
Vipère péliade (<i>Vipera berus</i>)	Biélorussie	22.6	20->500	
Coronelle lisse (<i>Coronella austriaca</i>)	Biélorussie	20	>500	

Tableau 5: Prévalence et taux d'infestations des mésocercaires d'*A. alata* chez les reptiles

Un certain nombre d'oiseaux pêcheurs et prédateurs ont été retrouvés avec des mésocercaires *sensu lato* : Hibou Grand Duc (*Bubo bubo*), Héron cendré (*Ardea cirrenea*),

Grue cendrée (*Grus grus*), Goéland cendré (*Larus canus*), Geai des chênes (*Garulus glandarius*).

En conditions expérimentales le maintien des mésocercaires a été observé chez le Canard colvert (*Anas platyrhynchos*), la Chouette hulotte (*Strix aluco*), le Pigeon biset (*Columbia livia*), le Faucon crécerelle (*Falco tinninculus*), la Poule (*Gallus gallus*) et le Combattant varié (*Philomacchus pugnax*) (19).

2.3.2. Les mammifères

2.3.2.1 Les Suidés

Historiquement, les premiers hôtes paraténiques identifiés ont été le porc lors d'inspections de contrôle trichine et les sangliers (*Sus scrofa*) (1-6). Les conditions actuelles de l'élevage porcin a pour effet qu'aujourd'hui l'infestation de cet animal par *A. alata* paraîtrait tout à fait exceptionnelle. En revanche le sanglier semble lui toujours très exposé dans certaines régions.

D'après les premières descriptions chez des porcs, les mésocercaires, parfois en grand nombre se situent préférentiellement entre les fibres du larynx, dans les tissus intermusculaire du diaphragme et des muscles de l'abdomen. Deux formes sont trouvées : des formes libres et des formes occupant un kyste ovoïde à parois minces. Cette deuxième forme est cependant considérée comme plus rare (6). D'autres investigations menées par Baars (94) font état non pas d'un kyste mais de canaux tapissés d'une mince couche de tissus conjonctif causés par l'activité du parasite et la réaction de l'hôte. Bugge (10) signale la présence de mésocercaires libres dans la cavité abdominale ainsi que dans le tissu adipeux du péritoine. Les données sur la circulation des mésocercaires chez les populations de sangliers seront discutées dans le chapitre portant sur les expérimentations sur le sanglier.

2.3.2.2 Les autres mammifères

Parmi les mammifères, la famille des Mustélidés représente une famille importante en tant qu'hôtes définitifs ou intermédiaires chez d'autres espèces d'*Alaria* outre-Atlantique. Le Vison d'Amérique (*Mustela vison*), parmi d'autres espèces peut agir comme troisième hôte intermédiaire ou comme hôte définitif. En Europe, bien que des mésocercaires aient été décrites chez de nombreuses espèces de mustélidés, aucune métacercaire et aucun adulte n'ont été retrouvés que ce soit dans les poumons et dans l'intestin grêle.

Tous les mustelidés européens sont des hôtes paraténiques : le Putois (*Mustela putorius*) (95), l'Herminette (*Mustela erminea*) (96), la Loutre (*Lutra lutra*) (97), le Vison européen (*Mustela lutreola*) et le Vison américain (*Mustela vison*) (98). On retrouve également la Martre (*Martes martes*) et la Zibeline (*Martes zibelina*). Les prévalences, d'après les rares études disponibles sont toujours inférieures à 10%.

Chez ces espèces, les mésocercaires semblent présenter une distribution large. Sudarikov a retrouvé des mésocercaires dans les poumons de loutres (99), le poumon étant habituellement le site préférentiel des métacercaires chez l'hôte définitif.

D'autres espèces mammifères ont été trouvées infestées par des mésocercaires d'*A. alata* : le Hérisson (*Erinaceus europaeus*), le Blaireau (*Meles meles*), le Chat (*Felis sylvestris dom*), la Mouflon (pas d'espèce précisée), l'Ours brun (*Ursus arctos*), la Taupe (*Talpa europaea*) (100) et le bœuf (*Bos taurus*) ((19)). Enfin, de nombreux rongeurs ont été trouvés porteurs de mésocercaires *in natura* : le Rat (*Rattus norvegicus*), la Souris (*Mus musculus*), le Desman de Russie (*Desmana moscata*), le Campagnol terrestre (*Arvicola terrestris*), le Campagnol des champs (*Microtus arvalis*), le Mulot rayé (*Apodemus agrarius*) (19, 101). Le rat et la souris ont été infestés expérimentalement à plusieurs reprises avec des mésocercaires et se sont révélés être de bons modèles utilisables en routine (19, 102).

2.4. Le potentiel zoonotique des *Alaria* spp.

Depuis les premières découvertes du stade mésocercaire chez des sangliers et des porcs en France et en Allemagne, toute carcasse présentant le parasite a été détruite au vu du risque pour l'Homme. Néanmoins jusqu'à maintenant, aucun cas humains d'alariose due à *A. alata* n'avait été détecté. Depuis 2000, plusieurs cas d'alariose à *A. alata* ont été suspectés en Pologne suite à l'ingestion de viandes de sanglier ou d'oie mal cuites. Aucune information précisant les méthodes ayant permis le diagnostic n'est donnée. Les symptômes décrits sont proches de ceux observés en cas de trichinellose : fièvre, inflammation, œdème, difficultés à respirer (103). Même si des doutes subsistent, plusieurs éléments indiquent qu'*A. alata* doit être considéré en premier lieu comme un parasite présentant un potentiel zoonotique.

En 1961, Odening a nourri un singe Rhésus (*Macaca mulatta*) avec de la viande de porc et de sanglier infestée par des mésocercaires d'*A. alata* afin d'observer ou non la réceptivité de cette espèce. A J+38 post-ingestion, le singe présentait des signes cliniques de mésocercariose (sans plus de précisions). A l'autopsie, des mésocercaires étaient présentes dans un grand nombre d'organes : les tissus adipeux du cœur, le péricarde, le foie, le diaphragme, le mésentère entre l'artère carotide et l'œsophage, les tissus adipeux sous-cutanés au niveau des côtes distales, les muscles intercostaux, les tendons de l'épaule et les muscles du cou et de la gorge. Odening a considéré à travers cette expérimentation que l'Homme, en tant que primate, pouvait être réceptif à une infestation par des mésocercaires d'*A. alata* contenues dans les viandes de suidés et de ce fait que ce parasite présentait un risque pour la santé humaine. Shoop, Font (24) a procédé à une expérience similaire en infestant une guenon Ouistiti (*Callithrix jacchus*) allaitant trois jeunes avec des mésocercaires d'*A. marciana*e (sous-genre *Alaria*). Chez la guenon adulte, l'auteur a observé des distributions similaires à celle observées par Odening. L'auteur a également observé que sur les trois jeunes, le premier qui était mort avant de pouvoir téter n'était pas porteur de mésocercaires mais que les deux autres qui avaient tété étaient porteurs de mésocercaires. Sur les 600 mésocercaires ingérées par la mère, les jeunes avaient récupéré un total de 115 exemplaires. Une même expérience a démontré le même phénomène chez des souris (26). Cette expérience montre qu'il y a un risque de transmission par voie mammaire de mésocercaires chez les hôtes paraténiques d'*A. marciana*e. Une telle expérimentation n'a jamais été menée pour *A. alata* mais la proximité entre *A. marciana*e et *A. alata* suggère qu'une telle voie de transmission pourrait être envisagée chez *A. alata*.

Aux Etats-Unis, plusieurs cas d'alariose ont été publiés. Parmi les *Alaria* du continent nord-Américain, *A. americana* a été décrit comme zoonotique (104, 105). Dans plusieurs cas, une localisation oculaire a été observée, entraînant une rétinite avec lésions pigmentées ainsi que des neurorétinites diffuses et subaiguës. Les patients ont été traités au laser (pour tuer le parasite) ou ont été opérés pour retirer le parasite manuellement. Dans les deux cas publiés, les patients étaient originaires d'Asie et la source suspectée était la consommation de chair de grenouille mal cuite. Trois autres cas de localisation oculaire ont été rapportés mais sans identification de l'espèce incriminée. Dans deux cas sur les trois, la contamination est de type ingestion et pour le troisième cas l'infestation se serait produite lors de la préparation de cuisses de grenouilles.

Un cas fatal d'infestation systémique à *A. americana* (reconnu comme synonyme d'*A. marciana*) suite à la consommation probable de chair de grenouille mal cuite a été publié. Le patient présentait les signes cliniques suivants : toux, dyspnée (difficulté à la respiration), hémoptysie, fièvre (39°C), suées, rythmes respiratoire et cardiaque augmentés, purpura (boutons rouges non palpables et quelques mm de diamètre) sur l'ensemble du corps, emphysème sous-cutané. La biopsie pulmonaire a montré des points hémorragiques de 1 à 3cm de diamètre. Les mésocercaires étaient présentes dans la paroi stomacale, les noeuds lymphatiques, le foie, le myocarde, le pancréas, les tissus adipeux, la rate, les reins, les poumons, le cerveau et la moëlle épinière. La mort a été provoquée par une coagulation intravasculaire disséminée (coagulation généralisée et aiguë). Le patient est décédé huit jours après le début des symptômes. Il est estimé que le patient avait consommé plusieurs milliers de parasites. Un autre cas du à *A. americana* (= *A. marciana*) a été publié en 1993. Le patient avait souffert de troubles respiratoires au retour d'un voyage de chasse et la biopsie d'un nodule sous-cutané, réalisée un an plus tard a permis de mettre en évidence une mésocercaire. Un dernier cas de mésocercariose sous-cutanée est rapporté. *Alaria americana* est une espèce appartenant au sous-genre *Alaria*, comme *A. alata*.

Que ce soit pour les *Alaria* américaines ou européenne, la parasitose est rare et peu connue des médecins. Par ailleurs, les doses infestantes sont probablement faibles et les symptômes sont non spécifiques. Ceci a certainement eu pour conséquence un sous-diagnostic de la parasitose et l'impact sanitaire des alarioses est sous évalué. Tous les éléments évoqués ici montrent que le potentiel zoonotique d'*A. alata* n'est pas à négliger malgré le faible nombre de cas humains détectés pour cette espèce ou pour *A. marciana*.

2.5. Réglementation actuelle concernant l'analyse et le traitement des carcasses de sanglier

En France, il n'existe de réglementation pour *A. alata* que pour la présence de mésocercaires chez les sangliers sauvages. La réglementation concernant ce parasite est donnée par la note de service DGAL/SDSSA/2008-8037 (106). Cette note de service fixe les modalités de gestion des carcasses lors de la découverte d'*A. alata*. Toutefois il n'y a pas de méthode réglementaire spécifique pour la détection de mésocercaires. Le parasite ne peut être identifié qu'au cours des analyses réglementaires en vigueur pour la détection de *Trichinella* sp. dans les viandes de sanglier. Les modalités de ces analyses sont fixées par le règlement européen EC-2075/2005 (107) : l'analyse est effectuée par digestion pepsique en milieu acide (HCl) sur des échantillons de muscle. Cette analyse peut être effectuée sur des pools de 20 sangliers, des mini-pools de quelques sangliers ou en individuelle. Lorsqu'une ou plusieurs mésocercaires sont trouvées, les parasites sont envoyés en éthanol à 70° au laboratoire national de référence (LNR) pour les parasites transmis par les aliments au sein du laboratoire de santé animale de l'Anses. Ce laboratoire est le seul habilité à confirmer l'identification. En attente des conclusions de ce laboratoire, la carcasse ou le pool incriminé sont considérés comme « non négatifs ». La confirmation du laboratoire est basée sur des critères morphologiques. En cas de confirmation d'un résultat individuel positif, la carcasse doit être saisie. En cas de résultat individuel non négatif (pas de confirmation par le LNR) un traitement assainissant est recommandé. En cas de pool positif ou non négatif, le détenteur a le choix entre un traitement assainissant pour toutes les carcasses ou une deuxième analyse en mini-pool ou en individuelle. Les méthodes actuellement préconisées sont la congélation et la cuisson. Il est recommandé d'atteindre une température de 74°C à cœur pendant 5 minutes pour éradiquer *A. alata*. Les nouvelles modes de cuisson des venaisons tels que le barbecue ou les carpaccios sont fortement déconseillés pour le sanglier. Concernant la congélation, une température de -22°C à cœur pendant 10 jours minimum est recommandée. Ces méthodes restent empiriques et ne s'appuient que sur la réglementation établie pour la trichine.

En Allemagne et en Suisse, des règlements spécifiques désignent les sangliers porteurs de mésocercaire comme impropres à la consommation humaine (108, 109).

3. Conclusion et perspectives

Les données bibliographiques dont nous disposons sur *A. alata* sont fragmentaires hormis les prévalences observées chez les hôtes définitifs carnivores. Aussi il paraît opportun de préciser et d'analyser les données acquises récemment pour le stade mésocercaire et en particulier sur la viande de venaison soumise à des contrôles en cas de commercialisation

L'identification des mollusques hôtes ainsi que les interactions entre *A. alata* et ces hôtes s'appuient uniquement sur deux publications (7, 14). Elles rapportent le succès d'infestations expérimentales qui contrastent avec l'absence d'identification de furcocercaires d'*A. alata* chez des mollusques prélevés *in natura*. Le passage par le mollusque apparaît comme l'étape limitante du cycle : en effet la spécificité du parasite est particulièrement étroite pour ce stade. Pour atteindre ces objectifs, la mise en place d'outils d'identification autre que la morphologie des cercaires (chétotaxie) apparaît nécessaire. De plus pour les mollusques les critères morphologiques tout du moins externe peuvent engendrer des confusions pour des non spécialistes. Aussi nous avons retenu une double approche moléculaire pour le parasite mais aussi pour le mollusque hôte intermédiaire

La grande variété d'hôtes paraténiques est bien documentée avec de nombreuses espèces signalées parmi les mammifères, les oiseaux et les reptiles. Peu d'études intéressent les relations entre la mésocercaire et l'hôte paraténique hormis le Sanglier qui représente une source potentielle d'infestation pour l'Homme. Le franchissement de la barrière d'espèce a déjà été mis en évidence mais son succès n'a jamais véritablement été évalué. Par ailleurs, la persistance et la distribution de mésocercaires chez un hôte paraténique n'ont été que rarement abordées. Enfin, aucun modèle de laboratoire n'a été testé pour l'étude des relations mésocercaire-hôte paraténique.

Les relations entre mésocercaire et amphibiens sont plus documentées. Toutefois il apparaît intéressant au sein d'un même biotope d'apprécier le rôle de chacun d'entre eux. De nombreuses espèces d'amphibiens ont été décrites comme hôtes intermédiaires d'*A. alata* mais il est probable qu'une espèce soit l'hôte préférentiel du fait de sa sensibilité à l'infestation ou d'une exposition optimale en fonction de la saison ou de la fréquentation d'un biotope privilégié. Par ailleurs, il n'est pas établi pour *A. alata* que tous les stades (têtards ou grenouilles) chez les amphibiens soient réceptifs de la même manière à la réussite de l'infestation.

Chapitre 2 *Alaria alata* en France

1. Données antérieures

Très peu de données sont disponibles sur la présence d'*A. alata* en France avant 2004. Au stade adulte la première mention et description est celle de Dujardin en 1845 sur des exemplaires retrouvés chez des renards dans la région rennaise. Il faut attendre près de cent cinquante ans pour de nouvelles mentions de ce parasite chez des renards roux d'Alsace (110). Si des explorations d'un grand nombre d'intestins de renard ont été réalisées en France, dans le cadre de l'épidémiologie de l'échinococcose alvéolaire, il est rarement fait mention de la présence d'adultes d'*A. alata*. Pourtant sa présence a été observée dans le département du Nord et dans les Ardennes (111). Aussi le portage est très certainement beaucoup plus répandu sur le territoire national.

Le stade mésocercaire fut observé pour la première fois par Brumpt (92) qui décrit la présence de mésocercaires d'*A. alata* chez dix couleuvres à Collier (*Natrix natrix*) en Corse. A l'époque, l'auteur ne sait pas qu'il s'agit de mésocercaires d'*A. alata* et nomme le parasite *Alaria tetracystis* (Gastaldi, 1854) du fait de leur forte ressemblance avec les mésocercaires décrites chez une grenouille verte par Gastaldi. L'auteur considère que le parasite est très présent dans la région de Porto-Vecchio car dix couleuvres sur dix analysées présentaient le parasite. La deuxième observation est celle de Dollfus et Chabaud en 1953. Cette observation est très documentée et représente la première mention de mésocercaire d'*Alaria alata* chez le Sanglier.

Fin 2003, la présence de mésocercaire sur des sangliers de l'Aube fut détectée par le laboratoire vétérinaire de l'Aube et confirmé par Hubert Ferté dans le cadre d'un partenariat s'inscrivant dans la surveillance sanitaire de la faune sauvage (réseau SAGIR/ONCFS). Un travail de thèse pour l'obtention du doctorat de pharmacie fut initié (112). C'est simplement fin 2004 que les autorités sanitaires commencèrent à s'intéresser à cette « zoonose » potentielle : de la viande de venaison, destinée à être commercialisée, fut retrouvée positive. Une enquête diligentée par la DGAL a été organisée par la direction des services vétérinaires de l'Aube et une évaluation du risque fut émise par les autorités compétentes qui ont considéré le risque comme négligeable pour l'homme.

2. Données actualisées (2007 à 2011)

Depuis 2006, toute détection de mésocercaire par les laboratoires départementaux engendre une alerte et l'envoi des mésocercaires en étanol 70° au laboratoire national de référence pour les parasites transmis par les aliments. Ce réseau de détection a permis de recenser tous les sangliers chassés et porteurs d'*A. alata* pour la période de 2007 à 2011 et d'analyser leur répartition et leur évolution. La confirmation spécifique de ces cas a été apportée par analyse moléculaire et séquençage de domaines ribosomiaux (D2 et ITS2) sur la base de vers adultes récoltés précédemment. L'ensemble des résultats relatifs à l'étude des cas rapportés entre 2007 et 2009 est présenté dans un article. Les résultats de 2010 et 2011 sont présentés à la suite de l'article (113).

Portier J, Jouet D, Ferté H, Gibout O, Heckmann A, Boireau P, *et al.* New data in France on the trematode *Alaria alata* (Göeze, 1792) obtained during *Trichinella* inspections. *Parasite*. 2011;18(3):271-5.

Pour les années 2010 et 2011, la répartition des cas est sensiblement la même que précédemment. Les répartitions des déclarations en 2010 et 2011 sont présentées respectivement par la **Figure 7** et la **Figure 8**. Le département le plus touché reste le Bas-Rhin. Au total 158 cas dont 131 dans le Bas-Rhin ont été recensés en 2010.

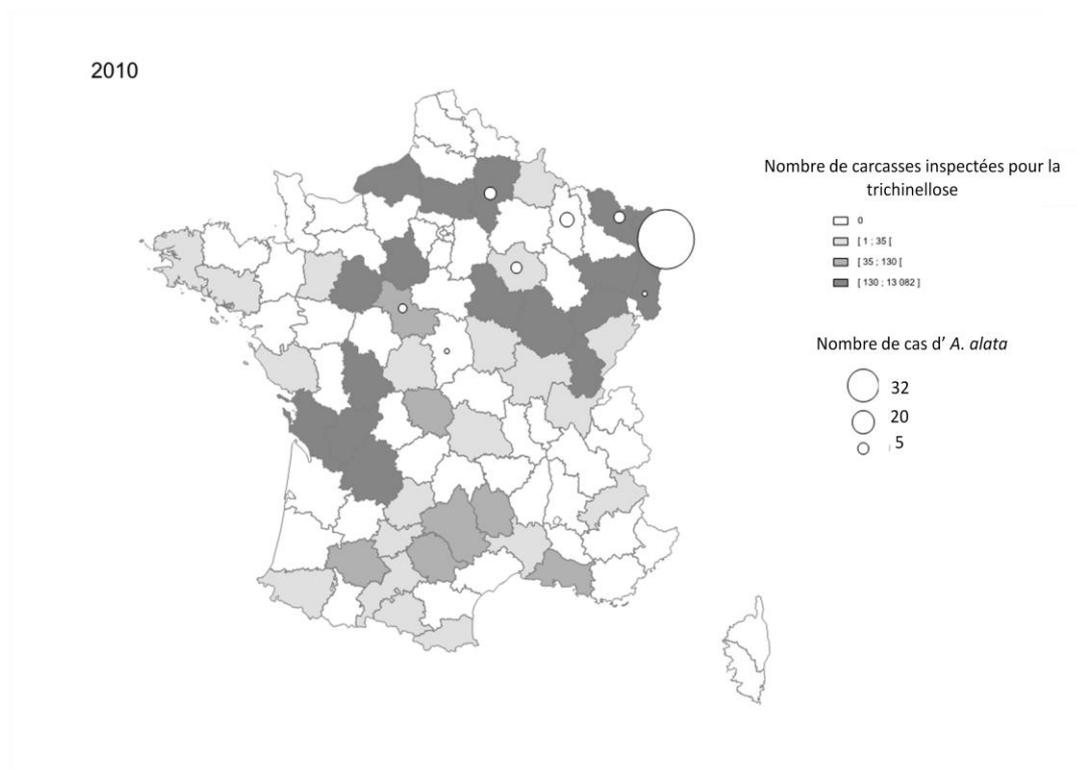


Figure 7: Répartition des cas d'*A. alata* chez les sangliers analysés pour la trichinellose en 2010.

En 2011, il y a eu 137 cas dont 89 dans le Bas-Rhin et 101 cas dont 71 dans le Bas-Rhin entre le premier janvier et le premier septembre 2012.

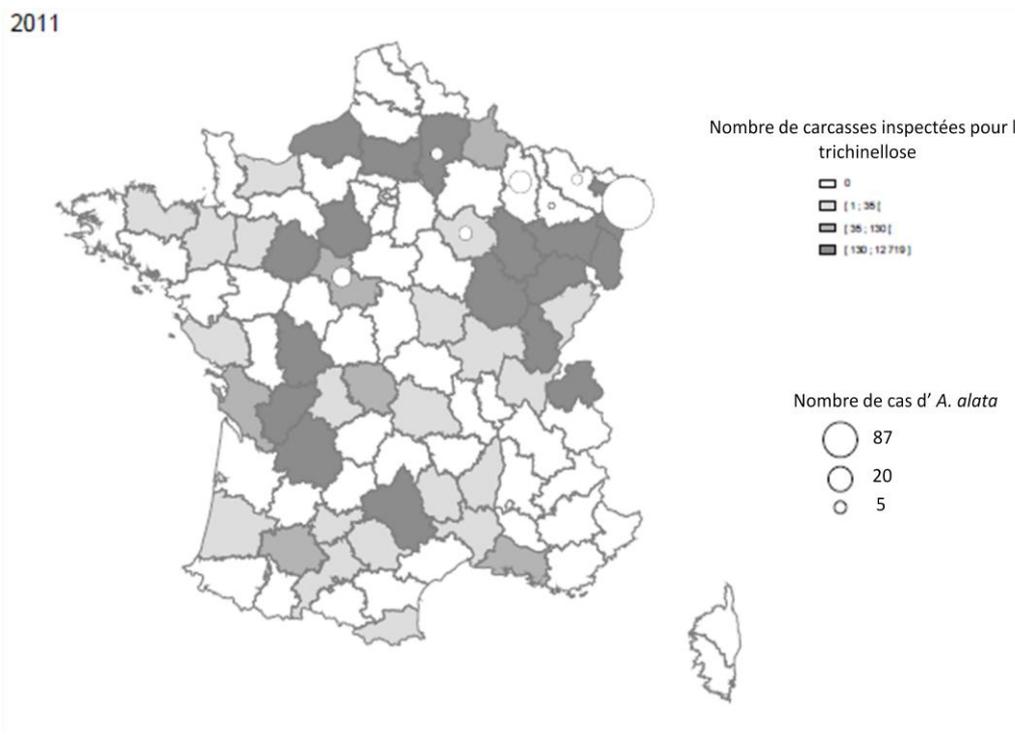


Figure 8: Répartition des cas d'*A. alata* chez les sangliers analysés pour la trichinellose en 2011.

L'analyse des cas depuis 2007 montre qu'ils sont surtout répartis dans l'Est de la France, surtout dans le département du Bas-Rhin. Dans ce département, une zone de surveillance pour la Peste Porcine a été mise en place. Sur cette zone, qui couvre une grande partie du département, tous les sangliers chassés sont analysés pour la trichine et pas uniquement ceux qui entrent dans des circuits commerciaux. Il y a une surveillance particulièrement accrue pour ce département qui explique au moins en partie le nombre de cas bien supérieur aux autres départements. Le nombre élevé de cas dans ce département témoigne aussi de la forte circulation du parasite au sein d'une population d'hôtes paraténiques. L'analyse des données montre que les sangliers positifs proviennent souvent de régions à forte densité de chasse dans l'Est de la France. D'autres régions ont une forte activité de chasse mais ne présentent aucun cas. Il est possible que le parasite soit absent de ces régions mais il est plus probable que le parasite ne soit pas détecté par manque d'information des laboratoires locaux. Lorsque la recherche systématique de la trichine a été enclenchée, la création d'essais inter-laboratoire pour former les laboratoires à la détection de la trichine a entraîné une nette amélioration de la sensibilité des recherches en laboratoire (114). Ceci montre tout l'intérêt de la formation et de l'information des laboratoires

concernant la présence potentielle de mésocercaires lors de tests trichine. La prise de conscience de la possibilité de détecter *A. alata* lors d'analyses trichines est probablement la raison majeure à l'augmentation des détections des carcasses positives par des laboratoires qui avaient déjà identifié le parasite. En 2011 et 2012, toutes les déclarations proviennent de quatre laboratoires départementaux : le laboratoire départemental d'analyse du Bas-Rhin, le laboratoire départemental de diagnostic vétérinaire de l'Aisne, le laboratoire départemental de la Sarthe et le laboratoire vétérinaire départemental du Haut-Rhin. Les manipulateurs de ces quatre laboratoires sont conscients de l'existence d'*A. alata*. L'analyse de la répartition d'*A. alata* à travers les déclarations de carcasses porteuses de mésocercaires n'est pas révélatrice de la répartition réelle du parasite du fait de la disparité de l'intensité de chasse et d'analyse sur l'ensemble du territoire français.

3. Etude épidémiologique de la circulation d'*A. alata* au sein des populations de sangliers

Dans le Bas-Rhin, un épisode de peste porcine classique a mené les autorités à mettre en place un suivi des populations de sanglier. La mise en place d'un contrôle sanitaire par sérologie fut complétée par des analyses trichine systématiques donc indirectement par la recherche d'*Alaria alata*. Aussi pour la majorité des animaux des commémoratifs ont été enregistrés par la DDPP67 (Direction départementale de la protection des populations du Bas-Rhin). Cette base de données regroupe toutes les informations sur les sangliers chassés entre avril 2007 et novembre 2010 ainsi que leurs résultats concernant la présence de mésocercaires. La DDT67 a aussi mis à notre disposition les fichiers shape (format de cartographie) du découpage en lots de chasses de la zone de surveillance. A partir de ces informations nous avons pu envisager une étude descriptive de la circulation d'*A. alata* chez les sangliers du Bas-Rhin.

Les résultats montrent une forte circulation du parasite chez le Sanglier (dans certaines zones, la prévalence pourrait dépasser les 30%), qui semble augmenter au cours des années. Nous avons mis en évidence un cluster géographique autour de la vallée du Rhin qui correspond à l'ensemble des zones humides autour du Rhin et qui montre que le parasite est fortement inféodé aux milieux humides ce qui est en accord avec le portage des formes adultes observés par Pesson et Kristensen. L'analyse des relations hôte-mésocercaires dégage des périodes à risques au printemps correspondent à la présence de têtards et d'amphibiens adultes en grand nombre sur les zones humides. L'ensemble des résultats de cette étude est présenté dans un article soumis à Veterinary Research.

Epidemiological study of the circulation of *Alaria alata* mesocercaria in wild boar populations in the contrasted landscapes of the Rhine valley in France

Authors: Portier Julien^{1, 3}, Durand Benoît², Lacour Sandrine¹, Pascal Boireau¹, Féré Hubert³, Vallée, Isabelle*¹

¹ ANSES, Laboratory for animal health, UMR BIPAR, Maisons-Alfort, France.

² ANSES, Laboratory for animal health, Epidemiology unit, Maisons-Alfort, France.

³ EA 4688-USC VECPAR, UFR Pharmacie, University of Reims-Champagne Ardenne, France.

Short title: epidemiology of the circulation of mesocercaria in wild boars

Abstract

Among the latest emerging trematodes in Europe is the diplostomid *Alaria alata* for which many studies have recently been started in different European countries with a particular scope on the relations between the mesocercarial stage and wild boars, a paratenic host to this parasite representing a potential risk for Humans. Among the latest developments, a new detection method has been designed and tested in field conditions and the resistance of mesocercaria to freezing was assessed. However little is known on the circulation of mesocercaria in wild boar populations and on the role played by this specific host in the life cycle of the parasite. An original epidemiological study covering wild boar populations on a contrasted landscape in the Rhine valley is described in this paper. Results bring new information on boar/mesocercaria relations, identifying suitable seasons and areas for the infection of wild boars by mesocercaria. This study helps to assess the risk of alariosis for humans and identifies areas at risk.

Keywords

Alaria alata, mesocercaria, epidemiological study, geographical cluster.

Introduction

Emerging or reemerging zoonoses are often considered to originate from wildlife and helminth parasites are not an exception (115, 116). In Europe, one of the latest emerging trematodes is the digenean trematode *Alaria* sp. (18). The infectious stage for humans is the mesocercaria (also called mesocercaria for *Distomum musculorum suis*) (117), a nearly unique stage in trematode life cycle, known to infect humans only for the *Alaria* genus.

For the completion of this parasite's cycle, two intermediate hosts are necessary: a Planorbid snail (cercarial stage)(118) and an amphibian host (mesocercarial stage) (7, 14, 40). The definitive hosts are canids, foxes being often described as the most suitable (19). Paratenic hosts can enter the cycle: mesocercaria from amphibians can survive in many mammalian, avian and reptile species and reenter the cycle when these hosts are eaten by canids (19). Among other species, wild boars (*Sus scrofa*) are paratenic hosts to *Alaria alata* (102), supposedly acting more as satellite hosts than as major actors of the parasite's life cycle.

In Europe, the mesocercarial stage of *Alaria alata* has been known to infect wild boars since the late 19th century (1-3, 5, 102). According to the regulation, all wild boar carcasses entering commercial circuits undergo a *Trichinella* inspection by a method based on the pepsic digestion of meat samples from predilection muscles (107). Though this method was originally designed for the control of *Trichinella* sp. in meat, mesocercaria can also be detected during the process. In Europe the implementation of a systematic *Trichinella* inspection has led to numerous discoveries of wild boar carcasses bearing mesocercaria (102, 119-121). The French department that has been most confronted to the problem posed by mesocercaria in wild boars is the Bas-Rhin department in the East of France. In this particular area, more than 40 cases of infected carcasses are reported since 2008 and this number increases steadily each year (113).

Such repeated discoveries raise concerns about the public health risk presented by mesocercaria in wild boars' meat. One publication reports human cases of alariosis due to the presence of *A. alata* mesocercaria in wild boars' meat. Unfortunately, no indication regarding the number of cases or the means used for the diagnosis of alariosis was reported (103). However, several published and documented cases of alariosis due to American species have been reported with dramatic outcomes (117, 122). Considering *Alaria alata*, rats and mice

were successfully infected with mesocercaria isolated from wild boars showing that mesocercaria are efficient in crossing species barriers (102). Moreover, Odening (123) experimentally infected a Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) with mesocercaria from wild boars and found the parasite in several vital organs including the heart. Several other species (hens, geese, falcons and owls) were experimentally infected in the former Union of Soviet Socialist Republics (19). Since the new discoveries in the early 2000, many works have been published on the mesocercaria/wild boar interactions, notably, new detection methods were designed (124, 125) and resistance to freezing has been tested (113). However, these studies have only taken into account these interactions at the scale of the individual wild boar.

Infection by mesocercaria does not seem to have an impact on the health of wild boars, were it be at an individual or population scale. The preoccupation regarding the presence of mesocercaria in this species is only motivated by the potential risk for humans linked to the apparent emergence of this parasite in wild boars and the rise of new cooking methods (barbecuing) for game meat. Though wild boars are not an obligatory host to mesocercaria and their suspected sources of infection (amphibians) are not the heart of their diet, high prevalences and heavy parasite burdens have been observed in different European landscapes(18, 121, 126). The originality of the relations between mesocercaria and this specific paratenic host and the preoccupations regarding risks for human health called for a new approach at a population scale. Indeed such a level of analysis is necessary to understand the circulation of mesocercaria in wild boar populations and give guidelines for the control of this parasite. The prevalence of mesocercaria in wild boars hunted on a contrasted landscape within the Rhine valley (Bas-Rhin, France) was evaluated with report at individual level (sex, age) and geographic variations, as well as seasonal and temporal trends. This study is the first that attempts to characterize the relations between mesocercaria and wild boar populations taking into account several factors in an area where *Alaria alata* can be considered enzootic.

Material and methods

Data collection

All hunted wild boars in the Bas-Rhin department are submitted to compulsory *Trichinella* inspection allowing therefore the detection of *Alaria alata* in meat. Beside this analysis, data are collected including age, sex, weight, date and place of capture. Wild boar's age was categorized in 3 classes (<1 year; 1-2 years and >2 years) according to general aspect

and dentition. The <1 year age class was further subdivided into two age classes: less than 6 months and 6 months to 1 year. The division was made using weight: wild boars weighing less than 21kg (full body) or less than 16kg (without offals) were considered less than 6 months old. These results are all entered into a database used for this study from 1st April 2007 (as no wild boar bearing *A. alata* mesocercariae was detected before April 2007) to 14th September 2011. The surveillance area delimited for this study was bounded in the East by the Rhine river and in the West by the Vosges mountains. This surveillance area is marked by a continental climate. A total of 27,582 wild boars were thus included in the study.

Location of the hunt for each wild boar was given as a hunting area. For the purposes of hunting management, the Bas-Rhin department is subdivided in hunting areas defined by specific boundaries, which are managed locally by different hunting societies. The department was subdivided into 1502 hunting areas, 502 of which are concerned by this study. The base map of hunting areas was obtained from the departmental direction of territories. For each hunting area, elevation of the area centroid was extracted from the ASTER global digital elevation model (ASTER GDEM is a product of METI and NASA)

Mesocercariae detection

A. alata mesocercariae were detected in wild boar according to the method used for *Trichinella* meat inspection. The samples used for this method were chiefly tongue and diaphragm. The anterior limb was used if a second analysis was needed for individual carcass analysis and/or confirmation of positive result. At least 5gr of meat without grease and connective tissues were used per animal. The artificial digestion method was used as described in EC regulation 2075/2005 (107). This method relies on a pepsin-hydrochloric acid (HCl) artificial digestion with a magnetic stirrer. Samples for one analysis must weigh 100gr and can be composed of one individual or be a pool of up to 20 individuals.

Statistical analysis

The overall prevalence was computed at the animal and hunting area levels. A hunting area was defined as positive if at least one positive wild boar had been killed there, and negative otherwise. Exact binomial confidence intervals were calculated. The association between elevation and prevalence was analyzed using ten elevation classes based upon the 10% percentiles. The difference of mean elevation between negative and positive hunting areas was tested using a Student's T test.

A space-time scan statistic with a Bernoulli model (127) was used to identify, among the 502 hunting areas included in this study, clusters with high risk for mesocercaria presence in wild boars. This statistical approach is based upon the computation of the relative risk for mesocercaria presence between the inside and the outside of a cylinder, the base and height of which represent space and time, respectively. Various cylinder locations, diameters and heights are analyzed to determine those with the highest relative risk. The SaTScan v9.1. software was used (128). As the study area is a border area, a 2km square grid was used to define the spatial locations of the tested cylinders. This allowed testing candidate clusters having a center located outside the study area. The maximum cluster size was set to 50% of tested boars. Overlap between primary and secondary clusters was not allowed.

The association between presence of mesocercaria and various covariates was then analyzed in exposed wild boars, i.e. in animals from positive hunting areas. The studied covariates were the age class (<6 months, 6 months-1 year, 1-2 years, >2 years) and the sex of the animal, the season and year of the kill, and the fact that the animal had been killed inside a cluster identified by the space-time permutation scan statistic (binary variable). Because it may induce false negative results, the delay between the date of wild boar death and that of laboratory analysis was also included as a covariate. In order to assess the impact of having excluded pooled tests without individual identification on the results, a scenario was investigated that assumed the presence, in each of these pools, of a single positive wild boar. The association between each of the covariates and the presence of mesocercaria was first studied. Then, to distinguish the effects of each variable, covariates for which the p-value was below 0.20 were included in a multivariate logistic model. The absence of multi-collinearity was tested by verifying that the variance inflation factor was low (<5) for each of the covariates. As the prevalence levels were low, the odds-ratios estimated by the logistic regression could be interpreted as relative risks. Statistical analyses were performed using the R software (129). Maps were produced using Quantum GIS (130).

Results

Global prevalence for mesocercaria positive wild boars

Of the 27,582 wild boars included in the study, 169 were identified as positive for mesocercaria. Animal-level prevalence for the whole study was thus 0.6% (95% confidence interval [CI]: 0.5%–0.7%). Positive wild boars were killed in 61 of 502 hunting areas.

Geographical distribution of positive wild boars

Elevation ranged from 106 to 446 m. The average elevation of positive hunting areas (135 m.) was significantly lower than that of negative areas (226 m.) ($p < 0.0001$). The animal-level prevalence clearly decreased with increasing elevation, from 4.1% below 126 m to 0.02% above 317 m. At the hunting area level, differences were more marked as the proportion of positive areas decreased from 55% below 126 m to 2% above 317 m (Table 1).

Elevation (m)	Individuals			Hunting lots		
	Positive	Total	Prevalence (%)	Positive	Total	Prevalence (%)
105-126	92	2232	4.1	28	51	54.9
126-140	46	3042	1.5	14	50	28
140-157	18	3484	0.5	11	50	22
157-180	12	2015	0.6	7	50	14
180-207	0	1333		0	50	
207-228	0	2052		0	50	
228-256	0	2924		0	50	
256-287	0	3100		0	50	
287-317	0	3378		0	50	
317-446	1	4022	0.0	1	51	2.0
Total	169	27582		61	502	

Table 1: impact of the elevation (m) on the prevalence of positive boars and on the prevalence of lots where at least one positive boar was found

A single high-risk cluster was identified ($p < 0.0001$), that included 68 of the 502 hunting areas, for the whole time period (2007-2011). The cluster's diameter was 38 km but its center was clearly located eastern to the study area, the hunting areas composing the cluster being located in lowlands along the Rhine valley (Figure 1). The number of positive animals inside the cluster was 143, corresponding to 85% of all the positive wild boars, and to a within-cluster prevalence of 4.5% (3.8%-5.3%). This count of observed cases was 7 times higher than the expected number of cases under the null hypothesis of spatial and temporal homogeneous risk. The corresponding relative risk for mesocercaria presence in killed wild boars was 42. Covariate values were available for 4,907 animals killed in 61 positive hunting areas. Among these, 161 were positive, corresponding to a prevalence of 3.3% in exposed wild boars (i.e. animal killed in positive hunting areas) (95% CI: 2.8%-3.8%). In order to give

an estimated prevalence for areas where the presence of *A. alata* can be considered enzootic, we selected the hunting areas with positive wild boars for at least three years and with >10 wild boars tested each year. Four hunting areas were thus obtained (lots named A, B, C and D), located inside the cluster, with average prevalence rates of 5.1%, 8.9%, 17.2% and 21.7%.

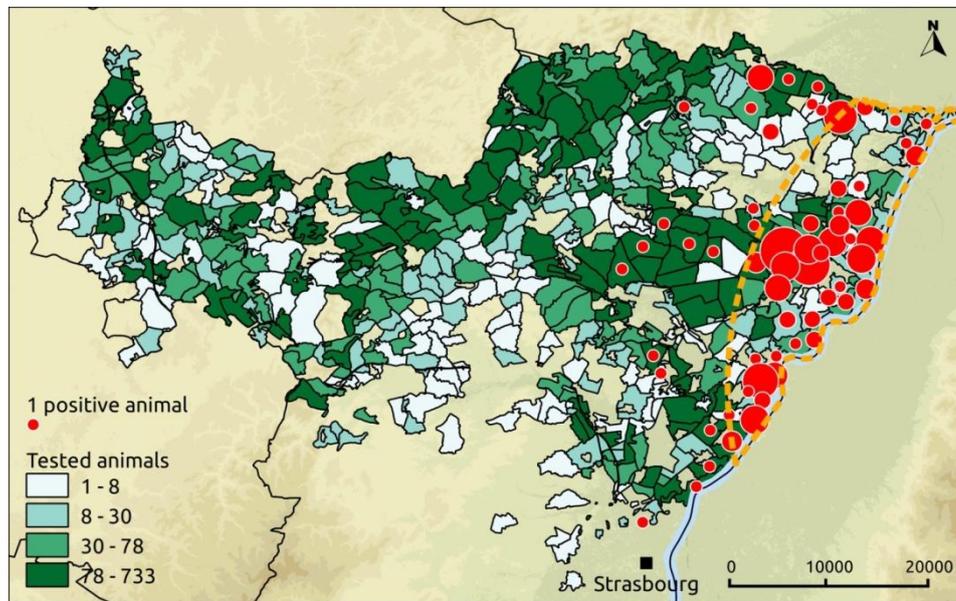


Figure 2: distribution of wild boars positive for mesocercaria in the Classical Swine Fever surveillance zone (Bas-Rhin department, France) and density of analyzed boars per hunting lot. A cluster was found around the Rhin valley (limited by orange line).

Analysis of prevalence according to age

The proportion of positive wild boars varied according to the age-class. Despite this association was not statistically significant ($p=0.07$), an increase of prevalence with increasing age was observed from <6 months (prevalence: 1.7%) to 1-2 years (prevalence: 3.9%). For these three age classes, the χ^2 test for trend in proportions was significant ($p=0.01$). Prevalence slightly decreased in the oldest animals (Figure 2a and Table 2).

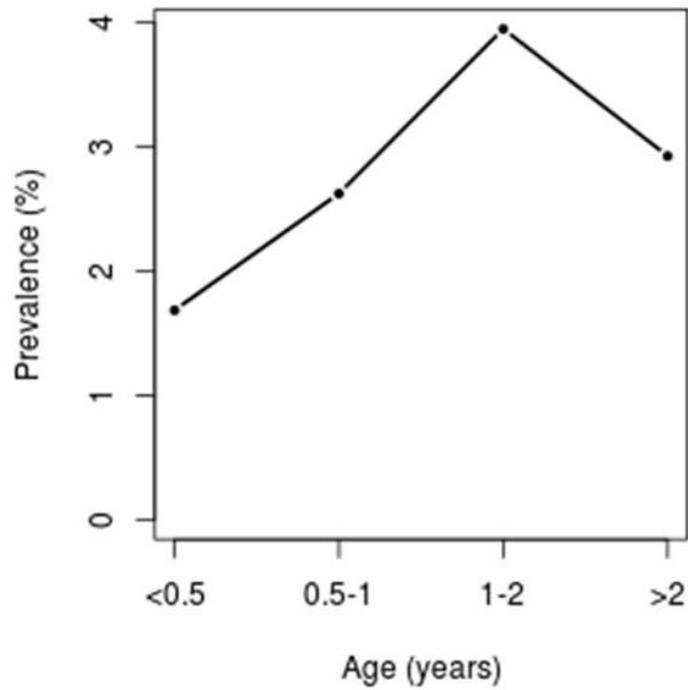


Figure 2a: Variations of the proportion of positive wild boars among exposed animals* according to the age at death

*Animals killed in hunting lots where at least one positive animal has been observed

Analysis of prevalence according to hunting season

A significant association between the season of death and positivity was observed ($p < 0.0001$), prevalence being more than twice higher in spring and summer than in autumn (Figure 2b and Table 2).

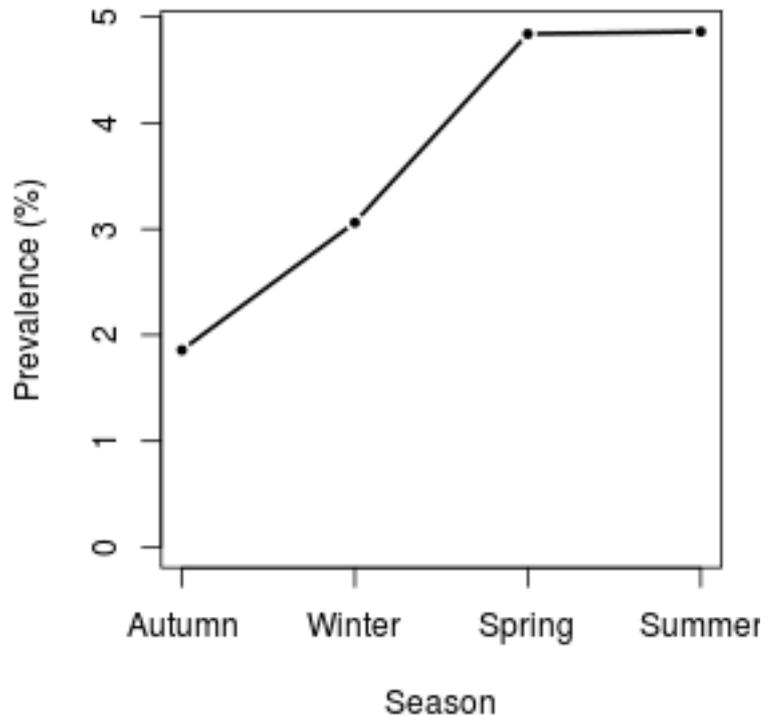


Figure 2b: Variations of the proportion of positive wild boars among exposed animals* according to the season of death

*Animals killed in hunting lots where at least one positive animal has been observed

A significant association was observed between prevalence and year of death ($p < 0.0001$). Prevalence progressively increased during the study period, and was more than four times higher in 2011 than in 2007 (Figure 2c and Table 2). The alternative scenario taking into account pooled tests without individual results gave a stronger increase with prevalence tenfold higher in 2011 than in 2007 (12.3% in 2011 versus 1.3% in 2007). No significant impact of the delay between the date of wild boar death and that of the laboratory test was observed ($p=0.13$). No significant difference was observed between male and female ($p=0.23$).

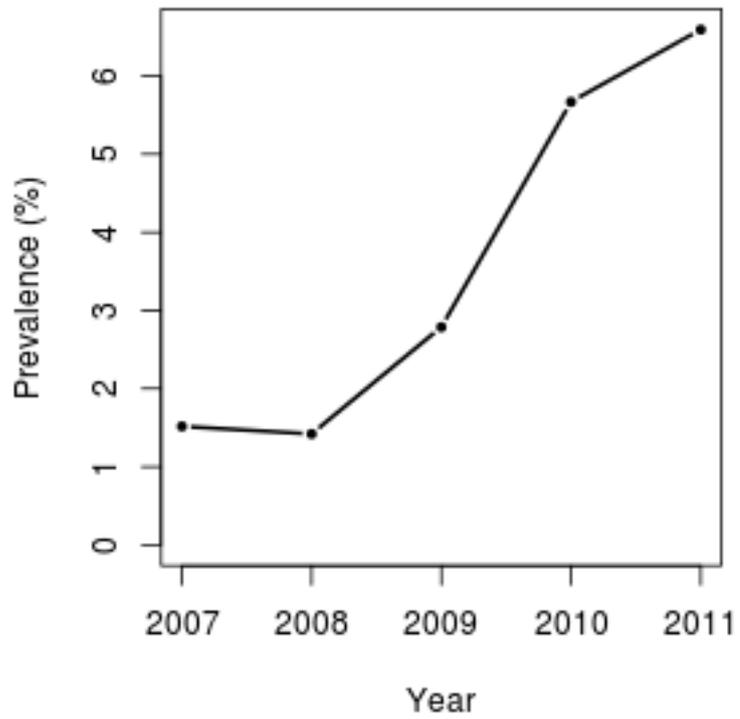


Figure 5: Variations of the proportion of positive wild boars among exposed animals* according to the year of death

*Animals killed in hunting lots where at least one positive animal has been observed

Variable	Positive/ Total	P (%)
Age class		
< 6 months	3/178	1.7
6 months - 1 year	34/1296	2.6
1-2 years	91/2305	3.9*
>2 years	33/1128	2.9
Season		
Autumn	38/2045	1.9
Winter	27/882	3.1
Spring	59/1219	4.8
Summer	37/761	4.9
Year		
2007	13/856	1.5
2008	19/1336	1.4
2009	29/1040	2.8
2010	64/1129	5.7
2011	36/546	6.6

*Animals killed in hunting lots where at least one positive animal has been observed

Table 2: Variations of the proportion of positive wild boars (n=161) among exposed animals (n=4907)* according to the age, season and year.

Multifactorial analysis of mesocercaria positivity

The covariates included in the logistic model were the age class, the season and year of death, the delay between the date of wild boar death and that of the laboratory test, and the fact that the wild boar had been killed inside the high risk cluster. This multivariate analysis confirmed the preceding results, each of the covariates having a significant effect on positivity except the delay between animal death and laboratory test. The most important effect was attributed to the fact that the wild boar had been killed inside the high risk cluster: the positivity risk for exposed animals was 7.3 times higher when the wild boar had been killed inside the cluster than when it had been killed outside (95% CI: 4.8-11.6). The second most important effect was attributed to the year of death: the positivity risk was approximately four times higher in 2010 and 2011 than in 2007. Finally, the age class and the season of death also had significant effects on the positivity risk, but with lower odds-ratios (Table 3).

Variable	Value	Odds-ratio	p
Age at death	<6 months	NS**	0.52
	6 months-1 year	Reference	
	1-2 years	1.6 (1.0-2.4)	0.04
	>2 years	NS	0.28
Season of death	Autum	Reference	
	Winter	NS	0.65
	Spring	1.6 (1.0-2.5)	0.05
	Summer	NS	0.06
Year of death	2007	Reference	
	2008	NS	0.88
	2009	NS	0.11
	2010	4.0 (2.2-7.7)	<0.0001
	2011	3.9 (2.0-7.9)	<0.0001
Location of death	Outside cluster	Reference	
	Inside cluster	7.3 (4.8-11.6)	<0.0001
Delay between animal death and laboratory analysis (days)	0	Reference	
	1	NS	0.18
	2	NS	0.36
	3	NS	0.15
	4	NS	0.30
	5	NS	0.23
	6	NS	0.45
	7	NS	0.81

*Animals killed in hunting lots where at least one positive animal has been observed

** Not significant

Table 3: Logistic model of wild boars positivity risk in exposed animals* according to each variable

Discussion

Since 2007, *A. alata* have emerged in wild boar population in the Eastern part of France (Bas-Rhin) although no prevalence was evaluated (Portier et al, 2011). The results presented in this study were carried out in a well defined area and using a complete database allowing to calculate the global prevalence at 0.6% in the surveillance area. The presence of a cluster shows that infected wild boars cannot be considered as evenly distributed within the surveillance area. Therefore, prevalence rates computed over smaller and more homogenous landscapes are of more interest than global prevalence.

Prevalence for hunting areas where at least one positive wild boar was found reaches 3.5% over four years and 6.9% in 2011. Two reports of mesocercaria infection in wild boars estimated the prevalence on specific areas: Jaksic *et al.*, (119) give a prevalence of 1.8% in

hunting grounds in Croatia and Möhl *et al.*(18) give a prevalence of 0.24% in Brandenburg (Germany). Local prevalence rates reported here are thus comparatively high. Most of the wild boars from this study were tested in pools of up to 20 individuals as is authorized for the search of *Trichinella* sp. (107). Mass tested for each animal was often closer to 5-10 gr than 100 gr and therefore, many wild boars displaying low parasite burdens were probably not found positive. Pooling cannot be considered a bias for the risk factors analysis as the choice of pooling samples was not dependant on specific areas, hunting seasons or age-classes. However the low sensitivity of the method used in this study and the pooling of samples have probably had an impact on the number of positive tests. A recent study gave an estimated percentage of 11.5% of false negative results using the *Trichinella* inspection method versus the *Alaria* migration technique under field conditions (126). Using this estimate to correct the prevalence rates obtained in the four hunting areas where the circulation of mesocercaria can be considered enzootic (lots A, B, C and D) results in prevalence rates of 16%, 20%, 26.7% and 30.7%. These corrected estimates are probably closer to the real prevalence that can be observed in areas favorable to the presence of mesocercaria. Inside the cluster, prevalence would have been of 15.5%.

A. alata is considered to be an emerging parasite but the implementation of compulsory *Trichinella* search on hunted wild boars was considered the reason of this emergence (113). However this study shows a steady and significant increase in the proportion of positive wild boars from 2007 to 2011. This increase in detection cannot be a result of better testing abilities, indeed the departmental laboratory where the initial tests were carried out is certified for this type of analysis since 2004 and its skill was constant in time(114).

The life cycle of *A. alata* includes a compulsory aquatic stage with two intermediate hosts: a Planorbid snail and an amphibian. These ecological needs lead to believe that *A. alata* cannot be found in areas with no convenient wetlands for both of these hosts (131). The cluster analysis conducted in this study shows a cluster around the Rhine valley. This valley counts not only the Rhine River but also many wetlands including ponds and flooded plains. Wild boars are highly adaptable creatures that can adapt their diet to the available resources. The carnivorous part of their diet (5 to 18% according to different studies) (132-134) will depend on the prey that is easiest to find and eat. Amphibians can be present in very high densities in certain areas and at certain periods of time (i.e. tadpoles in puddles, adults during

spawning) and represent a high proportion of the carnivorous diet. Seasonal variations of prevalence show a significant association between spring, summer and positivity, seasons for which amphibian activity is at its climax. Adult amphibians become active in early spring, spawn and either remain in the water or return to their usual habitat. Larval amphibians are present from spring to autumn depending on the species. mesocercaria infection in boars is linked to periods of high amphibian densities and activity: spring and summer.

Investigations to find the intermediate hosts have been made in the East of France. Many of the amphibian species described as potential intermediate hosts to *Alaria alata* (135) are present in the Bas Rhin according to the natural heritage of France website (monitored by the French natural history museum) (136). In these conditions, the snail host, for which *Alaria alata* seems more specific, acts as limiting factor in the parasite's distribution. Indeed, *Planorbis planorbis* and *Anisus vortex* have been described as *A. alata* hosts in three large wetland areas in France : the Rhine valley, the Der-Chantecoq lake (4°45 E, 48°35 N) and the Orient lake (4°42 E, 48°28 N)(118). According to several authors (8, 137), these snails live preferentially in still or slow flowing waters with rich vegetation and can be found in permanent or non permanent waters. The wetlands around the Rhine valley match these criteria: many marshes and flooded plains are present around the Rhine river. Our study shows that *A. alata* is very scarce above 200m and another study focusing on foxes reported limitation at 300m (131). The boundaries of the cluster are the Vosges mountains, a low mountain area. Findings of infected boars in France have all been made in lowlands (113). This limitation is probably a consequence of the rareness of suitable habitats for the snail hosts above 200m. The center of the cluster is on the german side of the Rhine valley but there are no indications existing concerning the german side of the border.

The association of the one to two year age-classes with mesocercaria positivity was an expected result as younger wild boars have had less access to infected preys. Weaning for wild boars occurs between 3 and 4 months for an average weight of 10 to 15 kg depending on environmental factors: no wild boar weighing less than 15 kg was found positive for mesocercaria. The highest prevalence is found for boars between one and two years old and does not increase for wild boars over two years old. Several studies report a slightly higher protein intake diet in young wild boars when growth speed is the highest (132, 134). A more carnivorous diet might explain the higher susceptibility of wild boars between 1 and 2 years to mesocercaria infection. The over two year age-class regroups individuals which are of two to

five or six years old. In the absence of precise data on age classes above two years, this point cannot be discussed.

Conclusion

During this study, a steady increase over years was observed and could be considered as a real emergence of the parasite in wild boars in the Bas-Rhin department. Prevalences between 15 and 30% are supposed in specific areas. This underlines the high efficiency of mesocercaria in crossing species barriers and the importance of paratenicity in the sustainance of the parasite's life cycle. High prevalence is associated to specific biotopes limited to certain areas and altitudes which shows that not all areas in France and Europe are suitable for the presence of infected wild boars. Spring and summer are periods at risk for the infection of wild boars, matching the presence of high amphibian densities. This study gives the first ecological criteria necessary for the presence of infected wild boars on specific landscapes. This will help defining more precisely areas and periods at risk for mesocercaria positivity in wild boars leading to new guidelines in the control of the parasite. We suggest the implementation of a compulsory analysis by the *Alaria* migration technique on wild boars hunted inside the cluster and on areas matching conditions for the presence of infected wild boars. These measures would allow higher sensitivity in detecting infected wild boars and give new criteria for the presence of infected wild boars.

Acknowledgements

Financial support was forthcoming in the form of a PhD grant from the French National Hunting Federation (Fédération Nationale des Chasseurs, FNC). Financial and technical support for this study was also provided by the French Game and Wildlife Agency (Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, ONCFS). The authors would like to thank Philippe Wolff from the Bas-Rhin Direction des territoires (Unité Espaces Naturels et Forestiers Responsable Chasse - Faune Sauvage), Régine Martin-Schaller and the staff from the direction départementale de la protection des population (Mission surveillance sanitaire du gibier).

4. Diversité génétique

Nous disposions de toutes les mésocercaires envoyées au LNR « parasites transmis par les aliments » dans le cadre des détections lors de contrôles trichines. Nous avons choisi d'utiliser ce grand nombre de mésocercaires et leur diversité d'origines géographiques pour étudier la diversité génétique pour le domaine mitochondrial des cyclo-oxydaes. Nous avons mis au point des marqueurs pour le domaine mitochondrial des cyclo-oxydases I (COX1) et le domaine ribosomal de l'ITS1 (Internal transcribed spacer 1)

4.1. Matériel et méthodes

Afin de séquencer le domaine des cyclo-oxydases sur *A. alata*, nous avons utilisé une paire de sondes généralistes initialement définies pour le séquençages des schistosomes aviaires : les sondes Schisto-COX1-5' (5'-TCT TTR GAT CAT AAG CG-3') et Schisto-COX1-3' (5'-TAA TGC ATM GGA AAA AAA CA-3'). Nous avons obtenu des premières séquences pour *A. alata* en utilisant ces sondes mais de nombreuses mésocercaires n'ont pu être amplifiée en utilisant ces sondes et le séquençage était souvent de mauvaise qualité. Nous avons choisi d'utiliser les premières séquences obtenues pour définir de nouvelles sondes amplifiant un fragment plus court du domaine et permettant un séquençage de meilleure qualité. Nous avons défini les sondes ACOX3' (5'-CATAACCAGTTAAAACAGGC-3') et ACOX5' (5'-TTTGATCCTGTTGGTGGTGG-3') à partir de séquences d'*A. alata* obtenues avec des sondes définies initialement pour le séquençage des COX chez les schistosomes. L'amplification consiste d'une première étape de dénaturation à 94°C pendant 5 mn puis de 40 cycles de dénaturation à 94°C pendant 45s, d'hybridation à 50°C pendant 45s et d'élongation à 68°C pendant 1mn. Ces cycles étaient suivis d'une phase d'élongation finale à 68°C pendant 10mn.

Les alignements ont été effectués avec le logiciel MEGA 5. Les arbres ont été contruits en utilisant les modèles « Maximum likelihood », « Neighbor-joining » et « Minimum evolution » en utilisant 550 répliquats et en traitant les gaps comme bases manquantes.

4.2. Résultats et discussion

On observe une grande variabilité concernant les COX. Pour 38 mésocercaires d'origines différentes séquencées, nous observons 29 variations pour une longueur totale de 407 paires de bases. Aucun cluster géographique n'apparaît comme le montre l'arbre présenté par la **Figure 9**. L'arbre a été construit par la méthode du Neighbor joining (modèle Tamura-Nei avec 500 répliqués) et ancré sur *Neodiplostomum seoulense* (AF096233).

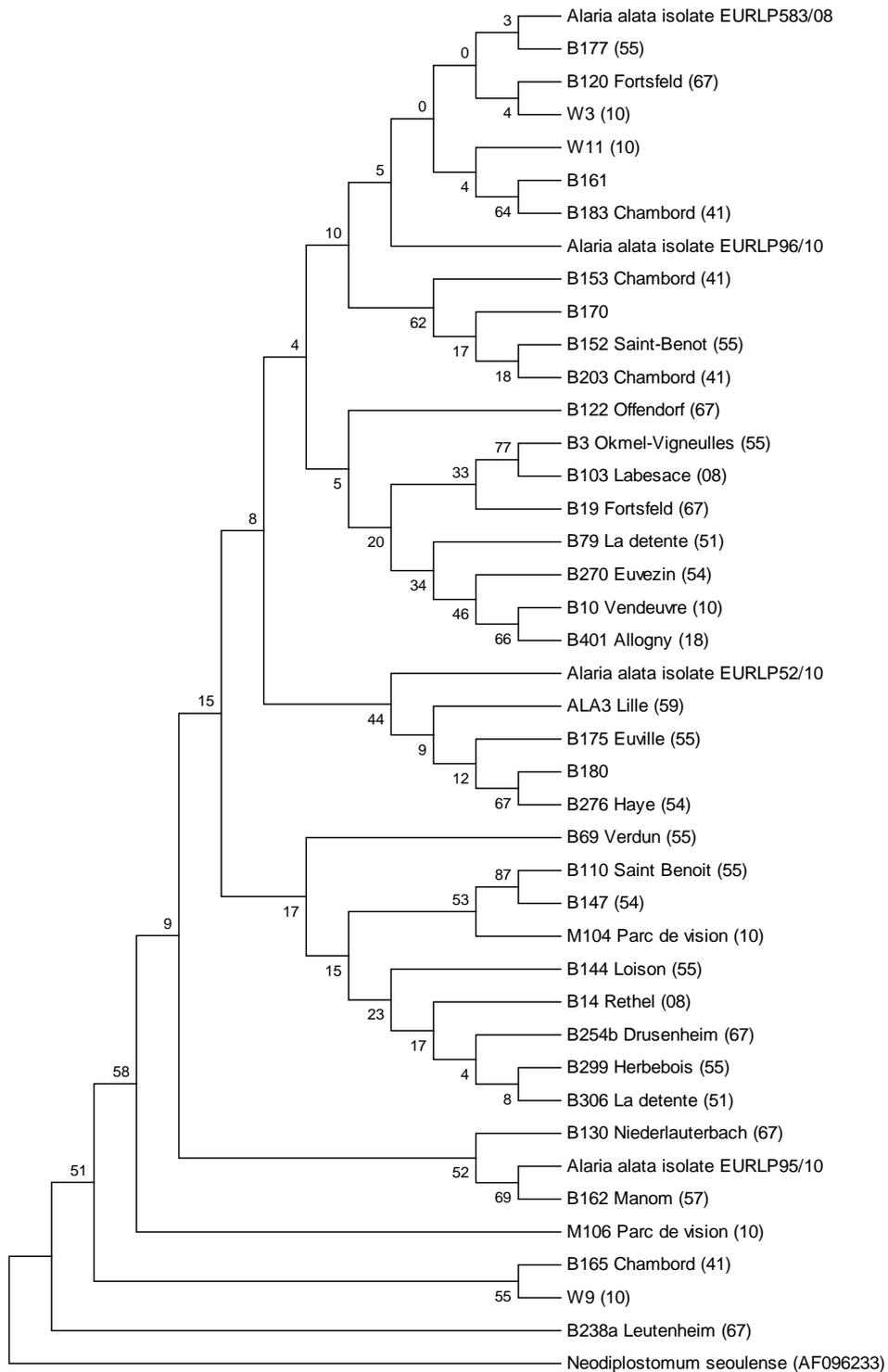


Figure 9: Arbre issu de l'alignement des séquences de COX de 38 mésocercaires d'origines différentes isolées en France et de 4 mésocercaires d'Allemagne.

Nous avons soumis au même protocole des furcocercaires, préidentifiées moléculairement *Alaria alata*, émises le même jour par le même mollusque. Nous avons analysé 3 à 6

furcocercaires de 5 mollusques d'origine différentes (lac du Der et Lac de la forêt d'Orient). Pour deux séries de furcocercaires, un seul haplotype est présent à chaque fois (3 furcocercaires homologues issues du premier mollusque, 4 furcocercaires homologues issues du second). Les trois séries suivantes présentaient des séquences différentes. Les divergences sur 495 paires de bases entre les six furcocercaires issues du dernier mollusque sont présentées dans le **Tableau 6**. Cette expérimentation montre qu'à priori plusieurs miracidia pénètrent chez un même mollusque. Les divergences observées sur l'ensemble des furcocercaires testées ne sont pas compatibles à priori avec l'entrée d'un seul miracidium. Ceci étant, seul le séquençage de furcocercaires issues d'un mollusque infesté avec un seul miracidium pourraient permettre de conclure sur ce point. Si l'hypothèse d'une entrée de plusieurs miracidia était vérifiée, cela écarterait la possibilité que le mollusque devienne réfractaire après l'entrée d'un miracidium. Cela ouvrirait également la possibilité de l'existence de mécanismes de facilitation après l'entrée de ce premier miracidium.

	A	B	C	D	E	F
Furcocercaire A						
Furcocercaire B	0,000					
Furcocercaire C	0,017	0,017				
Furcocercaire D	0,008	0,008	0,012			
Furcocercaire E	0,006	0,006	0,015	0,002		
Furcocercaire F	0,017	0,017	0,000	0,012	0,015	

Tableau 6: Divergences entre les séquences de 6 furcocercaires issues d'un même mollusque naturellement infesté.

A titre d'exemple, nous avons procédé au même type d'analyse sur neuf mésocercaires issues d'un même sanglier (abattu dans le parc de vision de la forêt d'Orient). Le **Tableau 7** montre qu'il n'y a aucune homologie de séquence entre les neuf mésocercaires. Ceci explique que ce domaine ne puisse être utilisé à l'échelle d'une population dans la mesure où la divergence est déjà marquée au niveau d'un mollusque et plus marquée encore au niveau d'un sanglier.

	A	B	C	D	E	F	G	H
Mésocercaire A								
Mésocercaire B	0,009							
Mésocercaire C	0,007	0,002						
Mésocercaire D	0,011	0,007	0,004					
Mésocercaire E	0,018	0,020	0,018	0,018				
Mésocercaire F	0,020	0,020	0,018	0,018	0,009			
Mésocercaire G	0,009	0,009	0,007	0,011	0,016	0,016		
Mésocercaire H	0,011	0,007	0,004	0,009	0,023	0,023	0,011	

Tableau 7: Divergences entre les séquences de 9 mésocercaires issues d'un même sanglier.

Chapitre 3 Mésocercaires et hôtes intermédiaires

1. Matériels et méthodes pour les travaux sur les hôtes mollusques et amphibiens

1.1. Sites d'étude

L'étude préliminaire de la situation d'*A. alata* en France nous a permis de mettre en place nos protocoles pour la récupération de matériel. Les travaux à effectuer sur les hôtes intermédiaires nécessitaient un ciblage des zones à prélever afin d'optimiser les chances de trouver des hôtes porteurs du parasite. L'étude rétrospective ainsi que les contacts dont disposait l'USC Vecpar nous ont permis de définir quatre zones où nous pouvions prélever avec l'autorisation des entités responsables et de grandes chances de trouver le parasite.

1.1.1. Le parc de vision de la forêt d'Orient

Le parc de vision de la forêt d'Orient (4°42 E, 48°28 N) est un parc animalier ouvert au public qui compte entre autres un parc à sangliers à proximité des bords du lac. C'est de ce parc que venaient les premières carcasses de sangliers porteuses de mésocercaires d'*A. alata*. Les sangliers avaient été abattus pour réguler la population dans l'enclos. Des mollusques ont été récoltés au sein même du parc et sur les bords du lac en contre bas du parc mais aussi dans d'autres biotopes. Aucun amphibien n'a été prélevé dans ce secteur. En janvier 2009, sept sangliers abattus étaient tous porteurs de mésocercaires (analyse par digestion au laboratoire départemental de l'Aube ou par dissection fine à l'USC Vecpar). En Janvier 2012 nous avons pu disposer de quatre carcasses de sangliers, toujours dans le cadre de la régulation de la population de l'enclos.

1.1.2. Le lac du Der-Chantecoq

Tout comme dans le parc de la forêt d'Orient, des sangliers positifs vis-à-vis des mésocercaires ont été détectés à proximité du lac du Der-Chantecoq dans la réserve gérée par l'ONCFS (Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage). Les études préliminaires réalisées au sein de l'USC VecPar sur les mollusques responsables de la dermatite cercarienne avaient permis de repérer un secteur très riche en planorbidés, situé entre deux étangs (Etangs du Coulon et de la Forêt) au sein de la réserve. C'est à ce niveau que nous avons entrepris nos premiers ramassages que nous avons par la suite élargi à d'autres zones.

1.1.3. Les étangs de Laheycourt

Les étangs de Laheycourt (05°02 E, 48°52 N) se situent en Meuse, au sein d'un domaine de chasse où des carcasses de sangliers porteurs d'*A. alata* avaient été identifiées. Ces deux étangs sont situés au cœur d'un massif forestier. Tous les mollusques observés furent récoltés sans sélectionner systématiquement les planorbides au profit des autres espèces. En 2011 nous avons pu analyser deux carcasses de sangliers dont une était porteuse de mésocercaires.

1.1.4. La vallée du Rhin en Alsace

Deux raisons nous ont amené à nous rendre dans ce secteur : c'est dans la vallée du Rhin que Pesson et Kristensen (1989) ont observé des vers adultes chez le Renard d'une part et que le plus grand nombre de sangliers porteurs de mésocercaires en France a été observé d'autre part. Nous avons pu échantillonner des mollusques sur les bords du Rhin, sur des bras morts ainsi que sur différents types de mares et d'étangs sur les îles de Rhinau (48°16'N 7°40'E) et de Gerstheim (48°23'N 7°43'E). Ces prélèvements ont bénéficié d'un soutien logistique (personnel et matériel) de la part de la station ONCFS de Gerstheim, gestionnaire de la surveillance de ce patrimoine naturel. Nous avons également récupéré les carcasses de deux sangliers abattus sur l'île de Rhinau en décembre 2012.

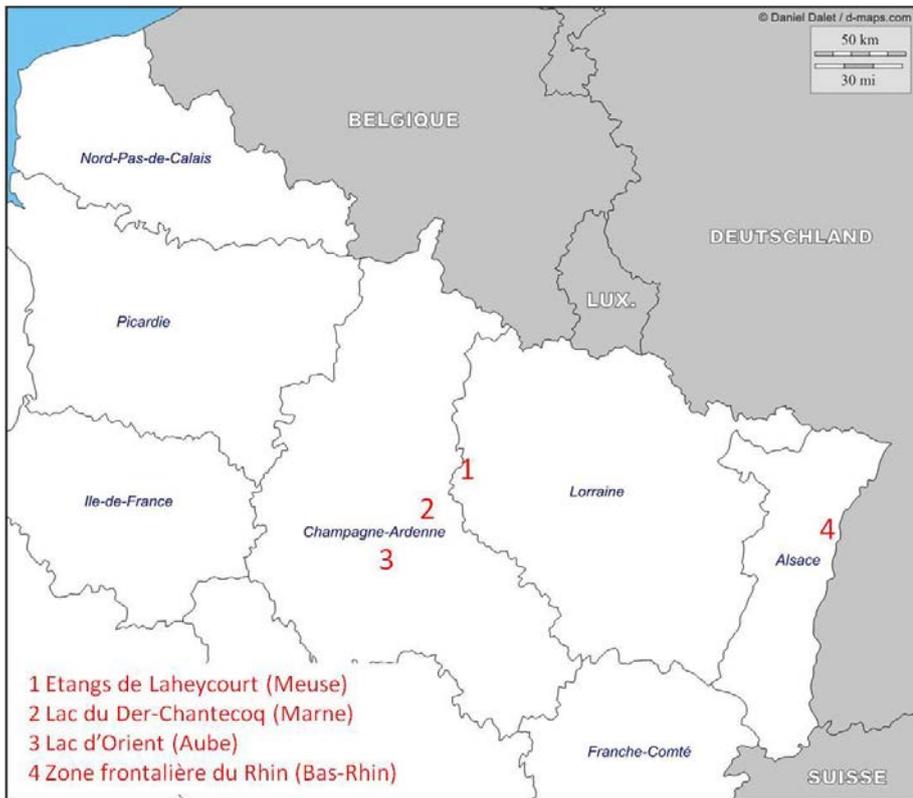


Figure 10: Lieux prospectés pour les mollusques

1.2. Approches moléculaires

Pour l'identification des furcocercaires d'*A. alata* émises par les mollusques et la confirmation des mésocercaires chez les amphibiens, nous avons envisagé une approche moléculaire après mise au point de sondes spécifiques. Le choix d'une approche moléculaire est basé sur la difficulté de l'identification morphologique des furcocercaires en règle générale mais aussi du stade dit mésocercaire d'*A. alata* chez des amphibiens, ceux-ci pouvant héberger d'autres parasites en présentant des caractères morphologiques proches.

Pour définir les sondes spécifiques à *A. alata*, nous avons comparés et alignés toutes les séquences disponibles chez les diplostomidés les plus proches d'*A. alata* : *Hysteromorpha triloba* (HM06427), *Tylodelphis scheuringi* (FJ469596), *Diplostomum* spp. (GQ292513, GQ292508, AY123042), *Ornithodiplostomum* spp. (FJ469594, FJ469595), *Ichtyocotylurus* spp. (AJ301889-AJ301892) et *Apatemon* spp. (AJ314762, AJ301893) mais aussi des séquences disponibles au laboratoire de Strigeidae adultes isolés lors d'autopsie d'oiseaux aquatiques ou encore des furcocercaires émises par l'ensemble des mollusques analysés précédemment.

L'ensemble des furcocercaires non pigmentées émises par les mollusques récoltés sur les différents sites ont été testées. Toutes les furcocercaires positives avec les sondes spécifiques ont été reconnues comme étant des furcocercaires *A. alata*. Elles ont fait l'objet pour la plupart d'un séquençage, soit du produit d'amplification obtenu avec les sondes spécifiques soit dans un deuxième temps du produit d'amplification de leur ITS2 après une nouvelle amplification. Toutes les séquences obtenues sans exception présentaient une homologie à 100% avec les séquences de références. Au total, 147 furcocercaires issues de mollusques planorbidés ont été testées sur les quatre zones de prélèvement. Des furcocercaires issues d'autres espèces ont également été testées : sept cercaires issues de *Radix* sp., deux issues de *Lymnaea stagnalis*, cinq issues de *Segmentina* sp., cinq issues de *Planorbarius corneus* et trois issues de *Stagnicola* sp.

2. Résultats de la recherche des hôtes intermédiaires mollusques

Nos recherches des mollusques hôtes d'*A. alata* nous ont amené dans un premier temps à échantillonner trois des quatre zones décrites précédemment : le lac d'Orient, le lac du Der et les étangs de Laheycourt. Sur ces trois sites, nous avons procédé à plusieurs campagnes de prélèvements couvrant toutes les saisons et nous avons récupéré l'ensemble des mollusques présents sans nous concentrer sur un type précis de mollusque. Au laboratoire, tous les mollusques étaient exposés à une source lumineuse pour provoquer les émissions et toutes les furcocercaires non ocellées ont été testées avec la paire de sondes spécifiques pour le domaine ITS2 d'*A. alata*. Sur deux des trois sites nous avons trouvé des mollusques planorbides émettant des furcocercaires d'*A. alata*. Le séquençage et l'alignement de trois gènes différents pour ces mollusques nous a permis de montrer qu'il s'agissait de *P. planorbis* et *A. vortex*. Cette expérimentation a également permis de valider la spécificité des sondes ALITS1/ALITS2 pour l'identification des cercaires d'*A. alata*. Tous les mollusques émettant ont été trouvés lors de périodes chaudes entre les mois de mai et juillet. Les mollusques hôtes nécessitent des biotopes particuliers pour vivre : des eaux à faible courant, temporaires ou permanentes et riches en végétation. Ces mollusques sont présents partout en France mais pas sur tous les biotopes humides. Ce travail a fait l'objet d'un article publié dans *Veterinary Parasitology* (118).

Portier J, Jouet D, Vallée I, Ferté H. Detection of *Planorbis planorbis* and *Anisus vortex* as first intermediate hosts of *Alaria alata* (Göeze, 1792) in natural conditions in France: Molecular evidence. *Vet Parasitol.* 2012 (190 (1-2)):151-8.

3. Résultats complémentaires

3.1. Saisonnalité des émissions

3.1.1. Matériel et méthodes

Les premières émissions de furcocercaires d'*A. alata* ont été observée uniquement pour des prélèvements effectués au printemps. Nous avons décidé d'échantillonner à intervalles réguliers (tous les mois) les planorbidés présents dans le canal du Coulon afin d'établir s'il existait une saisonnalité dans l'émission des furcocercaires d'*A. alata*. Ce canal fait le lien entre deux lacs (les lacs du Coulon et de la forêt) qui sont à proximité du lac du Der.

La **Figure 11** montre l'évolution de ce milieu de l'automne 2011 à l'été 2012. Ce canal est large d'environ 4 mètres avec un courant faible. La profondeur au début du printemps est de 80 à 100 cm au plus profond avec un fond relativement vaseux. Les pentes enherbées du canal sont douces en sous-bois et un peu plus abruptes en zones ouvertes. Une zone inondable permet le développement d'une roselière qui atteint son apogée en été. Cette zone inondée représente une surface d'une centaine de mètres carrés au mois de mars avec des profondeurs d'eau pouvant atteindre 30cm. Au cours du mois de mai : la végétation se densifie avec apparition de nénuphars et de jeunes pousses de roseaux. Une végétation purement aquatique apparaît et le niveau d'eau baisse. La zone inondable s'assèche progressivement au cours de l'été parsemée de reliquat de zones plus ou moins en eaux.



Figure 11: Evolution du canal du Coulon au cours d'une année.

A chaque sortie, tous les mollusques des deux espèces étaient prélevés dans un délai de 1H30 à 2H en fin de matinée. Les tests d'émissions ont été effectués de la même façon que pour l'identification des mollusques hôtes. Sur toutes les furcocercaires à ocelles non pigmentées nous avons réalisé une amplification moléculaire, en utilisant le couple d'amorces spécifiques ALITS1/ALITS2b, selon le protocole défini précédemment.

3.1.2. Résultats et discussion

Nous avons prélevé au total 2978 *Anisus vortex* et 288 *Planorbis planorbis*. Les prévalences de furcocercaires d'*A. alata* sont de 14% sur *P. planorbis* et de 0,4% sur *Anisus vortex*. Les collectes ne sont pas homogènes sur l'ensemble des sorties de prélèvements. Le **Tableau 8** présent l'ensemble des résultats pour le nombre de mollusques *P. planorbis* et *A. vortex* prélevés et émettant des furcocercaires d'*A. alata*.

Dates de prélèvement	<i>A. vortex</i> (positifs/testés)	<i>P. planorbis</i> (positifs/testés)
septembre-09	0/560	0/77
mai-10	2/131	0/0
juin-10	8/165	0/2
octobre-10	0/170	0/0
mars-11	0/110	0/0
avril-11	2/57	35/94
mai-11	0/257	0/9
juin-11	0/275	0/5
juillet-11	0/315	0/7
septembre-11	0/463	0/1
septembre-11	0/142	0/0
mars-12	0/19	0/11
avril-12	2/41	5/30
mai-12	0/26	1/40
juillet-12	0/247	0/12

Tableau 8: Récapitulatif du nombre de mollusques émettant des furcocercaires d'*A. alata* et du nombre total de mollusques *A. vortex* et *P. planorbis* prélevés.

La **Figure 12** montre qu'*A. vortex* a été échantillonné en grandes quantité pour presque toutes les sorties. Nous avons observé des émissions de cercaires d'*A. alata* par *A. vortex* au cours de 4 mois sur 15 : mai et juin 2010, avril 2011 et avril 2012. La proportion de

mollusques émettant *A. alata* varie de 1.5 à 4.9% pour les mois où une émission a été observée.

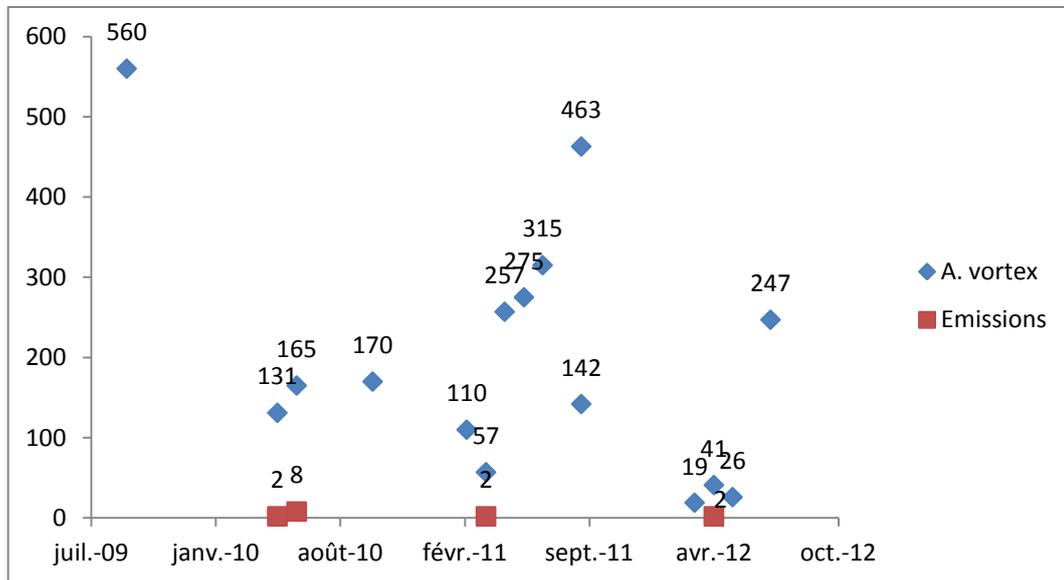


Figure 12: Nombre d'*A. vortex* prélevés et émettant des furcocercaires d'*A. alata*.

Le nombre de *Planorbis planorbis* prélevés est plus variable en fonction de la période et nous avons observée l'émission de furcocercaires d'*A. alata* au cours de 3 mois : avril (35 positifs pour 94 prélevés) 2011, avril (5 positifs sur 30) et mai 2012 (1 positif sur 40).

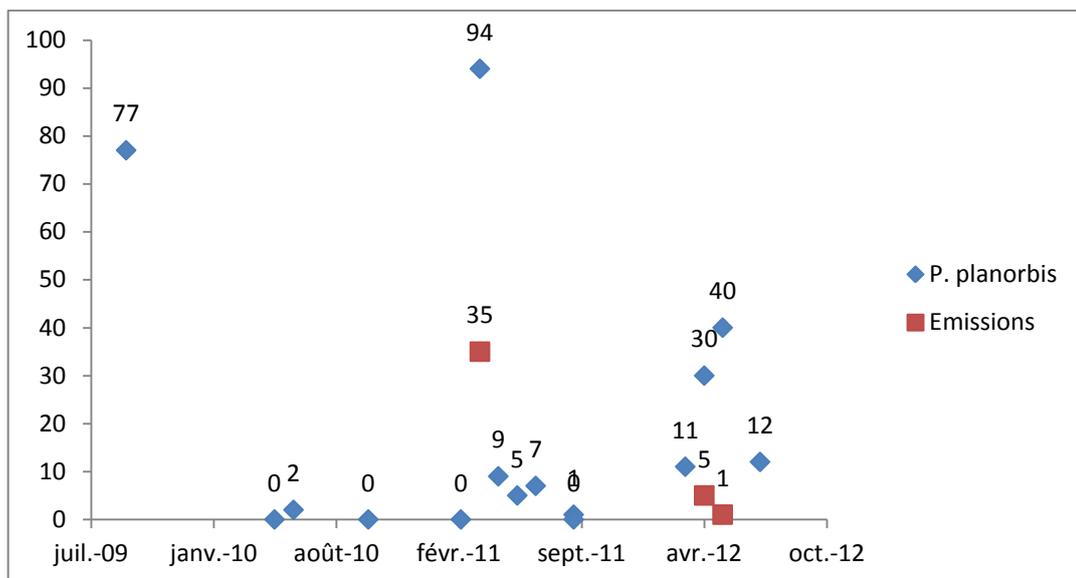


Figure 13: Nombre de *P. planorbis* prélevés et émettant *A. alata*.

Nous avons comparé l'émission de l'ensemble des cercaires « non *alaria* » (autres furcocercaires, amphistome, echinostome, xyphidiocercaire) pendant les mois d'émission d'*A. alata* et les mois sans émission pour une seule espèce : *A. vortex*, les *Planorbis* étant faiblement représentés dans notre échantillon. Il n'y a pas de différences significatives entre l'émission des cercaires hors période d'émission d'*A. alata* et l'émission de cercaires pendant ces périodes (**Tableau 9**). Sur les 4 mois où *A. alata* est émis, la moyenne d'émission des autres cercaires est de 2.54% et pendant les autres périodes elle est de 4.41%. Les tests de Fisher effectués pour chaque type de cercaire n'ont permis de mettre en évidence aucune différence d'émission d'autres cercaires au cours et hors période d'émission d'*A. alata*.

	Collectes avec émission d' <i>A. alata</i>	Collectes sans émission
<i>Alaria alata</i>	3.69	
Furcocercaire non ocellée	0.25	0.64
Furcocercaire pigmentée	0	0.26
Echinostomidae	0	0.17
Xiphidiocercaria	1.78	3.04
Amphistome	0.51	0.30
Total cercaires non Alaria	2.54	4.41
Total mollusques prélevés	394	2337

Tableau 9: *Anisus vortex* : prévalence des différentes cercaires.

L'émission d'*A. alata* par *Anisus vortex* est soumise à une forte saisonnalité. En effet sur 14 sorties de prélèvements, 4 seulement ont mis en évidence *A. alata* : en avril, en mai et en juin c'est-à-dire plutôt au printemps. Les émissions d'*A. alata* par *P. planorbis* ont été observées concomitamment à celle par *A. vortex* (avril et mai) avec des pics d'émissions plus importants que pour *A. vortex* avec 35 mollusques émettant *A. alata* pour 94 prélevés. Les périodes d'émissions des furcocercaires d'*A. alata* ont coïncidé, sur le site du canal du Coulon, avec des périodes de grandes densités d'amphibiens aux stades têtard et adulte. S'il existe une saisonnalité de l'émission, nous avons également observé une saisonnalité de la présence des mollusques. Les méthodes de prélèvement employées ne permettent de récupérer que les mollusques présents et en activité. Plusieurs publications rapportent la possibilité pour *P. planorbis* de s'enterrer pour survivre aux périodes d'assèchement des eaux temporaires. Il est possible que la variabilité du nombre de *Planorbis* prélevés soient une conséquence de cette aptitude. L'exposition des amphibiens aux cercaires d'*A. alata* dépend des périodes d'émissions de cercaires mais avant tout de la présence de mollusques hôtes en activité.

3.2. Approches écologiques

3.2.1. Description des sites

3.2.1.1 Sites alsaciens

La localisation des sites alsaciens est présentée sur la **Figure 14**. Elle suit la vallée du Rhin. La diversité des sites prospectés nous a permis de reconnaître différents types allant de l'étang permanent à des mares temporaires, de milieux naturels à des milieux artificiels comme des gravières.

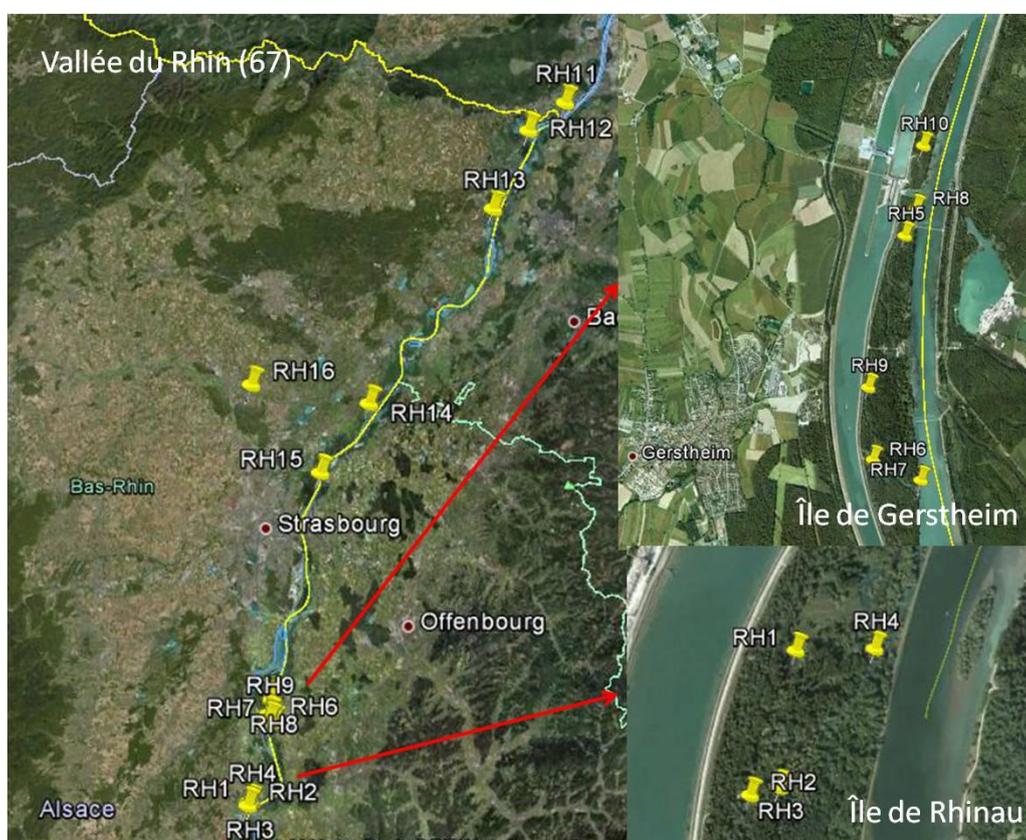


Figure 14: Répartition des sites prélevés dans la vallée du Rhin.

Les étangs permanents sont généralement alimentés par le vieux Rhin (type RH1). Ces étangs ont un fond vaseux, la végétation est dense et ils couvrent une surface d'un hectare environ (**Figure 17**). Sur l'un d'eux, sept types de mollusques différents ont été prélevés dont

P. planorbis et *A. vortex* à l'occasion de deux prospections : une en avril et une autre en juillet. En deux sorties, respectivement 20 *P. planorbis* et 71 *A. vortex* dont deux émettant *A. alata* ont été prélevés.

Parmi nos sites nous avons prospecté un ensemble de mares non permanentes en milieu forestier, alimentées par le vieux Rhin ou non en hiver, qui ont tendance à s'assécher au cours de la belle saison. Ces mares sont de faible profondeur (50 cm au plus) les pentes sont douces et le fond légèrement vaseux (type RH3). Pour certains la végétation aquatique était riche et l'eau était relativement claire facilitant le ramassage à vue (type RH2, RH10 et RH14) alors que d'autres étaient chargés de matières organiques en décomposition (type RH3, RH5, RH12). Classiquement ces milieux sont propices à la présence de *P. planorbis* et d'*Anisus vortex*. Pour l'un d'entre eux un nombre important de *P. planorbis* a été récolté aussi bien en avril qu'en juillet (497 exemplaires en sympatrie avec un grand nombre de *Lymnaea stagnalis*)

Le réseau hydrographique existant entre le vieux Rhin et le grand canal par l'intermédiaire de connexions d'eaux vives à débit plus ou moins lent nous a permis de prélever des mollusques dans des eaux claires et peu profondes. Un grand nombre étaient fixés sur des supports pierreux (comme des Viviparidae ou des *Stagnicola* sp.). A aucune occasion nous n'avons trouvé des planorbidés dans ce type de milieux (type RH4, RH7, RH8, RH9, RH11).

Enfin des collections d'eau telles que des anciennes gravières à pentes plus ou moins abruptes et très étendue ne nous ont pas permis de retrouver des planorbidés mais plutôt des Lymneidae du genre *Radix* ou des physes (RH6, RH13, RH15).

3.2.1.2 Les étangs de Laheycourt

Il s'agit de deux étangs dont l'un est en contrebas du premier. Celui-ci se présente plutôt comme un étang pour la pêche, profond au milieu et au niveau du déversoir mais à pente douce sur les rives riches en feuilles sur lesquelles un grand nombre de petits planorbidés ont été ramassés. En revanche le second, lors de nos visites, étaient en période vidange. Six types de mollusques y ont été identifiés dont seulement deux *P. planorbis* (au cours de 3 visites), 713 *A. vortex* et des *Radix*.

3.2.1.3 Les sites de la forêt d'Orient

Au sein du parc à sangliers proprement dit il existe une mare non inondable et permanente d'une superficie de l'ordre de 40 à 50 mètres carrés avec un fonds très vaseux et une pente accusée. La profondeur atteint 1m50 au centre et la végétation aquatique et en bordure est quasi absente. Un seul type de mollusque non planorbide a été identifié (physes). Juste en contre bas de l'enclos à sangliers, une petite mare non inondable à fond vaseux, légèrement enherbée et peu profonde a fait l'objet de prospections et aucun planorbide n'a été prélevé (mare « hors enclos », visible sur la **Figure 15**). En revanche la zone inondable, lors du remplissage programmé du lac au printemps (avancée du lac sur plusieurs centaines de mètres) est colonisée par six types de mollusques dont des *P. planorbis* (482 exemplaires au cours de 3 sorties) et *A. vortex* (4 exemplaires en trois sorties). Au total 16 *P. planorbis* ont émis *A. alata* (3%) (en bordure du lac d'Orient visibles sur la **Figure 15**).

Le dernier site prospecté correspond à une avancée des eaux du lac communiquant avec une zone alimentée par des sources issues du milieu forestier. Cette dernière constitue une vaste zone humide dont les berges sont « minées » par des terriers de ragongin.. C'est à ce niveau que nous avons ramassés le plus grand nombre de *Planorbarius corneus*. De l'autre côté, sur les berges du lac il nous a été possible de prélever des mollusques certainement amenés par le vent et les courants. Trois types de mollusques dont des *P. planorbis* ont été identifiés. Quatre *P. planorbis* ont émis *A. alata*.



Figure 15: Sites du lac d'Orient.

3.2.1.4 Les sites du lac du Der-chantecoq

A la zone d'étude correspondant au canal rejoignant l'étang du Coulon à celui de la forêt que nous avons précédemment décrit un nouveau site de prospection a été ajouté en 2012. Il s'agit en fait à la fois d'une lisière forestière (forêt d'Argentolle) et d'une roselière largement ouverte (en régénération après fauchage). Les différents lieux de ramassage présentés dans la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** nous ont permis de retrouver des Planorbidés en grand nombre : dans un canal de restitution, dans une mare temporaire et des zones de débordements à proximité du plan d'eau principal (étang des Landres, périphérique au lac du Der). Un seul *Anisus vortex*, parmi de nombreux petits planorbidés analysés, a été détecté positif vis-à-vis d'*Alaria* dans le contexte d'Argentolle.



Figure 16: Site d'Argentolle.

3.2.2. Matériel et méthodes

Au cours de nos recherches nous avons prélevé des mollusques sur 15 sites en Alsace, 3 sites autour du lac du Der, 3 sites au niveau du lac de la forêt d'Orient et autour des étangs de Laheyourt. Pour certains plusieurs prospections ont été réalisées. La présence de mollusques planorbides ainsi que les caractéristiques des différents sites ont été renseignées.

Pour chaque site ont été consignées :

- Le type d'eaux (étang, mare non inondable, mare inondable, rivière, roselière inondable, prairie inondable, gravière)
- Le courant (nul, moyen, fort)
- La profondeur (faible quand inférieure à 50 cm, moyenne quand inférieure à 1m, forte quand supérieure à 1m)
- La pente des berges (douce, moyenne, forte)
- La végétation (faible quand quasi-absence de végétaux, moyenne quand présence de végétaux aquatiques couvrant au moins 30% de la zone humide, forte quand couverture végétale supérieure à 30%)
- Le nombre de type de mollusques différents (les types sont les mêmes que ceux utilisés pour la recherche des hôtes mollusques)
- La présence ou absence de *Planorbis planorbis* et *Anisus vortex*
- L'émission d'*A. alata* (confirmée par PCR spécifique sur le domaine ITS2)

3.2.3. Résultats

Les six sites alsaciens où des mollusques planorbidés ont été trouvés sont présentés dans la **Figure 17** et les sept sites où aucun planorbidé n'a été récolté sont présentés dans la **Figure 18**.



Figure 17: Sites alsaciens et présence de planorbidés



Figure 18: Sites alsaciens et absence de planorbidés.

L'ensemble des données collectées pour chaque site figurent dans le **Tableau 10**.

Site	Courant	Profondeur	Pente	Végétation	Types de mollusques	Planorbidés
RH1	Nul	Moyen	Douce	Dense	7	Oui
RH2	Nul	Faible	Douce	Dense	3	Oui
RH3	Nul	Faible	Douce	Dense	4	Oui
RH4	Faible	Moyen	Forte	Faible	6	Non
RH5	Nul	Moyen	Douce	Faible	7	Oui
RH6	Nul	Profond	Moyenne	Moyenne	2	Non
RH7	Fort	Moyen	Moyenne	Moyenne	3	Non
RH8	Fort	Moyen	Moyenne	Faible	5	Non
RH9	Fort	Moyen	Douce	Moyenne	1	Non
RH10	Nul	Faible	Douce	Dense	6	Oui
RH11	Fort	Moyenne	Moyenne	Faible	2	Non
RH12	Nul	Faible	Douce	Dense	6	Oui
RH13	Nul	Moyenne	Moyenne	Faible	4	Non
RH14	Nul	Faible	Douce	Dense	3	Oui
RH15	Nul	Profond	Douce	Faible	1	Non
Coulon	Faible	Faible	Douce	Dense	7	Oui
Argentolle	Nul	Faible	Douce	Dense	3	Oui
Argentolle canal	Nul	Faible	Douce	Dense	4	Oui
Parc de vision côté lac	Nul	Faible	Douce	Dense	6	Oui
Mare sangliers	Nul	Forte	Forte	Faible	1	Non
Mare hors enclos	Nul	Faible	Douce	Moyenne	3	Non
Canal côté forêt	Faible	Faible	Douce	Moyenne	3	Non
Laheycourt	Nul	Faible	Douce	Faible	6	Oui

Tableau 10: Caractéristiques des différents sites prospectés

3.2.4. Discussion

Nous n'avons pas trouvé de planorbidés dans les eaux courantes, ni dans les eaux profondes ou dans les plans d'eau avec des rives abruptes ou de type gravière. Les biotopes préférentiels des planorbidés sont les zones humides de faible profondeur, stagnantes ou à faible débit et présentant une végétation aquatique riche. Dans ces conditions, les planorbidés peuvent coloniser aussi bien des zones humides permanentes que temporaires. Cependant les zones humides temporaires de faible surface ne conviennent pas si elles ne sont pas

régulièrement alimentées. Ces observations sont en accord avec les données de la littérature (8). Typiquement, les roselières et les zones de marais riches semblent être des biotopes adaptés pour ces mollusques. La présence des mollusques hôtes n'est cependant pas systématiquement synonyme de présence du parasite. En effet nous n'avons pas rencontré de mollusques émettant de parasite sur 7 des 12 biotopes où les planorbidés étaient présents. Le faible nombre de mollusques récoltés ainsi que des périodes de collecte hors période d'émission d'*A. alata* sont probablement les raisons de cette absence de détection. La diversité observée au sein de la malacofaune semble un bon indicateur de la présence de Planorbidés. Sur tous les sites où nous avons prélevé des planorbidés, des amphibiens appartenant à différentes espèces (grenouilles vertes ou rousses *sensu lato*) étaient présents.

3.3. Infestations expérimentales sur mollusques

L'identification des hôtes mollusques d'*A. alata* nous a permis de procéder à des infestations expérimentales et de tenter de reproduire au laboratoire les premières phases du cycle parasitaire d'*A. alata* : de l'œuf à la furcocercaire.

3.3.1. Matériel et méthodes

Durant l'hiver 2011 et l'hiver 2012, nous avons récupéré des matières fécales de Renard roux trouvées positives pour des œufs d'*A. alata* après concentration par filtration sur tamis (315µm, 160 µm) et récupération du résidu après passage du filtrat sur un dernier tamis de 50µm de maille. Les résidus remis en eau permutée ont été conservés à +4°C. A cette température tous les œufs étaient et sont restés non embryonnés. Nous avons testé les temps de développement des œufs à 18, 21, 22, 23 et 37°C en plaçant des œufs issus de la même matière fécale dans des plaques de 12 puits à raison de 10 ou 20 œufs par puits (soit 240 à 480 œufs testés par température). Les miracidia étaient recherchés à la loupe binoculaire quotidiennement. Un lot d'œufs conservé à +4°C pendant 6 mois s'est avéré capable de produire des miracidia.

C'est à partir des miracidia obtenus que nous avons envisagé des infestations expérimentales de mollusques, *Planorbis planorbis* et *Anisus vortex*. Ces derniers correspondaient à des lots de planorbidés récoltés aux lacs du Der-Chantecoq et de la forêt d'Orient, négatifs à plusieurs tests d'émission sur une période de plusieurs mois. Les mollusques ont été exposés individuellement à 5 miracidiums puis en groupe avec un nombre connu de miracidiums. Les mollusques étaient gardés pendant au moins 45 jours - en cas de négativité des tests d'émission réalisés à partir du 10^{ième} jour - avant d'être disséqués à frais, après congélation ou fixés en formol pour des études histologiques ultérieures. La confirmation d'émission de cercaires d'*Alaria alata* ou la reconnaissance *in situ* de sporocyste après dissection ont été confirmées par PCR avec nos amorces spécifiques.

3.3.2. Résultats

3.3.2.1 Eclotions des oeufs

Les œufs ont éclos à toutes les températures testées sauf à 37°C. Le taux d'éclosion est variable en fonction du lot : entre 18.6 et 40.6%. Les temps d'éclosion sont différents en fonction de la température. Les premières éclosions ont eu lieu respectivement à J+8, J+6, J+7

et J+6 à 18, 21, 22 et 23°C. La **Figure 19** montre l'évolution du pourcentage d'œufs éclos en fonction du temps: les courbes sont décalées en fonction de la température : plus la température est élevée, plus l'éclosion est précoce.

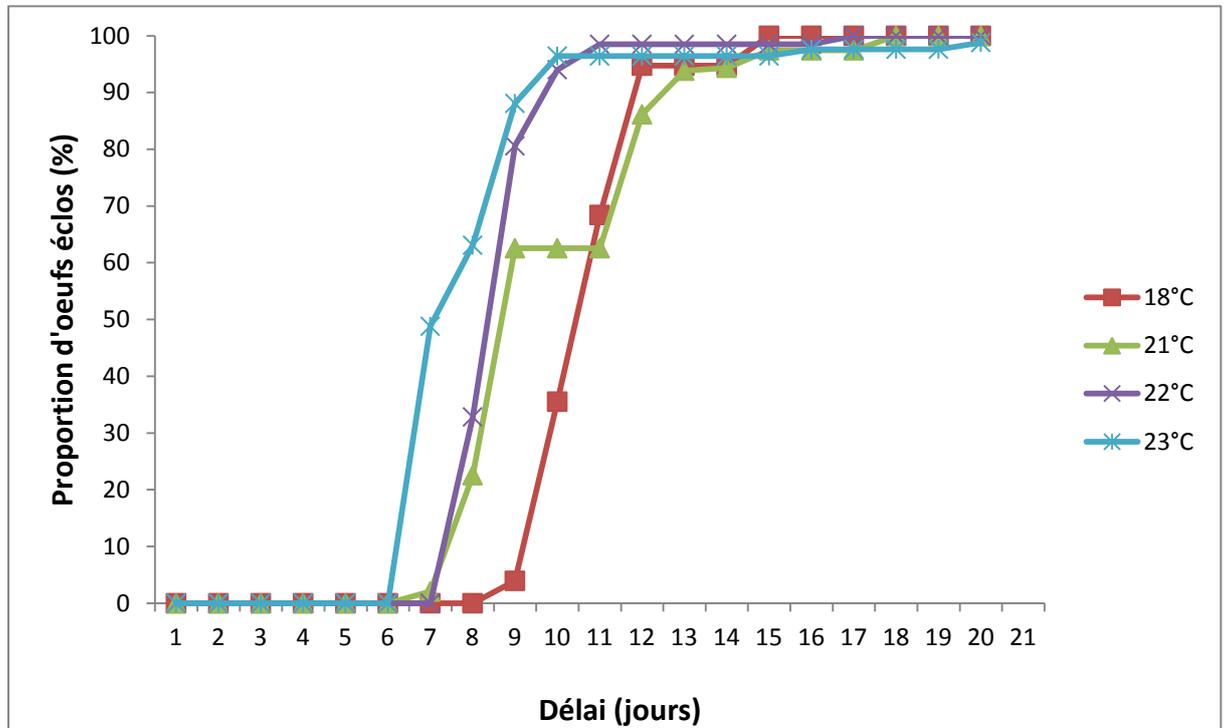


Figure 19: Pourcentage d'œufs d'*A. alata* éclos en fonction du temps.

L'utilisation d'œufs d'*A. alata* pour les infestations est relativement aisée puisque ces œufs résistent très bien à +4°C dans l'eau et peuvent être conservés pendant plusieurs mois. L'optimum de température semble être aux alentours de 22 à 23°C, températures auxquelles le pourcentage de miracidia produits est le plus élevé et les délais d'éclosion les plus courts. Le développement est arrêté à +4°C mais rapidement l'inhibition est levée : nous avons observé des éclosions au bout de trois jours seulement pour des œufs conservés 5 mois à +4°C.

3.3.2.2 Infestations de *Planorbis planorbis*

30 *P. planorbis* ont été mis en contact individuellement avec 1 à 30 miracidia. Une seule émission de cercaire a été observée sur un individu mis au contact d'un seul miracidium.

Deux autres mollusques présentaient des sporocystes, dont un pour lequel les sporocystes ont été identifié comme *A. alata* par biologie moléculaire. Les sporocystes étaient situés dans l'hépatopancréas secondaire. Le **Tableau 11** présente les résultats obtenus pour les infestations de *P. planorbis*. L'individu qui a émis des furcocercaires d'*A. alata* a émis 405 cercaires en 10 jours d'émission.

Lot	Nombre de mollusques	Nombre de miracidia par mollusque	Emissions	Sporocystes ou kystes
1	8	1	Oui	Une émission et une dissection avec sporocystes de type <i>A. alata</i> (non séquencé)
2	15	2 à 7	Non	Une dissection avec sporocystes d' <i>A. alata</i> (confirmé par séquençage)
3	3	2	Non	Non
4	4	30	Non	Non

Tableau 11: Résultats des infestations expérimentales sur *P. planorbis*.

Sur un *P. planorbis* infesté par un seul miracidium, nous avons pu compter le nombre de cercaires émis et nous avons compté 405 cercaires émises en 10 jours.

3.3.2.3 Infestations d'*Anisus vortex*

43 exemplaires d'*A. vortex* ont été mis en contact avec 1 à 80 miracidia. Deux mollusques ont émis des furcocercaires d'*A. alata*. Quatre mollusques présentaient des sporocystes lors de leur dissection. Pour l'un d'entre eux, les sporocystes observés ont été confirmés par approche moléculaire comme étant ceux d'*A. alata*, les autres mollusques étant conservés en formol. L'ensemble des résultats des infestations sur *A. vortex* est présenté dans le **Tableau 12**.

Lot	Nombre de mollusques	Nombre de miracidia par mollusque	Emissions	Sporocystes ou kystes
1	13	1	Oui	2 émissions de furcocercaires d' <i>A. alata</i> et présence de sporocystes chez 2 autres mollusques
2	5	3 à 5	Non	Non
3	2	5	Non	Non
4	10	1	Non	Non
5	5	9	Non	Présence de sporocystes sur un mollusque
6	3	80	Non	Non
7	5	8	Non	Présence de sporocystes d' <i>A. alata</i> sur un individu

Tableau 12: Résultats des infestations expérimentales sur *A. vortex*.

Nous avons réussi à infester au laboratoire des mollusques des deux espèces : *P. planorbis* et *A. vortex*. Le succès de ces infestations est faible puisque seulement un individu sur 30 a émis des cercaires pour *P. planorbis* et deux individus sur 43 pour *A. vortex*. Nous avons trouvé pour six mollusques des sporocystes de type *A. alata* qui semblaient être à maturité (des têtes de cercaires étaient visibles). Ces mollusques avaient été conservé plus de deux mois soit plus longtemps que les mollusques qui ont émis des furcocercaires d'*A. alata*. Nous pensons donc que l'émission a été bloquée chez ces mollusques mais nous n'en connaissons pas la cause. Il est possible que certains facteurs soient nécessaires au déclenchement de l'émission et que ces facteurs n'étaient pas présents dans nos conditions de laboratoire. Les mollusques utilisés pour ces infestations ont été conservés pendant plusieurs mois avant l'infestation et soumis à de nombreuses reprises à des tests d'émission qui se sont toujours avérés négatifs ce qui pouvait supposer l'absence de formes larvaires de trématodes. Un seul mollusque sur les 73 infestés présentait des sporocystes qui n'étaient pas des sporocystes d'*A. alata*.

4. Résultats des travaux sur amphibiens

4.1. Règlementation et prélèvements

Tous les amphibiens en France sont protégés et les prélèvements sont soumis à une réglementation. Afin de pouvoir prélever et analyser les amphibiens présents sur le lac du Der-Chantecoq, nous avons donc demandé un agrément auprès de la DREAL (autorisation préfectorale relative à des espèces soumises au titre 1^{er} du livre IV du code de l'environnement relatif à la protection de la faune et de la flore, ainsi qu'à l'Arrêté du 19 novembre 2001 fixant les listes des amphibiens et des reptiles protégés sur l'ensemble du territoire et des modalités de leur protection) dont le bénéficiaire est Hubert Ferté. Il a été accordé de prélever des grenouilles rousses et des grenouilles vertes à des fins scientifiques.

4.2. Protocoles d'analyse

Les amphibiens récoltés sur le terrain ont été conservés à +4°C en attendant leur examen. Les grenouilles étaient euthanasiées par décérébration puis disséquées finement sous la loupe binoculaire. Les restes de dissections étaient ensuite placés dans une passoire posée sur un verre à pied rempli d'eau du robinet pendant 30mn pour permettre de récupérer des parasites qui n'auraient pas été vus lors des dissections. L'ensemble des parasites observés, y compris les « non mésocercaires », ont été isolés et conservés en alcool à 70° pour des études ultérieures.

4.3. Prévalences et taux d'infestation

Nos prospections ont été envisagées sur deux sites différents de la réserve du Der-Chantecoq : site du canal du Coulon où nous observions régulièrement la malacofaune et dans le massif forestier d'Argentolle.

Dans le canal du Coulon, sur 21 grenouilles vertes (*Pelophylax* sp.) prélevées sur sept sorties, deux étaient porteuses de mésocercaires. Ces deux grenouilles ont été récoltées le même jour que des mollusques émettant des furcocercaires d'*A. alata*. Cinq grenouilles rousses ont été prélevées en une seule sortie et une seule était porteuse de mésocercaires. Le nombre de mésocercaires par grenouille est faible : 1 et 6 mésocercaires pour les grenouilles vertes et 10 mésocercaires pour la grenouille rousse. Sur le site d'Argentolle, des grenouilles

des deux groupes ont été trouvées porteuses de mésocercaires à chaque sortie. La prévalence de grenouilles positives est plus importante qu'au canal du Coulon ainsi que les taux d'infestation qui reste toutefois variables pour les deux groupes. L'ensemble des résultats sont présentés ci-dessous dans le **Tableau 13**.

Espèce	Lieu	Dates	Individus prélevés	Nombre de positifs	Nombre de mésocercaires
Grenouille verte <i>sensu lato</i>	Canal du Coulon	avril 2011*	6	0	
		juillet 2011	1	0	
		septembre 2011	2	0	
		septembre 2011	1	0	
		mars 2012	4	1	6
		avril 2012*	6	0	
		mai 2012*	1	0	
	Total	21	1		
	Argentolle	mai 2012	5	2	19 et 67
		juillet 2012*	3	2	12 et 314
Total		8	4		
Grenouille rousse <i>sensu lato</i>	Canal du Coulon	11 juillet 2012	18	6	1 à 56
	Argentolle	mai 2011	6	5	3 à 68
		juillet 2012*	13	9	1 à 331
		Total	19	14	

* : dates auxquelles des mollusques émettant des furcocercaires d'*A. alata* ont été prélevés.

Tableau 13: Mésocercaires et grenouilles du canal du Coulon et d'Argentolle.

Parallèlement des têtards ont été collectés sur ces deux sites aux mois d'avril, mai et juillet. Sur le site du Coulon l'ensemble des têtards prélevés en avril 2011 sont porteurs de mésocercaires avec des taux d'infestation que l'on peut considérer comme élevé pour des individus d'un poids inférieur à 1g (une moyenne de 175+/-56 mésocercaires par têtards). Cette période de prélèvement est en faveur de têtards de grenouille rousse qui sont présents plus tôt dans la saison. En revanche aucun têtards positif n'a été détecté deux mois après. Sur le site d'Argentolle, nous avons prélevé plusieurs mares : au niveau d'ornières en pleine eaux, en bordure de la roselière et à proximité du plan d'eau. Seuls les têtards en bordure du plan d'eau se sont avérés positifs (14/15) avec des taux d'infestation de 6+/-4,4 mésocercaires par individu. Le **Tableau 14** présente l'ensemble des résultats des prélèvements de têtards.

Site	Dates	Individus prélevés	Nombre de positifs	Nombre de mésocercaires	Emission de cercaires d' <i>A. alata</i>
Coulon	avril 2011	22	22	97 à 280	Oui
	juillet 2012	5	0		
Argentolle	avril 2012	32	0	2 à 15	
	mai 2012	14	0		
	Mai 2012	15	14		

Tableau 14: Mésocercaires et têtards du canal du Coulon et d'Argentolle.

4.4. Localisation chez les amphibiens

De nombreuses mésocercaires ont été observées encapsulées dans les tissus des têtards. Les capsules étaient transparentes, fragiles et peu adhérentes aux tissus. Les mésocercaires étaient seules et mobiles dans ces capsules, plus rarement par deux. La **Figure 20** présente deux mésocercaires encapsulées chez une grenouille juvénile. Les mêmes formations ont été observées chez les têtards. La structure de la capsule semble être formée de feuillets successifs. Elles ont été observées dans différents tissus : au niveau de l'insertion de la mandibule, de l'espace péri-orbital, du sternum, du bassin et des pattes postérieures.



Figure 20: Der-Chantecoq : présence de mésocercaires chez les grenouilles (état frais)

Même si les mésocercaires se répartissent dans un grand nombre de tissus ou d'organes, il semblerait qu'un plus grand nombre d'entre elles se localise dans les espaces péri-orbitaux, représentant jusqu'au tiers de l'infestation totale. Le nombre de mésocercaires pour chaque tissu a été évalué pour deux individus : une grenouillette (juste après la métamorphose) et un individu juvénile. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 15**.

Tissus	Grenouillette (0,28g)		Grenouille juvénile (13g)	
	Nombre de mésocercaires	Proportion de l'infestation (%)	Nombre de mésocercaires	Proportion de l'infestation (%)
Tête	79	48	75	28
Espace péri-orbital	42	26	10	6
Cavité viscérale	16	10	70	26
Tronc vertébral	20	12	66	24
Membres postérieurs	7	4	50	18
Membres antérieurs	0	0	0	0
Total	164		314	

Tableau 15: Distribution des mésocercaires d'*A. alata* chez une grenouillette et une grenouille juvénile.

4.5. Discussion

Les grenouilles vertes et les grenouilles rousses *sensu lato* sont toutes deux réceptives à l'infestation par les furcocercaires d'*A. alata*. Les prévalences chez la grenouille rousse sont plus élevées que chez la grenouille verte mais la diversité des sites explorés peut être un biais de notre échantillonnage. Toutefois des travaux antérieurs sur des échantillons plus importants mentionnent effectivement une réceptivité plus importante des grenouilles rousses à l'infestation par rapport à celle observée chez les grenouilles vertes (135). L'identification des espèces hôtes, au stade têtards, nécessiterait la mise au point ou l'utilisation d'outils moléculaires dont certains sont déjà disponibles pour différencier les hybrides chez les grenouilles vertes. Tous les stades (du têtard à la grenouille juvénile) ont été trouvés porteurs du parasite quelle que soit l'espèce considérée. Certains auteurs ont tenté sans succès d'infester des grenouilles adultes avec des furcocercaires des espèces américaines alors qu'ils avaient réussi à infester des têtards de la même espèce. Ceci remet en cause les possibilités d'une infestation des adultes et privilégierait les infestations au stade larvaire.

Les têtards du groupe des rousses fréquentent aux mêmes périodes le même milieu que les mollusques, émettant des furcocercaires d'*A. alata*, ce qui est en faveur de l'infestation à ce stade. Les prévalences observées chez des grenouilles, même juvéniles, sont en défaveur de phénomènes d'accumulation de mésocercaires, ou liés peut être à une régression, tout du moins à une limitation, de leur nombre au cours du cycle évolutif du batracien. Un moyen de

confirmer cette hypothèse serait de procéder à l'infestation en laboratoire de grenouilles négatives (par exemple des grenouilles d'élevage). L'affinité des mésocercaires aux espaces péri-orbitaux (présence quasi-systématique et en nombre important) est intéressante.. Cette localisation pourrait avoir un impact sur les capacités visuelles de l'hôte ce qui pourrait limiter sa survie, notamment à la prédation et faciliterait ainsi la transmission d'*A. alata* à des hôtes paraténiques ou définitifs. L'encapsulation de mésocercaires a déjà été observée chez les espèces nord-américaines : *A. marciana*, *A. mustelae* et *A. arisaemoides* (138). Ces auteurs suggèrent que le mode d'encapsulation pouvait être associé à un sous-genre plutôt qu'à un autre: encapsulation en masse chez les *Alaria* et encapsulation individuelle chez les *Paralaria*. Ici l'encapsulation est individuelle et plus rarement par groupes de quelques individus, ce qui est contradictoire avec la proposition de Hofer and Johnson (138).

Chapitre 4 Mésocercaires et hôtes paraténiques

1. Chez le Sanglier

1.1. Prélèvements et protocoles d'analyses

1.1.1. Méthode de migration

Nous avons utilisé la méthode de migration pour toutes les recherches de mésocercaires sur sanglier ou sur souris. Cette méthode, mise au point par Riehn et al. en 2010 est basée sur plusieurs observations : la mobilité de la mésocercaire et son affinité pour les milieux liquides. La technique de migration (AMT, *A. alata* mesocercariae migration technique) reprend une méthode utilisée historiquement pour la recherche des larves de nématodes pulmonaires dans les fèces d'animaux. La technique de Baermann qui s'appuie sur l'hygrotopisme positif de ces larves.

1.1.1.1 Matériel nécessaire

Le **Tableau 16** récapitule le matériel nécessaire pour la technique de migration.

Verrerie	1 entonnoir en verre de 10 cm de diamètre 1 éprouvette graduée en verre de 50 ml pour entonnoir 1 tubulure du diamètre de l'embouchure de l'entonnoir, de 60 mm de long
Petit matériel	Matériel de découpe (couteau, ciseaux et pinces) 1 Clamp Une planche à découper 1 passoire en plastique, de 9 cm de diamètre, de 0,8mm de maille loupe binoculaire ou un trichinoscope 1 boîte de Pétri 1 entonnoir en verre de 10 cm de diamètre Balance précise au 0,1g
Réactifs	Eau chauffée à 46-48°C

Tableau 16: Matériel et réactifs nécessaires à la réalisation d'une recherche de mésocercaires par la technique de migration.

1.1.1.2 Echantillons

L'échantillon doit peser au moins 30g et peut être constitué de tissus musculaires, adipeux, connectifs ou glandulaires. Il est recommandé d'utiliser des échantillons de 5g prélevés sur plusieurs sites du sanglier (6 sites x5g)

1.1.1.3 Analyse

Le montage initial présenté ci-dessous dans la **Figure 21**. Les 30g d'échantillon sont découpés grossièrement en cubes de 0,5 cm de côté et transférés dans la passoire.

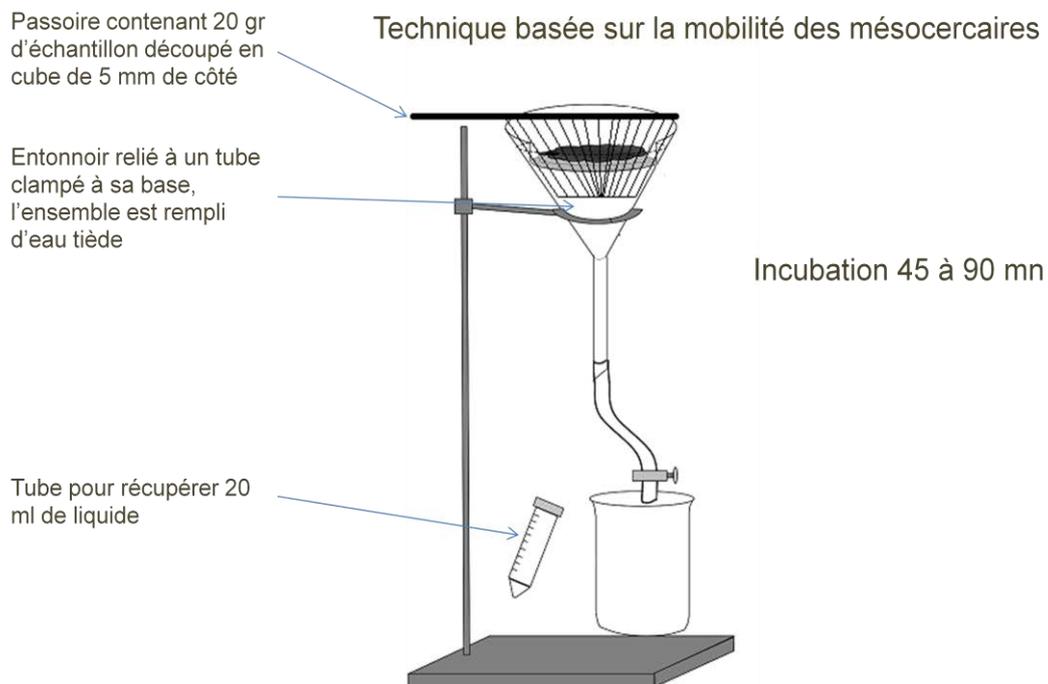


Figure 21: Technique de Baermann modifié : dispositif utilisé

Un volume de 150ml d'eau chaude (46-48°C) est versé dans l'entonnoir afin d'immerger complètement l'échantillon. L'ensemble est laissé ainsi pendant 90 mn à température ambiante. A la fin de cette période, 20 ml sont récupérés dans une éprouvette graduée en relâchant le clamp à la base de la tubulure puis sont versés dans une boîte de Pétri auxquels sont ajoutés les eaux de rinçage. La lecture se fait à la loupe binoculaire

(grossissement X15 à X20). Tout élément suspect doit être observé à des grossissements plus importants (X60 à X100).

1.1.2. Prélèvements

Pour l'ensemble des études qui ont été effectuées sur sangliers, nous avons utilisé des échantillons provenant de six individus différents. Deux individus étaient des sangliers âgés de un à deux ans et abattus dans la réserve de l'île de Rhinau dans le Bas-Rhin. Quatre individus ont été abattus dans le cadre de la régulation de populations du parc de vision de la forêt d'Orient (coordonnées géographiques données dans le chapitre 3).

1.2. Répartition spatiale au niveau des carcasses

Nous avons récupéré 15 prélèvements sur chaque sanglier et les avons analysés en utilisant la technique de migration. Sur les sangliers du parc de vision nous avons trouvé des densités très élevées de mésocercaires atteignant plus de 1000 larves pour 100 g dans la gorge, la langue et le diaphragme. Ces infestations massives prouvent que le sanglier peut héberger des densités très élevées du parasite et que le succès des infestations est probablement très élevé chez le sanglier et chez les hôtes paraténiques en général. Différentes formes de mésocercaires ont été identifiées et nous pensons au vu de ce polymorphisme que le Sanglier s'infeste par vagues successives et accumule ainsi un grand nombre de parasite. La distribution est très éclatée sur les carcasses mais préférentiellement localisée au niveau des tissus antérieurs de l'hôte. Les tissus prélevés pour la recherche de trichine (langue et diaphragme) peuvent être utilisés pour la recherche d'*A. alata* car ils sont fortement parasités et sont souvent positifs même chez les hôtes faiblement porteurs. La technique de migration s'est avérée être très efficace et simple à mettre en œuvre. Ces manipulations font l'objet d'un article qui doit être revu avant soumission.

A study of the predilection sites of the trematode *Alaria alata* in wild boars (*Sus scrofa*) from the east of France

Portier J *et al.*

Key words : *Alaria alata*, *Distomum musculorum suis*, Boar, *Sus scrofa*, predilection sites

Summary

The parasite *Alaria alata* has recently been identified in many wild boar carcasses throughout Europe. Though wild boars were identified as paratenic hosts to the mesocercarial stage of *A. alata*, the parasite's distribution in boar carcasses had yet to be analyzed. This study uses the *Alaria* migration technique to study the distribution of the parasite in 6 wild boar carcasses from the East of France. Results help assess the efficiency of tissue sampling for the official *Trichinella* inspection method in the detection of *Alaria alata* mesocercaria.

Introduction

The parasite *Alaria alata* has been present and known on European landscapes since the 19th century and was identified many times in boars (*Sus scrofa*) (18, 113, 119, 121) at the mesocercarial stage (also called *DMS: Distomum musculorum suis*). The mandatory *Trichinella* inspection in all boar carcasses meant for human consumption (107) has led to many findings of this parasite. It has now become a major cause of carcass destruction in some areas of Europe including the Alsace region in France where more than a hundred findings are reported each year (113). This increase in identifications, though probably due to the implementation of systematic analysis, has led to many questions concerning the danger this parasite could represent for humans. In several publications, mesocercaria from boars have been fed to mice, rats and Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) and in all cases, infestations were successful and sometimes massive (102, 123). Recently, human cases have been strongly suspected in Poland after consumption of insufficiently cooked wild boar and goose meat (103). The clinical signs described were non specific and very close to those of trichinellosis. No indication of the levels on infection of the boars' meat or the number of human cases which did occur is given in this paper. Since this rise of interest in *Alaria alata*, a new method – the *Alaria* migration technique (AMT) -has been designed which is much more effective for the specific search of mesocercaria in meat (124). This publication also

gives a first indication of predilection sites of mesocercaria in boar carcasses though it was not the initial aim. In spring 2012, new rules concerning *A. alata* in boars were implemented in France, instating the alaria migration technique as a non mandatory analysis for the search of mesocercaria in parallel to that of *Trichinella* .

Before these new guidelines, the official *Trichinella* inspection method was the only recognized method for the search of mesocercaria in France and it still is the only mandatory analysis. This official method focuses on specific tissues i.e the tongue, the diaphragm and the anterior limb. All these tissues are elective sites for *Trichinella sp.*. Though it has been proven that this method is not ideal for the search of mesocercaria, it is important to know if tissues sampled for this method are elective sites for mesocercaria, were it be for this method or a method to come.

The aim of this study was to establish a cartography of the distribution of mesocercaria in naturally infested wild boars, identify predilection sites and characterize the dissemination of mesocercaria in order to assess the suitability of the tissue sampling initially designed for *Trichinella sp.*. This study uses the *Alaria* migration technique designed by Riehn, Hamedy (124) on fifteen samples covering the whole carcass of 6 wild boars from Northeastern France.

Material and methods

During the winter 2011, 6 wild boars were hunted and used for the purposes of this study. Two boars originated from a hunting session on the Rhinau Island (Rhine valley, East of France) and four Boars were obtained from the regulation of a population in a closed park in the Orient forest (Champagne-Ardenne *région*, East of France, 4°42 E, 48°28 N). Age was given by general aspect and dental composition. Animal number, age, sex and origin are given in table 1.

Boars number	Origin	Sex	Age	Weight
1	Rhinau island	Male	2 years	50 kg
2	Rhinau island	Male	3-4 years	50 kg
3	Orient forest	Male	4-5 years	110 kg
4	Orient forest	Male	Less than 1 year	30 kg
5	Orient forest	Female	Less than 1 year	25 kg
6	Orient forest	Male	Less than 1 year	30 kg

Table 1: number, origin, sex, age and weight of each boar tested during this study.

For both areas, boars harboring mesocercaria had already been found during compulsory *trichinella* inspections. From each boar, 15 samples weighing at least 30gr were taken, identified, kept at low temperature (4°C) and transported to the laboratory in less than 24 hours. Sampling was designed in order to represent tissues sampled for the official *Trichinella* inspection and also a complete mapping of the carcass. Samples taken were the following, from most anterior to posterior part of the carcass:

1. Tongue
2. Muscles associated to the tongue: genioglossus, hyoglossus and styloglossus mm.
3. Cheek: masseter m.
4. Muscles associated to the throat: sternohyoid, omohyoid and thyrohyoid mm.
5. Neck: Brachiocephalicus m.
6. Anterior limb, lateral: Long head of the triceps m.
7. Anterior limb, medial: subscapular m.
8. Chest: Latissimus dorsi m. between the fourth and fifth rib
9. Diaphragm: lateral part
10. Diaphragm pillar
11. Abdomen: External abdominal oblique m. and peritoneum
12. Greater omentum
13. Longissimus thoracis m.
14. Posterior limb, lateral: femoral bicep m.
15. Posterior limb, medial: gracilis m.

All samples presented above were used for the search of mesocercaria using the *Alaria* migration technique (124). This technique was used as recommended by authors with one exception. The rubber hoses were attached at their bottom to glass tubes of a 25 ml capacity. All tissues were analyzed the day after the kill in order to ensure no loss of mesocercaria due to degradation. Certain tissues were tested several times after day 1. The parasite burden of a sample is given as the number of mesocercaria per gram and a rate of infection (RI) was

calculated using the following formula, $RIx = \left[\frac{\text{mesocercaria/gr}_{(x)}}{\text{mesocercaria/gr}_{(\text{total})}} \right] * 100$, the total mesocercaria/gr being the sum of all mesocercaria/gr_(x).

Results

All wild boars killed for this study were positive for mesocercaria though burdens were very different. From the wild boars originating from Rhinau island, 2 and 11 mesocercaria were found respectively after analyzing 976gr (32 samples on boar n°2) and 926gr (32 samples on boar n°1). These two boars were considered as carrying low parasite burdens. Very high parasite burden were found on the wild boars from the Orient forest in all tests carried out in the 24 hours after the hunt. For the wild boar n°3, 29 samples were tested, 1434 mesocercaria were found for a mean burden of 184 mesocercaria/100gr. For the wild boars n°4, 5 and 6, 15 samples were tested and 467, 718 and 637 mesocercaria were found for mean burdens of 136, 195 and 174 mesocercaria/100gr. Parasite burdens ranged from 0 to 1964mesocercaria/100gr in the tissues. The distribution of mesocercaria was not homogen throughout the whole carcasses. In carcasses from Rhine valley, 6 tissues out of 15 were positive: the muscles associated to the tongue, the tongue, the chest, the diaphragm, the diaphragm pillars and the abdomen. These six tissues were positive every time for the boars from the Orient forest, together with three other tissues: the cheek, the throat and the greater Omentum. All tissues were positive at least once for the wild boars from the Orient forest. The ratio of positive tests versus total tests is given in table 2 for each tissue.

	Number of positive samples/number tested	
	Low burden (Rhine)	High burden (Orient forest)
Tongue	1/4	5/5
Muscles associated to tongue	1/4	4/4
Cheek	0/4	5/5
Throat	0/4	5/5
Neck	0/4	2/5
Anterior limb lateral	0/4	2/5
Anterior limb medial	0/4	4/5
Chest	1/4	4/4
Diaphragm (muscle associated to ribs)	1/4	4/4
Diaphragm pillar	3/4	4/4
Abdomen	1/4	5/5
Sirloin	0/4	4/5
Greater omentum	0/4	5/5
Posterior limb lateral	0/4	1/5
Posterior limb medial	0/4	2/5

Table 2: number of positives samples for number of samples tested, for each tissue. Tissues in bold characters are those used for the official *Trichinella* inspection methods. Tissues highlighted in grey were positive at least once for low burden boars and each time tested for high burden boars.

In all the wild boars tested, mesocercaria seem to concentrate around the oral sphere and the diaphragm. For four carcasses, the two most infected tissues are the muscles associated to the tongue and the pillars of the diaphragm. For the fifth carcass the most heavily infected tissues are the muscles associated to the tongue and the throat. mesocercaria burdens for each tissue of each boar are given in table 3.

	Carcass number					
	1	2	3	4	5	6
Tongue		1,6	180,0	102,0	222,6	191,6
Muscle associated to tongue	6,4		1546,1	374,6	1000,0	579,8
Cheek			6,7	12,9	19,7	32,4
Throat			463,6	88,5	91,8	138,2
Neck					3,3	
Anterior limb lateral				26,3	3,2	
Anterior limb medial			23,0	9,8	23,0	33,1
Chest	1,6		29,2	74,6	126,0	51,3
Diaphragm	0,8		28,9	157,6	119,0	191,5
Pillar of the diaphragm	9,8	1,7	182,4	926,7	967,5	1006,0
Abdomen	1,6		106,8	189,5	221,5	309,0
Sirloin			3,3	38,9	6,6	59,6
Greater omentum			9,8	13,3	82,5	16,2
Posterior limb lateral					10,0	
Posterior limb medial				23,1	29,7	6,6

Table 3: parasite burdens (mesocercaria/100gr) given for each tissue of each boar. Tissues in dark grey are the two most heavily infested for each carcass, tissues in light grey are the three next.

The distribution of mesocercaria in the boar n°3 seems different. The aspect of all mesocercaria from the young boars was homogen, with intense movement, well marked internal structures. In the boar n°3, mesocercaria with impaired movement and less well marked structures were observed. These mesocercaria were darker with irregular envelopes and seemingly engorged excretory vesicles (figure 1).

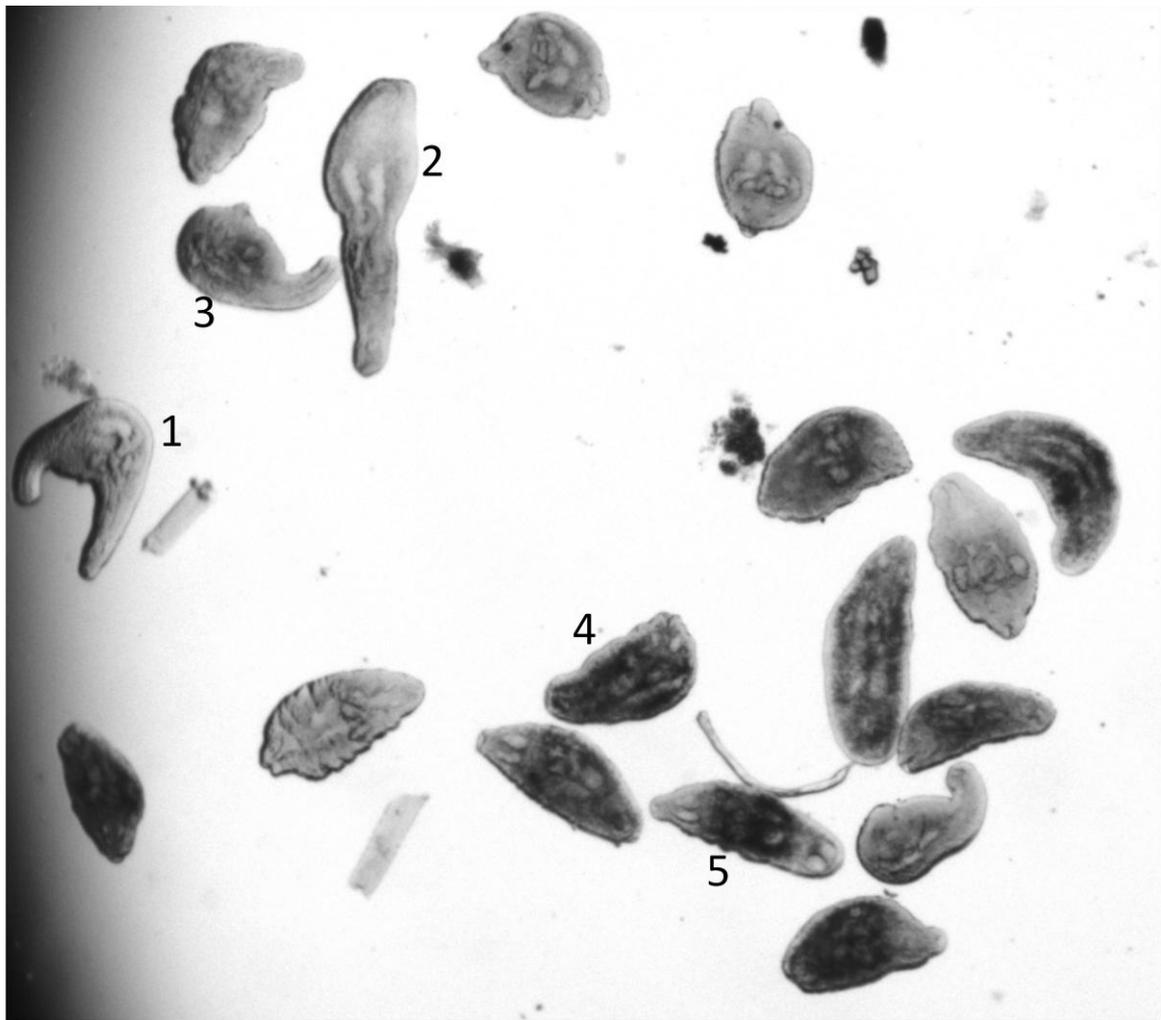


Figure 1: mesocercaria obtained using AMT on boar n°3. mesocercaria displayed well marked internal structures and were very mobile (1, 2 and 3) or showed irregular envelopes and were darker with less visible internal structures, engorged secretory canals and excretory vesicles (4 and 5). Mobility was also impaired with less lateral movements.

Discussion

The wild boar population from the orient forest shows the highest parasite burdens ever observed in the literature. These wild boars showed a mean parasite burden of 1.36 to 1.95 mesocercaria/gr which is much higher than the densities given by Riehn, Hamedy (124) which were of 0.45 mesocercaria/gr at their highest. In several samples, densities were above 10 mesocercaria/gr. Such high densities point that humans can be exposed to very high numbers of parasites, sometimes of the order of 1000 larvae in one meat intake. This added to reports that mesocercariae from wild boars can infest mice and Rhesus monkeys (102, 123)

and recent reports of Human alariosis in Poland due precisely to wild boars' meat confirms the danger for humans (103). The exposure of humans to mesocercaria through insufficiently cooked boars' meat can be higher than previously expected. These wild boars lived in a closed area on the borders of the Orient forest lake, which are specific breeding conditions. The publication by Riehn, Hamedy (124) gives parasite burdens from a higher number of hunted wild boars. These burdens are probably closer to those generally observed and burdens from this publication would seem generated by exceptional exposure which remains however possible in specific conditions. The tissues designed as elective sites for *Trichinella sp.* and used for the official meat inspections are the tongue, the diaphragm and the brachial triceps. On the basis of these results, it seems that when possible, the tongue and the diaphragm (especially the pillars) should be taken in priority for the search of both *Trichinella sp.* and *Alaria alata*. Though the distribution of mesocercaria is more erratic than for *Trichinella sp.*, several tissues are shown to be predilection sites. Therefore, the use of taking aliquots of 5gr of 6 different tissues of different compositions does not seem relevant to us. The dispersal of mesocercaria seems to concentrate in tissues which are anterior to the diaphragm (85 to 95,4% of the total burden) and tissues close to the anterior portion of the digestive system seem more infected: tongue, muscles associated to the tongue, throat, diaphragm, chest. The pathways mesocercaria use between ingestion and final elective tissues have yet to be studied. It is possible that mesocercaria do not evade the bowl and wander in the abdominal cavity; their pathways may be more specific. Ways of dissemination of digenetic trematodes usually include excystment of metacercariae in the small intestine and dissemination into the intestine or out towards the terminal organ (ex: liver for *Fasciola hepatica*). However mesocercaria are mesocercariae and are not encysted like metacercaria of other species. In front of this unique stage, we discuss the possibility that pathways of dissemination might be different. Investigations with American *Alaria* species seem to show that evasion from the digestive tract takes place in the stomach. In definitive (139) and paratenic hosts (117), mesocercaria pass through the stomach wall and through the diaphragm towards the lungs. We discuss the possibility that *Alaria alata* mesocercaria might follow the same pathways: passing into the abdominal cavity through the stomach wall and then wandering towards the anterior parts of the body through the diaphragm, concentrating in this latter muscle. From the four boars originating from the Orient forest, one wild boar weighed 110kg and was estimated to be 4 to 5 years old. Results show that this boar had high mesocercaria densities which were distributed slightly differently from the other younger boars. This seems to show that boars do

not eradicate mesocercaria with age even though definitive conclusions cannot be drawn from one individual. The differences in the distribution of mesocercaria in this particular boar points out the importance of testing different age classes before deciding which tissues should be used for the search of mesocercaria. During our tests on this particular boar we found morphologically different mesocercaria: typical mesocercaria forms with well marked structures and darker, more irregular forms. We believe that these different forms correspond different times of infection and that the darker forms correspond older infections. This study was designed to characterize elective sites in the muscular tissues and find assess the suitability of tissues used in *Trichinella* inspection for the search of mesocercaria. To these ends, many tissues were neglected as they have been neglected by similar studies. The distribution of mesocercaria in other species including Rhesus monkeys leads us to think that other tissues could be elective site or at least bear high densities, these tissues are the esophagus, the mediastinum, the heart, the pericardium, abdominal and thoracic greases.

Conclusion

This study revealed the highest mesocercaria burdens ever published and shows that human exposure can be very high with naturally infested wild boars. These high burdens also indicate the strong capacity of mesocercaria to pass species barriers and point out that by tolerating high mesocercaria densities, wild boar can be an indicator of the parasite's presence.

1.3. Résistance

Sur les mêmes sangliers que nous avons utilisés pour l'analyse de la répartition des mésocercaires, nous avons procédé à des tests de résistance à la congélation et au froid. Pour ce faire nous avons testé des échantillons de certains tissus dans les 24 heures suivant l'abattage puis nous avons conservé le reste des tissus soit à -16°C (pour correspondre aux températures atteintes dans un congélateur domestique) ou à $+5^{\circ}\text{C}$. Sur trois paires de piliers de diaphragmes, nous avons observé à J0 des densités élevées de parasite non retrouvées après 4 jours de congélation. Il apparaît donc que les mésocercaires ne résistent pas à la congélation. Des tests préliminaires avaient mis en évidence une mésocercaire vivante après 5 jours de congélation à la même température. En revanche elles résistent très bien aux basses températures : les densités parasitaires n'ont pas baissé dans les tissus testés après 7 jours de conservation au froid positif. Des mésocercaires récupérées sur des tissus vieux de deux semaines (en décomposition très avancée) ont infesté avec succès une souris. Ceci montre que les mésocercaires persistent non seulement chez l'hôte vivant mais également dans les carcasses pendant plusieurs jours. Ces résultats font l'objet d'un article devant être revu avant soumission.

Persistence of *Alaria alata* mesocercariae in Boars meat, experimental tests for freezing and low temperatures.

Portier J *et al.*

Summary

The presence, more and more frequent, of *Alaria alata* mesocercariae in boars meat and the zoonotic menace it represents lead to questioning concerning the resistance of the parasite to thermal treatments and in particular to freezing. Reports from laboratories indicate that the longer the delay between kill and test is, the harder the parasite is to find. This study is aimed to answer question concerning the persistence of *Alaria alata* mesocercariae in wild boars meat after freezing and storing at +5°C.

Introduction

One of the latest emerging parasites in Europe is the trematode *Alaria alata*. This parasite was first identified in the late 18th century and many studies were undertaken during the 20th century to clarify this parasite's life cycle. *A. alata* has a nearly unique life cycle. Like many trematodes it has a three host life cycle with two intermediate hosts (a Planorbid snail and an amphibian) and one definitive host (canids). The particularity of this parasite is that it has a mesocercarial stage that develops in amphibians but can also infect many paratenic hosts when the amphibian is eaten. Since the late 19th century, the mesocercarial stage of the trematode *Alaria alata* (also called *DMS* for *Distomum musculorum suis*) has been known to infect wild boars as paratenic hosts but was not considered as a menace for humans until recently. The compulsory *Trichinella* inspection of all hunted wild boars entering commercial circuits has led to more frequent discoveries of boar carcasses infected by mesocercaria (113, 119-121). Though this pathogen is not the target of the *trichinella* inspection, it can be detected using this analysis. Recently, first cases of human alariosis due to undercooked meat have been diagnosed (103) in Poland. No information is given in this paper regarding the means of detection used for the diagnosis of alariosis. Beside these human cases, many reports of successful infection of paratenic hosts with mesocercaria from wild boars have been made. Infected species include mice, rats and rhesus monkeys and these infections were sometimes massive with significant impact on the host's health. In France, certain regions are frequently confronted to infected carcasses especially the Eastern region of Alsace, which now counts more than a hundred infected carcasses every year (113). The zoonotic potential,

suspected and now confirmed, leads to questioning concerning the treatments which can be implemented to infected carcasses to eradicate mesocercaria. In France, positive carcasses must be destroyed but carcasses from a positive pool (without an individual identification) can undergo a two weeks freezing process supposed to eradicate mesocercaria. A first report showed that live mesocercaria were still found after 5 days freezing at -16°C (113) but this indication was made using the digestion method which is not the best method for detecting mesocercaria (124) and it was carried out on carcasses displaying low parasite densities. Tests carried out using the *Alaria* migration technique, more sensitive and based on larval mobility, on highly infested carcasses were needed. Local laboratories which regularly encounter infected carcasses, all report the same observation: it is often difficult to identify an infected carcass after a positive pool has been detected (personal communication). According to these laboratories, mesocercaria do not seem to persist long enough to be detected. As samples are kept at $+5^{\circ}\text{C}$, these observations logically lead to questioning concerning the persistence of mesocercaria at $+5^{\circ}\text{C}$. This study establishes the persistence of mesocercaria in wild boars after freezing and after conservation at $+5^{\circ}\text{C}$ and gives indications for treatment of infected carcasses through freezing.

Material and methods

During the winter 2011, four wild boars were hunted and used for the purposes of this study. First tests using the *Alaria* migration technique (AMT) had shown that these four carcasses harbored high numbers of mesocercaria. All samples used for the search of mesocercaria were tested with the AMT (124). This technique was used as recommended by authors excepted that the rubber hoses were attached at their bottom to glass tubes of a 25 ml capacity. Four tissues were used for the study of resistance at 5°C : the Tongue, the muscles associated to the throat (sternohyoid, omohyoid and thyrohyoid mm) the diaphragm (lateral part) and the abdomen (External abdominal oblique m. and peritoneum). All tissues were tested using AMT 24 hours after the kill and were then stored at 4°C . A probe was used to control the temperature in the fridge. Different tissues were tested after different delays of storing. All tissues were not tested for every delay in order to have enough tissue to last the whole test. All freezing tests were carried out at the temperature of -16°C in order to match domestic conditions. One diaphragm pillar of each boar was tested for mesocercaria using AMT. the second pillar was frozen for 4 days (counted from the moment the pillars were at -16°C), defrosted at room temperature and tested for mesocercaria using AMT. The three

pillars of the diaphragm were frozen for 4 days in individual store bags. A fourth pillar was used to control the temperature: a probe was stuck in the center of the sample. In order to test the infectivity of mesocercaria found after freezing or storing at 4°C, OF1 female mice were infected by 30mesocercaria in 20µl saline and tested using AMT after 7 days.

Results

Results of all tests conducted for the assessment of resistance at +5°C are given in table 1.

	Carcass number	Parasite burden (mesocercaria/100gr)					
		Day 1	Day 3	Days 6/7	Day 9	Days 13 to 16	Day 21
Diaphragm	1	28.9		137.6			16.7
	2	157.6					0.0
	3	119.0					0.0
	4	191.5		382.9			0.0
Tongue	1	180.0		242.6		134.2/371.3/296	
	2	102.0	307.9	17.3		.5	
	3	222.6	380.8	197.5			
	4	191.6	302.3	64.1			
Throat	1	463.6		355.1	125.0	12.6/19.4/0	
	2	88.5	162.8	441.6	160.9	93/159.1/323.6	
	3	91.8	186.3	94.6	306.0	281/419.1/176.3	
	4	138.2	176.1	377.9	205.1		
Abdomen	1	106.8		43.0			
	2	189.5		408.8			
	3	221.5		231.8			
	4	309.0		336.4			

Table 1: results of AMT tests on all tissues for all times. For clarity reasons, days 6 and 7 were regrouped (tongues tested on day 6 and the rest tested on day 7) and days 13 to 16 were regrouped.

Six samples (throat and tongue) were tested at day 3. Figure 1 shows that parasite burdens were higher at day 3 than at day 1 (Wilcoxon signed rank test p-value=0,03125) all tissues considered.

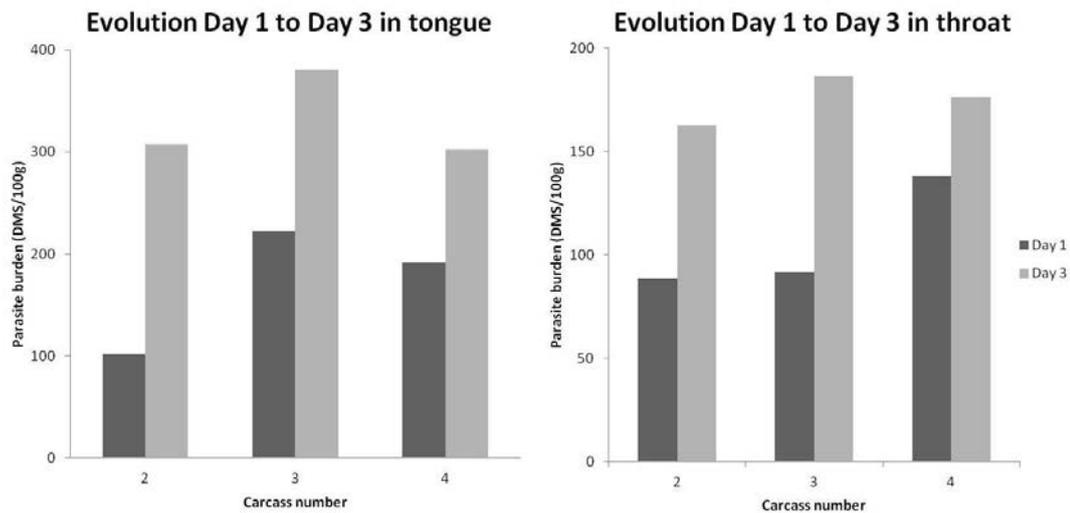


Figure 1: Evolution of parasite burdens between day 1 and day 3 for the tongues of boars 2, 3 and 4 and the throats of boars 2, 3 and 4. Tissues were preserved at +5°C.

Fourteen samples were tested at days 6 and 7, no significant trend could be observed: at day 9, four throat samples were tested, no significant decrease can be observed. At days 13, 15 and 16, the throats of all boars were tested, no significant decrease or increase can be observed. Two mice were infected with 30 mesocercariae from days 15 and 16 in order to check the infectivity of these mesocercariae. Both mice were tested using AMT and respectively 6 and 16 mesocercariae were found 7 days after infection. At day 20, two tongues were tested. A decrease in parasite burdens can be observed (respectively 18,62 and 30,42 mesocercariae/100gr at day 20 versus 180 and 88,52 mesocercariae/100gr at day 1). At day 21, the diaphragms of all boars were tested. Three samples out of four were negative and the fourth sample showed a low burden in parasites (16,67 mesocercariae/100gr at day 21 vs 28,94 mesocercariae/100gr at day 1).

For the assessment of resistance to freezing at -16°C, the pillars were tested using AMT. Before freezing, 56, 149 and 1006 mesocercariae were found for burdens of 182.4, 968 and 1006 mesocercariae/100g. No live mesocercariae were found after freezing, (0, 3 and 2 dead mesocercariae found). All dead mesocercariae had the same aspect: the parasites seemed inflated and showed no internal features. The only visible features were the oral and ventral suckers.

Discussion

During this study, we found that mesocercaria show a great resistance to low temperatures (+5°C). Indeed no relevant reduction could be observed before 20 and 21 days at +5°C. After 7 days, the samples started degrading rapidly and could be considered inedible from this delay. mesocercaria found at 15 days of low temperatures were still infective. Low temperatures cannot be considered as a way of reducing mesocercaria densities in meat. Parasite burdens are largely maintained for at least 7 days of low temperatures. In order to ensure that mesocercaria did not evade the tissues, the storebags were always rinsed to search for free mesocercaria and the number of mesocercaria found nether exceeded 2: mesocercaria do not massively evade the tissues. From day 1 to day 3, a significant increase in parasite densities was observed. This seems surprising when compared to observations of local laboratories which use digestion methods. The explanation which has been found to explain this is that mesocercaria might be retained in fresh meat and become more mobile with time, were it be because they move more or because they were trapped in a capsule or a cyst when the boar was alive. The little knowledge we have on the reaction of the host to the presence of mesocercaria does not let us conclude on this matter. Parasite burdens may vary among the same tissue. For this study, differences in densities for a same tissue might sometimes have been due to these variations. We do not believe that this would be the reason for an increase between day 1 and day 3. For the same tissues, high variations in parasite burdens were observed from one delay to the other. This was the case for the tissues tested at days 13, 15 and 16. It seems that mesocercaria could concentrate in certain portion of one tissue and that their distribution in a single tissue is not homogen. The long term resistance of mesocercaria in boar carcasses and the fact that mesocercaria from wild boar are still infective means that the boar, even as a paratenic host, can play a non negligible role in the dissemination of mesocercaria. In the major part of Europe, the definitive host for *A. alata* is the red fox (*Vulpes vulpes*). This species does not hunt wild boars but will feed on carryon which can represent up to 20% of its total diet in the cold seasons (140). Persistence of mesocercaria in wild boar carcasses is of importance for the transmission to the definitive hosts. The freezing tests showed that no live mesocercaria could be found after 4 days at -16°C in the pillars of the diaphragm. The pillars of the diaphragm are among the most parasitized muscles. The fact of finding dead mesocercaria and no live mesocercaria shows that 4 days freezing are sufficient to eradicate mesocercaria from meat. However in a precedent study, one live mesocercaria was found after 5 days freezing. We consider that 5 days at -16°C (which corresponds the general temperature of a domestic freezer) at the heart of the meat are

sufficient measures to ensure complete eradication of mesocercaria. The pillars used for this study were taken from highly parasited boars which lived in very specific conditions. The boars came from a closed park on the border of the Orient forest lake and we believe that their exposure to mesocercaria was exceptionally high. In order to ensure complete inactivation however, we would advise that boar's meat be kept for 7 days at -16°C at heart.

Conclusion

Resistance tests carried out in this study show a good resistance of mesocercaria in carcasses at +5°C and an inactivation of mesocercaria in highly parasitized tissues after 4 days freezing at -16°C. We believe that a 7 days freezing at -16°C at the heart of the meat is sufficient to eradicate mesocercaria from any tissue.

2. Infestations expérimentales sur rongeurs

Nous avons pu travailler sur des hôtes paraténiques naturellement porteurs mais pour établir la capacité des mésocercaires à parasiter des hôtes paraténiques nous devons travailler sur des hôtes pour lesquels nous maîtrisons les doses infestantes. Nous avons choisi d'utiliser les mésocercaires récupérées sur sangliers pour infester par voie orale des souris femelles de souche OF-1. Le but de ce travail était de vérifier la capacité infestante des mésocercaires issues d'un hôte paraténique pour un autre hôte paraténique. Pour rechercher les mésocercaires chez les souris nous avons à nouveau utilisé la méthode de migration ainsi que la dissection fine sur les plus petits échantillons. Nous avons réussi à infester les souris avec des succès atteignant 95%, montrant ainsi que le passage d'hôte paraténique à hôte paraténique est très aisé pour la mésocercaire. Nous avons également réussi à infester une souris avec des mésocercaires issues elles-mêmes de souris. La répartition que nous avons observée chez les souris est proche de celle observée chez le sanglier. Ces résultats font l'objet d'un article qui doit être revu avant soumission.

***Alaria alata* mesocercariae and mice: observations on the infectivity and host-parasite interactions from experimental infections with mesocercaria from hunted wild boars.**

Portier J *et al.*

Summary

The trematode *Alaria alata* is one of the rare parasites to display a mesocercarial stage. This stage is particular in many respects and can infest a very wide variety of mammals, birds and reptiles. It is also a potential zoonotic stage: the major source of infection is insufficiently cooked wild boars' meat. In order to characterize the relations between mesocercaria and paratenic hosts, a suitable laboratory model had to be found. In this paper we report successful experimental infections of mice with mesocercariae from wild boars. The success of infection can be very high (more than 90% efficiency), and this enabled us to study the parasite's distribution within the host. We also report successful infection of one mouse with mesocercaria from mice.

Introduction

The parasite *Alaria alata* has been known for more than three centuries over all Europe. Reports of this parasite in its definitive host cover all Europe from Spain to Russia (46, 61, 62, 131, 141) and findings have been reported on other continents (73, 74). Though these reports have mainly been made on wild canids, the definitive hosts, the main questions concern the mesocercarial stage which is a unique feature of Strigeoids. Indeed, *Alaria alata* has a three stage life cycle and needs two intermediate hosts (a planorbid snail and an amphibian) and a definitive host (canids) (19). The mesocercarial stage, which occurs in amphibians, has the ability to infect a wide range of paratenic hosts including birds, reptiles and mammals. It is a zoonotic stage for both European and north-American *Alaria* species (103, 117, 122, 142). Many studies and reports exist on naturally infected paratenic hosts, especially in wild boars (*Sus scrofa*) Humans (102, 113, 119, 120, 143) which represent a potential sources of infection to. However studies on laboratory models are scarce. Dollfus and Chabaud succeeded in experimentally infecting mice and rats with mesocercaria from boars and Odening succeeded in infecting a Rhesus monkey with the same source (123). Several studies were made in the former SSR on more inhabitual species (hens, ducks) (19). These studies mainly report successful infections but without indications on the parasite loads, the host-parasite interactions and rarely the distribution within the host. Works on naturally infected animals are limited due to the difficulty of finding such individuals and controlling infection parameters. Maintaining Boars in experimental conditions is expensive and need specific structures. There is a real need for a laboratory model which would enable works on paratenic host/mesocercaria interactions. During this study, we chose OF1 mice as a laboratory model for the infection by mesocercaria and tried to give first indications on the relation within this couple.

Material and methods

During the winter 2011, a high number of mesocercaria was retrieved during the analysis of wild boar carcasses from the Orient forest (Champagne-Ardenne region, East of France). Seven mice (mice n°1 to 7) were infected by feeding 30 mesocercaria in 20µl saline. These seven mice were tested for mesocercaria seven days after infection. Three mice were infected the same way and kept alive for one month. One mouse was infected the same way with 30 mesocercaria from first mice in order to test the infectivity of mesocercaria from mice and tested after 7 days. All mice were 6 week-old OF-1 female mice. Each mouse was

subdivided into 15 samples in order to ensure a complete mapping of the individual (Table 1). Among these 15 samples, nine were tested using the *Alaria* migration technique (described below) and six smaller tissues were finely dissected.

Tissue	Mean weight (gr)	Detection method
Head	2.55	
Neck	0.69	
Anterior limbs	2.45	
Thoracic vertebra and associated tissues	1.49	Alaria migration technique
Ribs	2.25	
Abdominal vertebra and associated tissues	1.41	
Abdomen	1.30	
Sacral vertebra, sacrum and associated tissues	2.70	
Posterior limbs	3.19	
Tongue	0.11	
Throat (larynx, oesophagus and associated tissues)	0.50	
Heart and mediastinum	0.36	Dissection
Diaphragm	0.14	
Abdominal fat	1.02	
Greater omentum	0.80	

Table 1: Tissue, mean weight for each tissue and type of analysis used for each tissue.

The *Alaria* migration technique was used as recommended by authors (Riehn, Hamedy, Grosse, Zeitler, & Lucker, 2010) excepted that the rubber hoses were attached at their bottom to glass tubes of a 25 ml capacity. Dissections were performed in Petri dishes using fine scissors and tweezers. Tissues were finely dilacerated in water at 47°C and observed at binoculars X20. They were observed one and left 10 min to decant. Samples were then observed a second time and a finer dilaceration was performed. All tissues were tested less than four hours after the kill.

Results

All infections of mesocercaria from boars were successful. The number of mesocercaria found ranged from 6 to 20 for the mice tested after seven days (mean = 15,43 +/-3,22 mesocercaria per mouse) (Table 2). The mouse n°8 infected with mesocercaria from mice n°3, 4 and 5 bore 12 mesocercaria after 7 days. Distribution of these mesocercaria seems

to match that of other mice although only one mouse was tested for this case and results from this mouse were therefore included in the study of the distribution.

Mouse number	mesocercaria found	Mass tested	Overall burden (mesocercaria/gr)
1	15	23,16	0,65
2	14	22,13	0,63
3	19	22,96	0,83
4	20	19,94	1,00
5	18	20,84	0,86
6	16	23,16	0,69
7	6	19,39	0,31
8	12	18,36	0,65

Table 2: number of mesocercaria found for each mouse euthanized at 7 days post-infection, mass tested and overall burden.

The success of infection ranged from 20 to 66.7% supposing that all mesocercaria present in the carcasses were found. During the tests, mesocercaria found using AMT were free and mobile in the Petri dishes. Some mesocercaria found during dissections were seen in capsules. These capsules always contained one mesocercaria, their surface was very fin and fragile, mesocercaria readily evaded the capsules in 30 to 60 minutes after discovery, and the inside was transparent. mesocercaria were able to move in these capsules. Some empty capsules were found either with a mesocercaria at close proximity or with no associated mesocercaria (Figure 1).

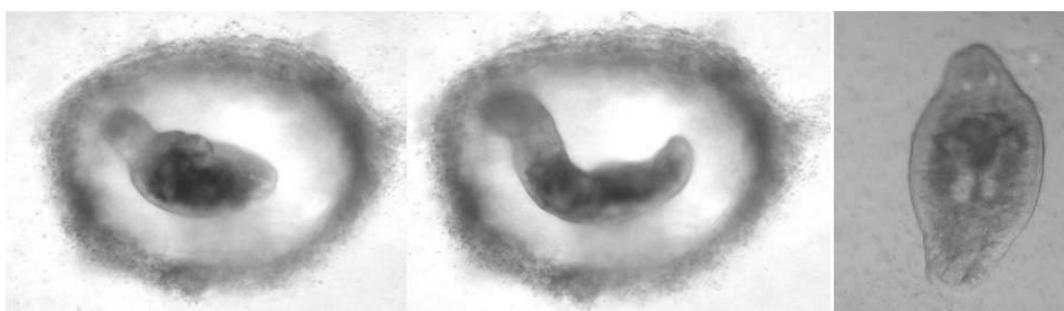


Figure 1: mesocercaria found encysted in the mediastinum, the three pictures are of the same mesocercaria, readily evading the cyst in 30 min.

The study of distribution performed on 7 mice (mouse n°1 not included) shows that the most often parasitized tissues are the ribs (tested positive for every mouse), the thoracic vertebra (positive for six mice), the heart (positive for six mice) and the diaphragm (positive for four mice). Results displayed in table 3 show that the tongue and the abdominal fat were nether found positive.

Tissue	Number of positive out of 7 tested	Median rate of infection	Standard error
Tongue	0		
Head	2	0.0	0.8
Throat	3	6.3	12.9
Neck	3	1.7	3.9
Anterior limbs	3	0.6	2.7
Thoracic vertebra	6	10.8	7.1
Ribs	7	5.7	3.1
Heart	6	16.8	14.4
Diaphragm	4	48.0	24.1
Abdominal vertebra	3	0.0	1.5
Abdomen	2	0.0	1.9
Greater omentum	2	0.0	1.5
Abdominal fat	0		
Sacrum	1	0.0	0.3
Posterior limbs	2	0.0	0.6

Table 3: For each tissue tested, number of positive samples versus 7 tested (each tissue tested for all seven mice), median rates of infection and standard error.

The mean rates of infection do not follow the same scheme as the frequency of infection. Indeed the ribs show a low rate of infection (mean RI= 6.24) and the four highest RIs are observed for the heart and the diaphragm; the thoracic vertebra and the throat. High variations can be observed: the standard deviations are high and no tissue is significantly more infected than others. The distribution in the tissues seems to vary greatly from one individual to another (Table 4).

Tissue	Mouse tested							
	2	3	4	5	6	7	8	
Tongue								
Head	0.4						0.4	
Throat					6.0	2.5	3.6	
Neck		2.7	1.3	3.5				
Anterior limbs		0.6	0.4		1.2			
Thoracic vertebra	4.1	1.3	3.6	2.5	2.4		0.7	
Ribs	1.2	1.4	0.5	3.8	0.8	0.8	1.1	
Mediastinum	11.1	8.1	6.4		2.2	3.0	5.7	
Diaphragm		33.3	17.6	13.3		7.1		
Abdominal vertebra		1.3	1.5				0.7	
Abdomen				0.8		0.8		
Greater omentum				1.4			2.9	
Abdominal fat								
Sacrum				0.3				
Posterior limbs					0.3		0.3	

Table 4: parasite burdens (mesocercaria/gr) given for each tissue of each mouse tested. Empty cases correspond zero mesocercaria found.

The most parasited for all mice are the heart, the diaphragm, the throat, the thoracic vertebra and the ribs. All the mesocercaria found for the heart were in fact in the mediastinum associated to the heart and not in the actual muscle. All tissues were regrouped into 7 categories representing the head (head and tongue), the throat (throat and neck), the thorax (thoracic vertebra, ribs, heart and diaphragm), the abdomen (abdominal vertebra, abdomen, greater omentum and abdominal fat), the sacrum, the anterior limbs and the posterior limbs. Figure 2 shows that the distribution of mesocercaria in mice is mainly concentrated on the tissues of the thorax and the throat. Posterior parts of the mice are much less burdened.

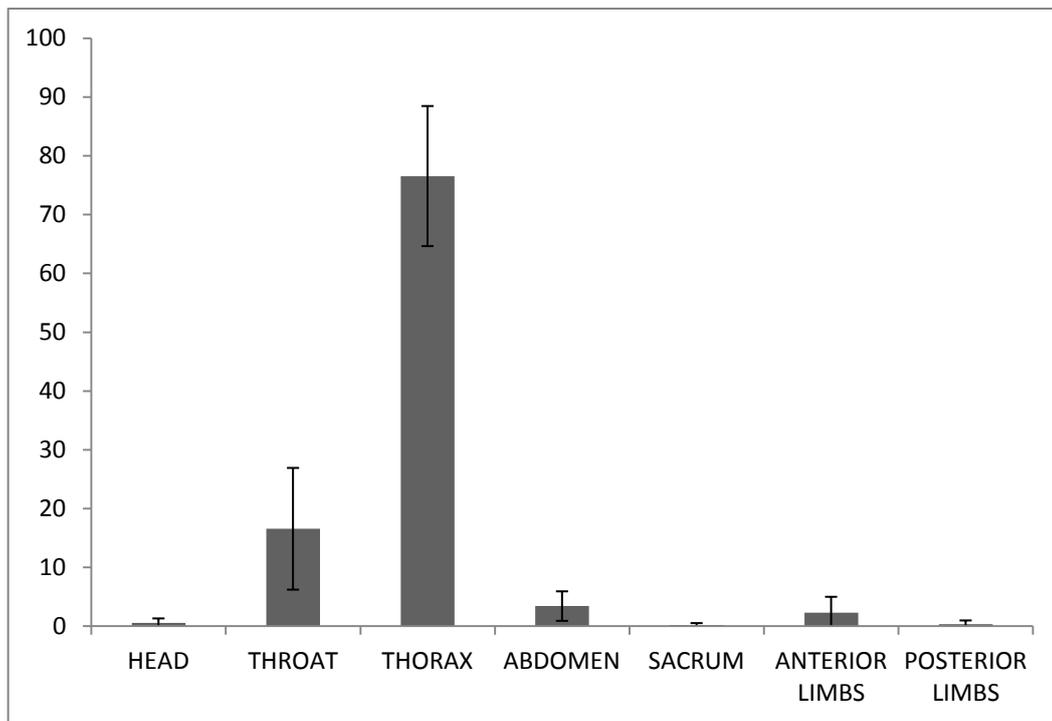


Figure 2: distribution of rates of infection according to the localization.

The three mice kept alive for one month were all positive, bearing 16 to 27 mesocercaria. No reduction in parasite densities was observed and the success of initial infection was between 53.3 and 90% at least.

Discussion

The success of infection of mesocercaria from wild boars to mice shows that mesocercaria present in wild boars, despite the fact that wild boars are paratenic hosts to this species, are still capable of infecting other paratenic hosts. This was already proved by Dollfus and Chabaud (102) but without evaluating relations between infective dose and final burdens. The success of infection rated from 20 to 90% (mean success = 50%) in this study which shows that mesocercaria easily pass from the wild boars to mice. This success of mesocercaria infection from one paratenic host to another underlines the risk that wild boar carcasses infected by mesocercaria can represent for humans. The *Alaria* migration technique has already been compared to the other available technique that is digestion. In this study, up to 90% of mesocercaria fed to the mice were found using this technique. These results underline the great efficiency of this method and we discuss the necessity of using this

method as a by-analysis for the search of mesocercaria in wild boars from selected areas. The dissections during this study showed the mesocercaria *in situ* in the tissues. mesocercaria were found encysted in several tissues including the throat (between glandular tissues), the mediastinum (in the conjunctive tissues) and in the diaphragm (muscular tissues). It is apparent that in mice, mesocercaria are able of living in different types of tissues. Free and encysted mesocercaria were found, however, many empty cysts were found which leads us to believe that in mice most of the mesocercaria are encysted. These cysts appeared very rapidly, the mice having been euthanized only 7 days after infestation. The mechanisms of the formation of the cyst for mesocercaria have yet to be identified, but mesocercaria clearly migrate and install rapidly for a cyst to form in such short delays. This encystment might not be found only in mice. These encysted forms of *Alaria alata* are comparable to encysted forms of American *Alaria* species in amphibians (138) which proves that this feature is not a specificity of *Alaria alata* and that encystment can occur both in intermediate amphibian hosts and in mammalian paratenic hosts. It is probable that mesocercaria may be present in a similar state in wild boars. In wild boars, the state of the presence of mesocercaria is still discussed. Several authors report free roaming larvae (1, 10) and others report encysted mesocercaria (6, 94). We believe, from these results that both forms are present. The distribution of mesocercaria in mice seems similar to that observed in boars with one notable exception: mesocercaria is absent from the tongue in mice. The composition of the tissue did not seem to play an important role in the distribution of mesocercaria. Several organs were not tested in this study (digestive tube, kidneys, liver, genital organs, skin, lungs). Indeed precedent infections had been made without ever finding any mesocercaria in these organs (unpublished) and other studies where a whole individual was dissected neither found mesocercaria in these organs (102, 123). Therefore the number of mesocercaria found during this study is probably close to the total number of mesocercaria and the difference between the two is due to the analysis and not the choice of the tissue. It seems that mesocercaria migration aims at muscular and conjunctive tissues and not towards abdominal organs or the lungs. Mice do not seem to react strongly to the infection by 30 mesocercaria. During this study, mice did not show any clinical signs of infection and during necropsies no anomaly was identified. Visually, mesocercaria were in the same state: no deformation, granulation or altered features could be observed. The mice tested at one month were not dissected but many mesocercaria were found using AMT, showing that mesocercaria were not trapped in cysts they could not evade. Mice do not seem able to eradicate mesocercaria within one month. The

succession of paratenic hosts does not seem to be a problem for mesocercaria. We succeeded in infecting several mice from mesocercaria from boars and succeeded in infecting one mouse with mesocercaria from three of the precedent mice. Despite loss from one infection to the other, it seems possible that in nature a chain of several paratenic hosts may occur before mesocercaria reach a definitive host. Many animals have been described as paratenic hosts including reptiles, birds and mammals (boars, mustelids). Following this logic, boars could become infected not only by eating frogs (the intermediate hosts) but also by eating live or dead animals for which frogs are a very high part of the diet: snakes or water birds. The sources of infections for boars living on wetland areas could be more multiple than initially thought and could explain the high parasite burdens observed in certain areas. Mice have shown here to be a very good laboratory model as paratenic hosts for mesocercaria. Experimental infections are easy and very successful and mice are much easier to rear than other paratenic hosts like boars.

3. Examen histologique de mésocercaires chez la souris

3.1.1. Matériel et méthodes

Nous avons infesté par voie orale 30 mésocercaires dans 20µl d'eau à deux souris femelles OF-1. La première souris a été euthanasiée après sept jours et la deuxième souris après 14 jours. Les deux souris ont été disséquées et la gorge (de la base de la mâchoire au sternum), le médiastin, le diaphragme et la cage thoracique ont été prélevés pour analyse histologique. Les tissus ont été fixés en formol à 10%, puis en paraffine et des sections de 5µm ont été effectuées. Nous avons coloré ces sections avec Hematoxyline-Eosine-Saffran (HES) et acide périodique de Schiff (PAS).

3.1.2. Résultats

Des mésocercaires ont été trouvées dans les tissus enchassées dans des inflammations granulomateuses sévères (tissus conjonctifs des glandes salivaires et médiastin). Ces inflammations sont visibles sur la **Figure 22** présentant une mésocercaire (M) encapsulée (C) ayant provoqué une inflammation granulomateuse (I) dans les tissus conjonctifs d'une glande salivaire en coloration HES et la **Figure 23** présentant le restes nécrotiques (N) d'une mésocercaire au sein d'un foyer inflammatoire (I) dans les tissus d'une glande salivaire. en coloration PAS.

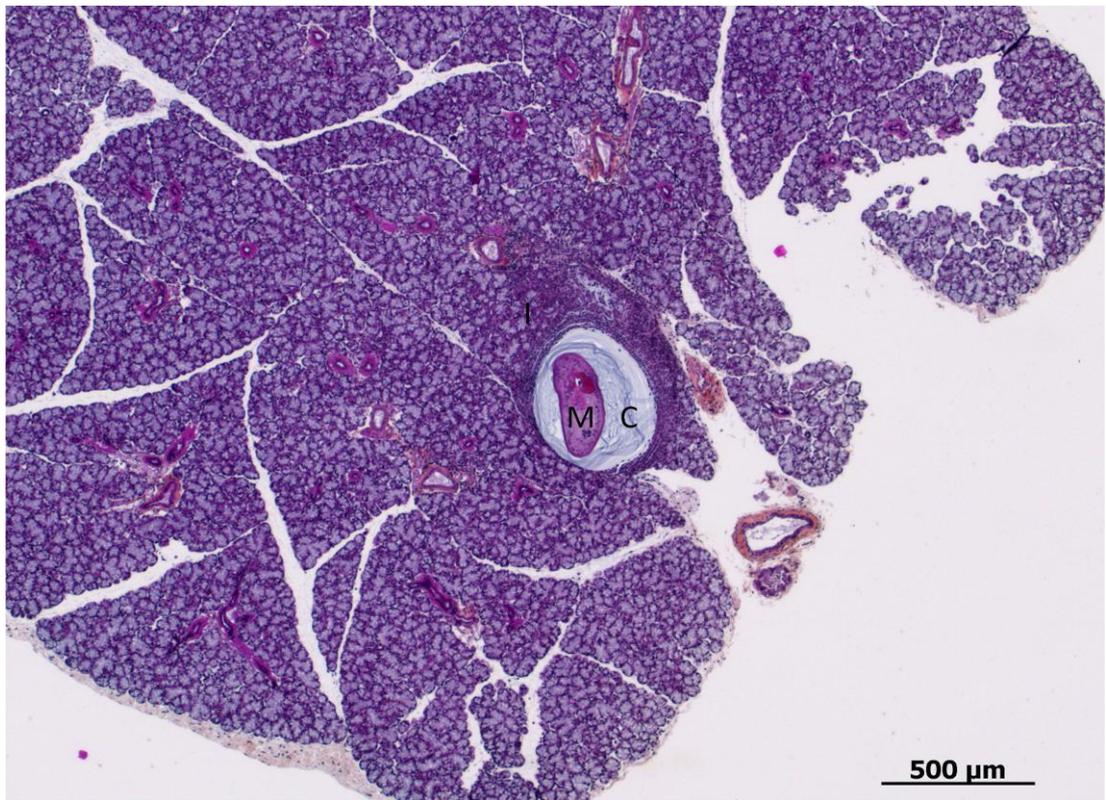


Figure 22: Mésocercaire encapsulée en coloration HES

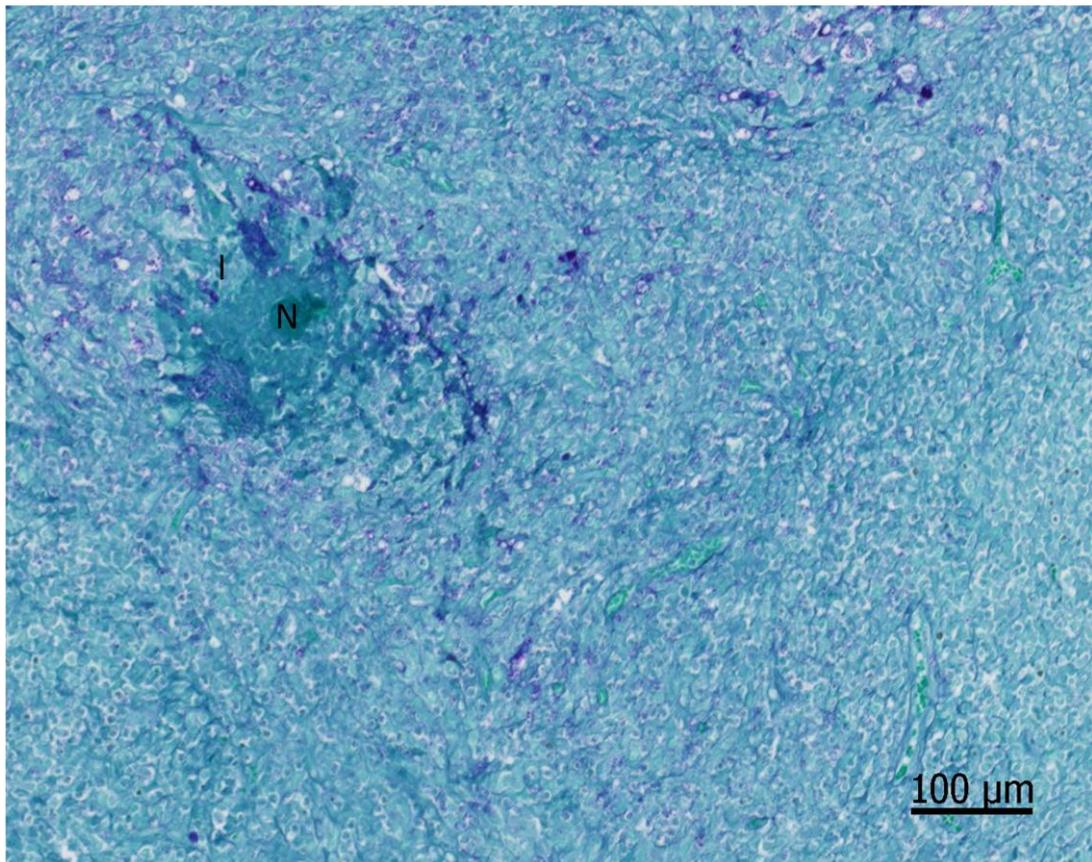


Figure 23: Restes nécrotiques d'une mésocercaire en coloration PAS

Les cellules inflammatoires présentes sont des lymphocytes, des cellules plasmatiques, des granulocytes neutrophiles et éosinophiles et quelques cellules géantes multinucléées. Pour les granulomes les plus importants, aucune mésocercaire n'était observée mais une petite masse nécrotique indiquait la destruction du parasite comme le montre la **Figure 23**. Une capsule était présente autour de certaines mésocercaires. Cette capsule se colore au PAS ce qui indique la présence de mucopolysaccharides ou de glycoprotéines. La structure en cercles concentriques de cette capsule est visible sur la **Figure 24** en coloration HES et sur la **Figure 25** en coloration PAS. Sur plusieurs sections, une mésocercaire est en train de quitter sa capsule (**Figure 25**).



Figure 24: Mésocercaire et structure de la capsule en coloration HES

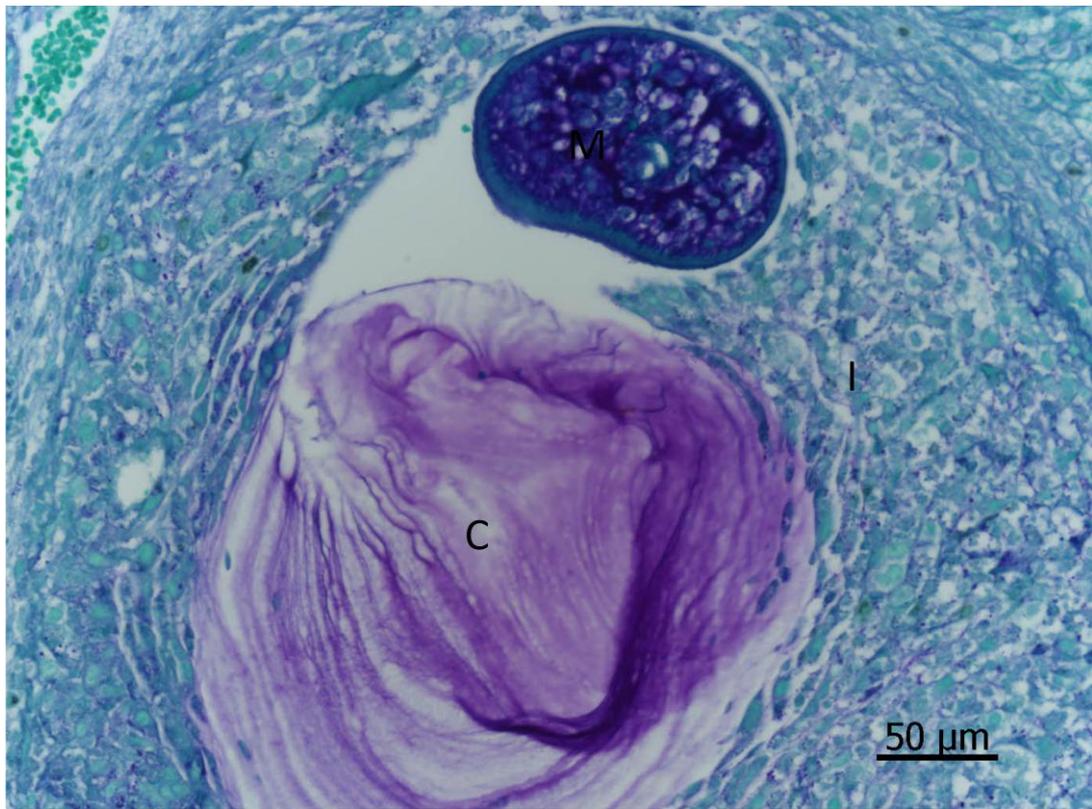


Figure 25: Mésocercaire quittant sa capsule en coloration PAS

Sur plusieurs sections d'une glande salivaire, deux foyers inflammatoires sont visibles à faible distance et l'un des deux foyers est plus important que le second. Le foyer le plus important présente les restes nécrotiques d'une mésocercaire et le foyer le moins important présente les restes de la capsule de cette mésocercaire comme en témoigne la coloration positive PAS (coloration violette au centre du foyer). Ces deux foyers sont visibles en coloration PAS sur la **Figure 26**.

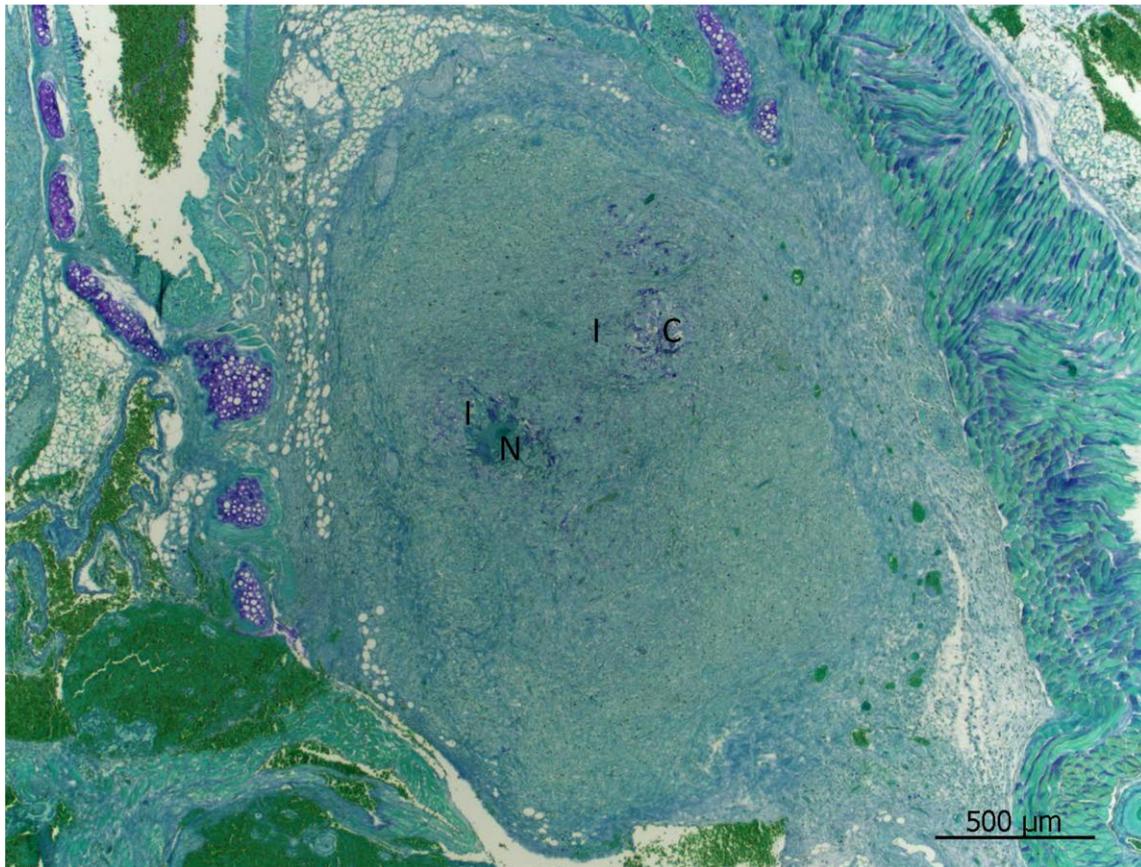


Figure 26: Foyers inflammatoires provoquées par une mésocercaire et sa capsule en coloration PAS.

3.1.3. Discussion

La présence de mésocercaires encapsulées montre que le parasite est capable de s'encapsuler chez la souris. Ce n'est pas la première description de mésocercaires encapsulées. Hofer and Johnson (1970) ont observé des capsules chez des grenouilles (*Rana pipiens*) parasitées par *A. mustelae*, *A. marciana* et *A. arisaemoides* et ont montré que selon l'espèce, les mésocercaires étaient encapsulées en masses ou seules. Très peu de publications rapportent une telle encapsulation chez les hôtes paraténiques d'*A. alata*. Certains auteurs le rapporte chez le sanglier (40). Nous pensons que l'encapsulation est possible chez certains hôtes paraténiques dont le sanglier. Les premières indications que nous avons sur la structure de la capsules montre que son intérêt est probablement de protéger la mésocercaire, peut-être en l'isolant du système immunitaire de l'hôte. La capsule ne semble pas provoquer une réaction importante de l'hôte contrairement à la mésocercaire elle-même et la surface et

l'intérieur de la capsule ne semblent pas présenter de grandes concentrations de protéines. La finesse de la paroi de la capsule permet à la mésocercaire de sortir facilement de cette structure et nous pensons que la mésocercaire sort périodiquement de la capsule pour aller en former une plus loin, peut-être pour échapper à la réaction inflammatoire autour de la capsule. Au vu de l'absence de protéines, il ne semble pas que la mésocercaire puisse se nourrir quand elle est encapsulée.

4. Caractérisation de la survie *in vitro* des mésocercaires d'*A. alata*

La difficulté à obtenir des mésocercaires à partir de viandes de sanglier ou d'autres sources ainsi que leur courte durée de vie hors des tissus nous ont amené à rechercher des milieux de cultures qui permettraient de maintenir des mésocercaires vivantes pendant plusieurs jours ou plusieurs mois. Nous rapportons la démarche suivie et les observations qui en découlent dans ce chapitre.

4.1. Matériel et méthodes

Durant les études sur le comportement des mésocercaires chez le sanglier, nous avons récupéré 200 mésocercaires sur quatre carcasses de sangliers abattus dans le parc de vision de la forêt d'Orient. Nous avons conservé séparé ces mésocercaires dans deux milieux de culture différents : RPMI et RPMI supplémenté en sérum fœtal de veau. Les 200 mésocercaires ont été rincées en solution saline (NaCl 9%) puis placées par 50 en flasks de 25 cm³ contenant 6 ml de milieu. Deux flasks contenaient le milieu RPMI et deux flasks contenaient le RPMI supplémenté. Pour chaque milieu, une flask était conservée en étuve avec CO₂ à 5% et l'autre était conservée en étuve sans CO₂. La température de conservation était de 37°C. Les milieux étaient changés tous les 10 jours pendant deux mois. A la fin de l'étude, une souris femelle OF-1 a été infestée par voie orale avec 30 mésocercaires issues du milieu RPMI supplémenté stocké en étuve à CO₂ 5%. Cette souris a été euthanasiée après deux semaines et disséquée pour recherche de mésocercaires. Les mésocercaires ont été recherchées dans la gorge, la cage thoracique, le médiastin et l'abdomen.

4.2. Résultats

Tous les flacons ont été conservés pendant deux mois. Dans les flacons fermés hermétiquement, la survie des mésocercaires était de 56% dans le RPMI et 78% dans le RPMI supplémenté. Dans les flacons conservés en CO₂ 5%, la survie des mésocercaires était de 72% dans le RPMI et 96% dans le RPMI supplémenté.

Dans le milieu non supplémenté, les mésocercaires étaient très mobiles. 24 à 48 heures avant leur mort, les mésocercaires présentaient des bords irréguliers, des structures internes

moins visibles et un aspect granuleux. Dans le milieu supplémenté, les mésocercaires ont commencé à produire une capsule au bout de 10 jours. Ces capsules formaient un halo autour de la larve. Par la suite, ces capsules sont devenues plus foncées et plus larges. Les mésocercaires étaient visibles et mobiles à l'intérieur de ces capsules. Deux mésocercaires encapsulées ont été récupérées et placées en eau distillée : les deux mésocercaires sont devenues très mobiles et sont sorties rapidement des capsules (moins de 5 minutes). Placées en NaCl à 0.9%, trois mésocercaires ne sont pas sorties de leurs capsules. Lors du dernier changement de milieu, un grand nombre de capsules vides ont été récupérées : 33 capsules étaient vides et toutes les mésocercaires étaient encapsulées. L'arrêt du changement de milieu au bout de deux mois a provoqué la mort de toutes les mésocercaires au bout de deux semaines.

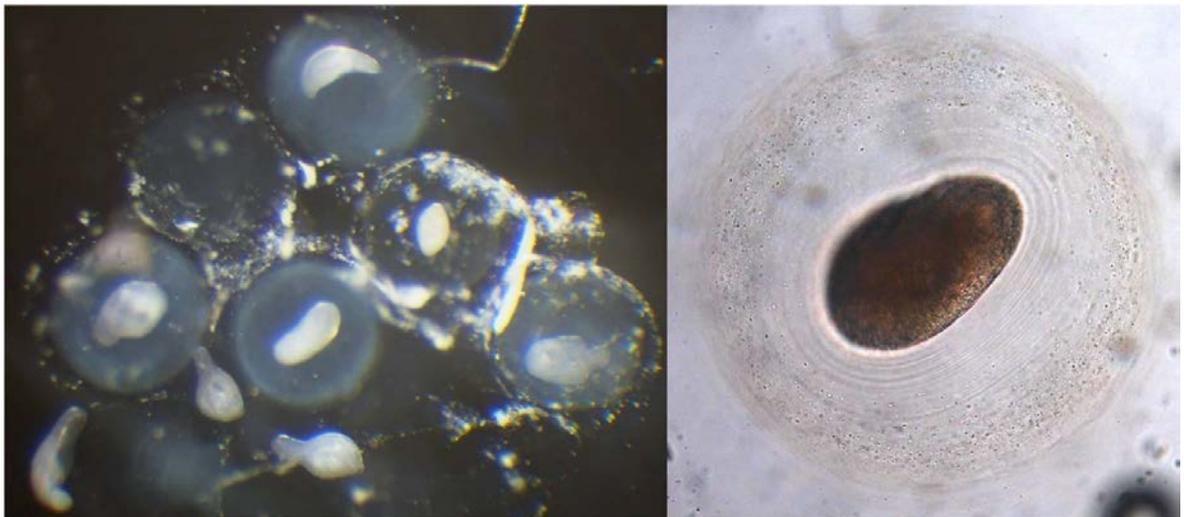


Figure 27: Mésocercaires d'*A. alata* encapsulées in vitro.

La dissection de la souris a permis de mettre en évidence deux mésocercaires dans la gorge.

4.3. Discussion

Les taux de survie observés après deux mois ont montré qu'il est possible de maintenir des mésocercaires vivantes et infestantes pour au moins deux mois et probablement plus. La possibilité de maintenir des mésocercaires sur une telle période de temps doit permettre de

s'affranchir des saisons de prélèvement et d'accumuler les mésocercaires en grand nombre lorsque cela est nécessaire. De grandes densités de matériel sont nécessaires pour certains types d'études telles que l'étude des profils antigéniques. La capacité des mésocercaires d'*A. alata* à produire des capsules *in vitro* prouve que l'encapsulation *in vivo* des mésocercaires n'est pas due à une réaction de l'hôte mais est due au parasite. Ceci va à l'encontre de ce qui avait été proposé par Hofer and Johnson (1970) qui avaient analysé l'encapsulation des mésocercaires d'*Alaria* américaines chez les grenouilles. Ces auteurs avaient supposé que l'encapsulation était une réaction de l'hôte car le parasite ne disposait pas de l'équipement nécessaire à une telle production. La description des capsules chez les grenouilles correspond à celles des capsules observées ici : les capsules présentent une paroi mince et sont remplies d'un gel amorphe et les mésocercaires s'en évadent facilement. Nous avons observé les mêmes capsules *in vivo* chez des souris infestées expérimentalement. La présence de capsules vides dans le milieu prouve que *in vitro* les mésocercaires sortent régulièrement de leur capsule pour en reformer de nouvelles. Nous suggérons que le même procédé existe *in vivo*. Que ce soit pour échapper à une réaction inflammatoire ou pour sortir se nourrir, chez l'hôte paraténique et chez les amphibiens, les mésocercaires sortent régulièrement de leur capsule et en reforment ailleurs.

Conclusion

L'émergence de ce parasite est due principalement à la systématisation des contrôles trichine systématiques sur les carcasses de sangliers chassés et destinés à être commercialisés mais aussi à la sensibilisation des laboratoires à son existence. Dans le département du bas-Rhin, la hausse observée des déclarations n'est pas due uniquement aux raisons évoquées précédemment. Nous pensons qu'elle est peut-être une conséquence des densités très élevées de sangliers dans ce département (144-146) qui s'accompagnent d'une baisse de la disponibilité alimentaire et d'une limitation des domaines vitaux (147, 148). Ces deux changements ont pu avoir pour conséquence une orientation du régime alimentaire de certaines populations vers des ressources moins habituelles telles que les amphibiens dans les zones humides.

L'identification spécifique des furcocercaires sur des caractères morphologiques à partir d'émissions de mollusques récoltés en milieu naturel est plus que délicate. Il en est de même pour les premiers hôtes intermédiaires, c'est-à-dire les mollusques et à un degré moindre pour les amphibiens. Ceci souligne l'intérêt de disposer d'outils moléculaires en appui à l'identification morphologique lorsque celle-ci devient difficile.

L'hôte limitant la répartition du parasite est le premier hôte intermédiaire : le mollusque. Seuls deux planorbidés ont été identifiés *in natura* comme hôtes intermédiaires : *P. planorbis* et *A. vortex*. D'autres planorbidés pourraient agir comme hôtes intermédiaires mais leurs contributions au cycle seraient plus limitées : les autres planorbidés sont beaucoup plus rares et colonisent les mêmes types de milieux (8, 137). Les biotopes typiquement adaptés à la présence des mollusques hôtes semblent être des zones humides permanentes ou temporaires du type marais ou étangs peu profonds. La limitation de la circulation des mésocercaires chez les sangliers observées au-delà de 200m dans l'étude épidémiologique est probablement une conséquence de l'absence ou la rareté de biotopes adaptés à la présence des mollusques hôtes. Cette limitation a également été constatée au cours d'une étude menée sur *A. alata* chez le Renard roux en Irlande (131).

L'émission des furcocercaires par *A. vortex* et *P. planorbis* est conditionnée par la saison et nous pensons qu'il existe certains facteurs déclencheurs intrinsèques ou extrinsèques au couple mollusque/parasite qui permettraient la synchronisation des émissions sur les mois

du printemps (avril, mai et juin). Nous ne connaissons pas ces facteurs mais nous évoquons la possibilité d'une influence du statut hormonal du mollusque (le frai est au printemps pour les deux mollusques hôtes). Cette saisonnalité a un impact significatif sur la circulation du parasite puisque la prévalence d'*A. alata* chez le sanglier évolue au cours de l'année avec une circulation plus importante au printemps et en été. Les périodes d'émissions correspondent aux périodes de hautes densités d'amphibiens et surtout de têtards. Chez ces derniers nous avons observé une très forte réceptivité avec 100% de têtards positifs sur certaines mares. Nous n'avons pas pu prouver que les amphibiens adultes ne sont pas réceptifs mais nous avons mis en évidence une circulation moins importante chez les adultes par rapport aux têtards. Il semble que les grenouilles rouses *sensu lato* soient plus réceptives même si ce n'est pas établi avec certitude. Les pics d'émissions de furcocercaires observés en avril et mai semblent plus propices à l'infestation de têtards de Grenouille rousse qui sont présents plus tôt dans la saison que les têtards de Grenouille verte. Les densités de mésocercaires observées chez les amphibiens peuvent être très élevée mais nous n'avons pas constaté d'effet clinique ni de lésions lors des dissections. Cependant la présence souvent en grand nombre de parasites dans les espaces péri-orbitaux nous font penser qu'il pourrait y avoir une atteinte de la vision et que la survie des amphibiens fortement infestés notamment à la prédation serait limitée par une telle atteinte.

Les travaux menés sur un modèle d'hôte paraténique naturellement infesté (sanglier) et un modèle infesté en laboratoire (souris) ont confirmé la grande capacité du stade mésocercaire à franchir les barrières d'espèces et à se maintenir chez l'hôte paraténique. Chez des sangliers naturellement infestés nous avons trouvé des densités supérieures à 1000 mésocercaires/100g et nous avons observé des taux de réussite élevés (jusqu'à 90%) lors des infestations expérimentales de souris. La présence de hautes densités de parasites chez des sangliers adultes âgés de plus de deux ans nous indique que ces hôtes ne sont pas capables d'éradiquer le parasite et que manifestement nous assistons à un phénomène de pluri-infestations. Toutes ces observations nous mènent à la conclusion que la paraténicité joue un rôle important pour le maintien d'*A. alata*. Il faut probablement qu'il y ait une quantité suffisante d'hôtes paraténiques potentiels (mammifères, reptiles, oiseaux) sur un site donné pour qu'*A. alata* puisse s'y maintenir. Nous avons toujours identifié le parasite dans des sites présentant une grande diversité et une grande quantité d'espèces pouvant agir comme hôtes paraténiques. Le Renard roux, qui est l'hôte définitif principal en France, ne consomme quasiment pas d'amphibiens. En effet, les amphibiens apparaissent rarement dans les études

des régimes alimentaires des renards et représentent moins de 1% du bol alimentaire lorsqu'ils sont mentionnés. Les micromammifères, mustélidés et carcasses d'ongulés occupent eux une part beaucoup plus importante (plus de 25% à certaines périodes pour les carcasses d'ongulés) (140). Il y a une forte circulation des mésocercaires d'*A. alata* chez les sangliers évoluant dans des zones où le parasite est endémique avec des prévalences qui pourraient dépasser 30%. Le sanglier semble être une bonne sentinelle de la présence du parasite.

Les tests de résistance à la congélation menés dans cette thèse montrent que les mésocercaires sont peu résistantes à ce traitement. En effet, une semaine de congélation à -16°C à cœur semble suffisante pour éradiquer des densités élevées des mésocercaires dans les viandes de sanglier. Ce traitement peut être mis en place pour l'assainissement de carcasses porteuses de mésocercaires en gardant à l'esprit que le temps indiqué concerne une congélation à cœur et que la température doit être contrôlée précisément. Les temps de congélations devront être définis pour des morceaux de taille plus importante. Nous n'avons pas testé la résistance à la cuisson mais l'absence de capsules épaisses nous amène à penser que les mésocercaires ne seront pas résistantes à ce traitement. Une cuisson à cœur à 74°C pendant 5 mn nous paraît amplement suffisante et c'est cette méthode qui est actuellement préconisée.

Au cours de nos travaux nous avons utilisé exclusivement la technique de migration pour la recherche de mésocercaires dans les viandes de sangliers. Nous avons également utilisé cette technique pour rechercher les mésocercaires chez les souris et les amphibiens. Au cours de ces utilisations, nous avons pu constater la simplicité d'utilisation et nous avons apprécié l'absence de produits dangereux dans l'utilisation de cette méthode mise au point par Riehn, Hamedy (124). De surcroix, plusieurs expérimentations menées en Allemagne ont prouvé la supériorité en termes de sensibilité de cette méthode par rapport à méthode de digestion, seule alternative actuelle (124, 126). Enfin, l'identification des mésocercaires en laboratoire, basée principalement sur leur mobilité, est beaucoup plus aisée avec cette méthode qui n'est pas agressive sur les mésocercaires. Il est possible grâce aux indicateurs donnés dans ce travail mais également au suivi des déclarations d'identifier des zones où *A. alata* circule chez les sangliers. Les exigences du cycle d'*A. alata* rendent peu probable l'expansion de zones prédéfinies ou l'apparition de nouvelles zones de circulation. Si nous pouvons identifier ces zones, nous pourrions mettre en place des protocoles de contrôle réservés à ces zones, notamment en instaurant l'analyse par méthode de migration obligatoire

pour tous les sangliers chassés dans cette zone. L'étude des sites de prédilections des mésocercaires chez les sangliers a montré que les tissus prélevés pour la recherche de trichines qui sont la langue et le diaphragme peuvent être utilisés également pour la recherche de mésocercaires ce qui implique qu'aucun nouveau prélèvement ne serait à effectuer sur les carcasses de sangliers.

Au cours des mêmes travaux nous n'avons pas analysé les viscères. La rareté des mésocercaires dans les viscères de souris ainsi que chez le singe Rhésus infesté par *Odening* nous ont mené à penser que les densités de mésocercaires dans les viscères de sangliers sont faibles. De ce fait, le devenir des viscères lors de l'abattage d'un sanglier ne nous semble pas présenter un risque pour le maintien du cycle d'*A. alata*.

Toutes les publications d'intérêt sur *A. alata* présentent le sanglier comme source la plus risquée pour l'Homme. Nous pensons que les amphibiens peuvent représenter un risque également du fait des hautes densités que nous avons parfois pu constater même si la pêche des grenouilles est limitée en France.

Bibliographie

1. Duncker HCJ. Die Muskeldistomeen. Berliner Thierärztliche Wochenschrift. 1896;24:279-82.
2. Duncker HCJ. Distomeen in Schweinefleisch. Zschr mikr Fleischschau. 1881;2(3):23-4.
3. Duncker HCJ. Muskel-Distomeen. Zschr mikr Fleischschau. 1881;2(4):141.
4. Duncker HCJ. Distomeen in Schweinefleisch. Zschr mikr Fleischschau. 1884;3:39-42.
5. Duncker HCJ. Die muskel-Distomeen. Zschr Fleisch-Milchhyg. 1897;7:197-8.
6. Leuckart R. Die Parasiten des Menschen und die von Ihnen harrührenden Krankheiten : ein Hand- und Lehrbuch. Leipzig: Winter'sche verlagshandlung; 1879. 1046 p.
7. Ruzskowski J. Die postembryonale Entwicklung von *Hemistomum alatum* Dies. auf Grund experimenteller Untersuchung. Bull Intern Acad Polon Sci Classe Math Nat Série B. 1921:236-50.
8. Glöer P. Die Süßwassergastropoden Nord- und Mitteleuropas: Bestimmungsschlüssel, Lebensweise, Verbreitung: ConchBooks; 2002. 327 p.
9. Bosma NJ. *Alaria Mustelae* Sp. Nov., a Trematode Requiring Four Hosts. Science. 1931;74(1925):521-2. Epub 1931/11/20.
10. Bugge G. Das sogenannte Muskeldistomum, *Agamodistomum suis*, ein bewohner des Bauchhöhle des Scwheines. Thirärztl Rdsch. 1942;48:146-51.
11. Bugge G. Der Muskelegel Dunckers beim Frosch. Zschr Fleisch-Milchhyg. 1942;54(73-76).
12. Petrov AM, Dubnickij AA. Die Metazerkarien-Alariose des Zobel (russ.). Trudy vsesojuznogo instituta Gel-mintologii im Akad K I Skrjabina. 1950;4:20-2.
13. Petrov AM, Dubnickij AA. Sables-metacercarial alariosis (russ.). Karakulevodstvo I Zverovodstvo. 1950;3:70-1.
14. Potekhina LF. The life cycle of *Alaria alata* and alariosis in foxes and dogs. Doklady Akad Nauk SSSR. 1951;76:325-7.
15. Savinov VA. Die besonderheiten des Entwicklung von *Alaria alata* (Goeze, 1782) im Körper des End- und des Reservewirtes (russ.). Raboty po Gel'mintii k 75-letiju Akad K I Skrjabona. 1953:611-6.
16. Savinov VA. Die Entwicklung von *Alaria alata* (Goeze, 1782) im Körper der Hunde (russ.) Trudy vsesojuznogo instituta Gel-mintologii im Akad K I Skrjabina. 1953;5:63-4.
17. Savinov VA. Zu Frage einiger Besonderheiten des Stadienenwicklung des *Strigeata* und der Rolle der verschiedenen Wirte in dieser Entwicklung (russ.). Ucen Zap vologodsk ped Inst. 1954;15:245-306.
18. Möhl K, Grosse K, Hamedy A, Wuste T, Kabelitz P, Lucker E. Biology of *Alaria* spp. and human exposition risk to *Alaria mesocercariae*-a review. Parasitol Res. 2009;105(1):1-15. Epub 2009/05/12.
19. Skrjabin KI. Trematodes of animals and man. Jerusalem Ketter Press 1965.
20. Yamaguti S. Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates Vol.1. Tokyo, ed by Yamaguti, 1971. 1074 p.
21. Dubois G. Monographie des Strigeida (Trematoda). Mém Soc Neuch Sci Nat. 1938;6:1-535.
22. Johnson AD. Life history of *Alaria marciana* (La Rue, 1917) Walton, 1949 (Trematoda: Diplostomatidae). J Parasitol. 1968;54(2):324-32. Epub 1968/04/01.
23. Allen JR, Mills JH. *Alaria arisaemoides* in Saskatchewan dogs. Can Vet J. 1971;12(1):24-8. Epub 1971/01/01.

24. Shoop WL, Font WF, Malatesta PF. Transmammary transmission of mesocercariae of *Alaria marciana* (Trematoda) in experimentally infected primates. J Parasitol. 1990;76(6):869-73. Epub 1990/12/01.
25. Shoop WL, Corkum KC. Maternal transmission by *Alaria marciana* (Trematoda) and the concept of amphiparatenesis. J Parasitol. 1987;73(1):110-5. Epub 1987/02/01.
26. Shoop WL, Corkum KC. Pathway of mesocercariae of *Alaria marciana* (Trematoda) through the mammary glands of lactating mice. J Parasitol. 1984;70(3):333-6. Epub 1984/06/01.
27. Shoop WL, Corkum KC. Epidemiology of *Alaria marciana* mesocercariae in Louisiana. J Parasitol. 1981;67(6):928-31. Epub 1981/12/01.
28. Schnieder T. Veterinärmedizinische Parasitologie. Supperer JBR, editor: Parey; 2006. 793p p.
29. Hiepe TH. Lehrbuch der Parasitologie Bd 3 : Veterinärmedizinische Helminthologie. Fischer, editor. Stuttgart, Jena1985.
30. Lucius R, Böckeler W, Pfeiffer AS. Parasiten des Haus-, Nutz-und Wildtiere Schlewzig-Holsteins: Parasiten der inneren Organe des Rotfuchses (*Vulpes vulpes*). Z Jagdwiss. 1988;34:242-55.
31. Euzéby J. Maladies dues aux plathelminthes. frères V, editor. Paris1975. 855 p.
32. Beugnet F, Polack B, Dang H. Atlas de coproscopie. Kalianxis, editor. Auxon, France2004. 277 p.
33. Beugnet F, Bourdoiseau G, Dang H. Abrégé de parasitologie clinique des carnivores, Volume 1 Parasitoses digestives. Kalianxis, editor. Auxon, France2004. 266 p.
34. Dönges J. Das miracidium von *Isthmiophora melis* (Schrank, 1788) (Echinostomatidae). Zeitschrift für Parasitenkunde. 1973;41:215-30.
35. Bowman D, Carl Lynn R, Eberhard ML. Georgi's parasitology for veterinarians, Eighth edition. Science E, editor. USA2003. 422 p.
36. Faltynkova A, Nasincova V, Kablaskova L. Larval trematodes (Digenea) of planorbid Snails (Gatropoda: Pulmonata) in Central Europe: a survey of species and key to their identification. Syst Parasitol. 2008;69:155-78.
37. Combes C. Atlas mondial des cercaires. Muséum Ed, editor. Paris1980.
38. Gastaldi B. Cenni sopra alcuni nuovi Elminti della *Rana esculenta* con nuove osservatione sul *Codonocephalus mutabilis* (Diesing). 1854.
39. Iastre VB, Gorokhov VV, Shestakov AM. [To the detection of the trematode mesocercariae *Alaria alata* in the blood of domestic dogs and cats]. Med Parazitol (Mosk). 2005(4):48-51. Epub 2006/02/01.
40. Stefanski W, Tarczynski S. Sur le développement de l'*Agamodistomum suis* Duncker, 1881. Acta parasitologica Polonica. 1953;1(7):149-54.
41. Gibson DI, Jones A, Bray RA. Keys to the trematoda, Volume 1. publishing C, editor. UK2002. 521 p.
42. Ljubaschenko C. J., Petrov AM. Krankheiten des Pelztiere. Moskow1962.
43. Loos-Frank B, Zeyhle E. The intestinal helminths of the red fox and some other carnivores in southwest Germany. Z Parasitenkd. 1982;67(1):99-113. Epub 1982/01/01.
44. Saar C. Parasitologische Untersuchung beim Rotfuchses (*Vulpes vulpes*) im Raum von West-Berlin. Vet Diss FU Berlin. 1957.
45. Hinaidy HK. [A further contribution to the parasite fauna of the red fox, *Vulpes vulpes* (L.), in Austria]. Zentralbl Veterinarmed B. 1976;23(1):66-73. Epub 1976/02/01. Ein weiterer Beitrag zur Parasitenfauna des Rotfuchses, *Vulpes vulpes* (L.), in Osterreich.
46. Shimalov VV, Shimalov VT. Helminth fauna of the red Fox (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) in southern Belarus. Parasitol Res. 2002;89(1):77-8.

47. Jancev J, Ridjakov N. Helminth fauna of the fox (*Vulpes vulpes crucigera*, Bechstein) in north western Bulgaria. Chelminthologija, Sofia. 1978;4:73-96.
48. Saeed I, Maddox-Hyttel C, Monrad J, Kapel CM. Helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Denmark. Vet Parasitol. 2006;139(1-3):168-79. Epub 2006/04/04.
49. Guildal JA, Clausen B. Endoparasites from one hundred Danish red foxes (*Vulpes vulpes*). Norwegian J Zool. 1971;21:329-30.
50. Criado-Fornelio A, Gutierrez-Garcia L, Rodriguez-Caabeiro F, Reus-Garcia E, Roldan-Soriano MA, Diaz-Sanchez MA. A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. Vet Parasitol. 2000;92(4):245-51. Epub 2000/09/21.
51. Freeman RS. Helminth parasites of the red fox in Finland. Proc Int Congr Parasitol; Rome (1964)1966. p. 482.
52. Borgsteede FH. Helminth parasites of wild foxes (*Vulpes vulpes* L.) in The Netherlands. Z Parasitenkd. 1984;70(3):281-5. Epub 1984/01/01.
53. Wolfe A, Hogan S, Maguire D, Fitzpatrick C, Vaughan L, Wall D, et al. Red foxes (*Vulpes vulpes*) in Ireland as hosts for parasites of potential zoonotic and veterinary significance. Vet Rec. 2001;149(25):759-63. Epub 2002/01/26.
54. Williams BM. The intestinal parasites of the red fox in south west Wales. Br Vet J. 1976;132(3):309-12. Epub 1976/05/01.
55. Kozłowska J. On the knowledge of the helminth fauna of wild and bred foxes. Acta parasitologica Polonica. 1957;5:181-92.
56. Furmaga S, Wysocki E. Of the helminthofauna of foxes in the Lublin voivodships territory. ann Univ Mariae Curie Sklodowska Sectio DD. 1951;6:97-123.
57. Balicka-Ramisz A, Ramisz A, Pilarczyk B, Bienko R. Fauna of gastro-intestinal parasites in red foxes in Western Poland. Medycyna weterynaryjna. 2003;59(10):922-5.
58. Eira C, Vingada J, Torres J, Miquel J. The helminth community of the red fox, *Vulpes vulpes*, in Dunas de Mira (Portugal) and its effects on host condition. Wildl Biol Pract. 2006;2(1):26-36.
59. Persson L, Christensson D. Endoparasites of foxes in Sweden. Zool Revy. 1971;33:17-28.
60. Lozanic BM. Contribution à la connaissance de la faune des helminthes chez le renard de nos régions (*Vulpes vulpes*). Acta Vet Beogr. 1966;16:301-4.
61. Shimalov VV, Shimalov VT. Helminth fauna of the wolf (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) in Belorussian Polesie. Parasitol Res. 2000;86(2):163-4. Epub 2000/02/24.
62. Moks E, Jogisalu I, Saarma U, Talvik H, Jarvis T, Valdmann H. Helminthologic survey of the wolf (*Canis lupus*) in Estonia, with an emphasis on *Echinococcus granulosus*. J Wildl Dis. 2006;42(2):359-65. Epub 2006/07/28.
63. Bagrađe G, Kirjusina M, Vismanis K, Ozolins J. Helminth parasites of the wolf *Canis lupus* from Latvia. J Helminthol. 2009;83(1):63-8. Epub 2009/01/14.
64. Duchene MJ, Artois M. Les carnivores introduits : Chien viverrin (*Nyctereutes procyonides* Gray, 1834) et Raton laveur (*Procyon lotor* L., 1758): SFEPM -Encyclopédie des carnivores de France; 1988. 47 p.
65. Thiess A, Schuster R, Nockler K, Mix H. [Helminth findings in indigenous raccoon dogs *Nyctereutes procyonoides* (Gray, 1843)]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2001;114(7-8):273-6. Epub 2001/08/17. Helminthenfunde beim einheimischen Marderhund *Nyctereutes procyonoides* (Gray, 1834).
66. Schuster R, Schierhorn K, Heidecke D, Ansorge H. Untersuchung zur Endoparasitenfauna des Marderhundes *Nyctereutes procyonoides* (Gray, 1834) in Ostdeutschland. Beitr Jagd Wildforschung. 1993;18:83-7.

67. Barbu P. Beiträge zum Studium des Marderhundes, *Nyctereutes procyonides ussuriensis* (Matschie, 1907), aus des Donaudelta. Säuger Mitt. 1972;20:375-405.
68. Ivanov VM, Semenova NN. Parasitological consequences of animal introduction. Russ J Ecol. 2000;31(4):281-3.
69. Papazahariadou M, Founta A, Papadopoulos E, Chliounakis S, Antoniadou-Sotiriadou K, Theodorides Y. Gastrointestinal parasites of shepherd and hunting dogs in the Serres Prefecture, Northern Greece. Vet Parasitol. 2007;148(2):170-3. Epub 2007/06/19.
70. Umur S. A case of *Alaria alata* in a dog. Tr J of veterinary and animal sciences. 1998;22:89-92.
71. Jogeland M, Raue H, Petersson U. Inventering av inverteparasiter hos hundar i Skane 1999-2000 [Inventory of internal parasites in Dogs in Skane]. Svensk Veterinartidning. 2002;54(13):635-7.
72. Szczesna J, Popiolek M, Schmidt K, Kowalczyk R. Coprological study on helminth fauna in Eurasian lynx (*Lynx lynx*) from the Bialowieza Primeval Forest in eastern Poland. J Parasitol. 2008;94(4):981-4. Epub 2008/06/26.
73. Dai RS, Li ZY, Li F, Liu DX, Liu W, Liu GH, et al. Severe infection of adult dogs with helminths in Hunan Province, China poses significant public health concerns. Vet Parasitol. 2009;160(3-4):348-50. Epub 2008/12/19.
74. Castro O, Venzal JM, Felix ML. Two new records of helminth parasites of domestic cat from Uruguay: *Alaria alata* (Goeze, 1782) (Digenea, Diplostomidae) and *Lagochilascaris major* Leiper, 1910 (Nematoda, Ascarididae). Vet Parasitol. 2009;160(3-4):344-7. Epub 2009/01/02.
75. Ruas JL, Muller G, Farias NA, Gallina T, Lucas AS, Pappen FG, et al. [Helminths of Pampas fox, *Pseudalopex gymnocercus* (Fischer, 1814) and of Crab-eating fox, *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) in the South of the State of Rio Grande do Sul, Brazil]. Rev Bras Parasitol Vet. 2008;17(2):87-92. Epub 2008/10/01. Helminths do cachorro do campo, *Pseudalopex gymnocercus* (Fischer, 1814) e do cachorro do mato, *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) no sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.
76. Kamiya H, Ohbayashi M. Some helminths of the Red Fox, *Vulpes vulpes* Schlenkeri Kishida, in Hokkaido, Japan, with a description of a new trematode, *Massaliatrema Yamashitai* N. sp. Japanese Journal of Veterinary Research. 1975;23(2):60-8.
77. Zbikowska E, Nowak A. One hundred years of research on the natural infection of freshwater snails by trematode larvae in Europe. Parasitol Res. 2009;105(2):301-11. Epub 2009/05/14.
78. Litvinov VF, Lipnitskiji SS, editors. Molluscs of Byelorussian Polesje as intermediate hosts of Helminthes of Game Animals. IV congress of Russian parasitologists; 2008; Zoological institute RAS, St Petersburg: Russian academy of sciences.
79. Gargominy O, Prie V, Bichain JM, Cucherat X, Fontaine B. Liste de référence annotée des mollusques continentaux de France. MalaCo. 2011;7:307-82.
80. Wojcik AR, Franckiewicz-Grygon B, Zbikowska E. [The studies of the invasion of *Alaria alata* (Goeze, 1782) in the Province of Kuyavia and Pomerania]. Wiad Parazytol. 2001;47(3):423-6. Epub 2006/08/10. Badania nad inwazją *Alaria alata* (Goeze, 1782) w wojewodztwie kujawsko-pomorskim.
81. Odening K. Die Lebenszyklen von *Strigea falconispalumbi* (Viborg), *S. strigis* (Schank) und *S. sphaerula* (Rudolphi) (Trematoda, Strigeida) im Raum Berlin. Zoologische Jahrbücher Abteilung für Systematik. 1967;94:1-67.
82. Odening K. Drei neue Furcocercarien aus dem Raum Berlin. Monatsberichte des Deutschen Akademie des Wissenschaft. 1964;6:739-43.

83. Nasincova V. Trematode developmental stages in Czech aquatic snails and life-cycles of selected species of the family Omphalometridae and Echinostomatidae. Ceske Budejovic: Czekoslovak Academy of Sciences; 1992.
84. Odening K. Die Altrices-Wirte einiger einheimischer Haus- und Nutztier-trematoden. Bemerkungen zum tatsächlichen gegenwärtigen Stand der Kenntnisse. Angewandte Parasitologie. 1965;6:84-94.
85. Niewiadomska K. The life cycle of *Codonocephalus urnigerus* (Rudolphi, 1819) - Strigeidae. Acta parasitologica Polonica. 1964;12:283-96.
86. Odening K. Die Lebenszyklen der Ententrematoden *Parastrigea robusta* und *Catatropis verrucosa* im Raum Berlin. Monatshefte für Veterinärmedizin. 1966;17:663-7.
87. Timofeev NE. Les trématodes des amphibiens et reptiles des environs de Kharkov. Trav soc naturalistes Univ imp Kharkov. 1900;24:137-66.
88. Shimalov VV, Shimalov VT. Helminth fauna of toads in Belorussian Polesie. Parasitol Res. 2001;87(1):84. Epub 2001/02/24.
89. Shimalov VV, Shimalov VT, Shimalov AV. Helminth fauna of newts in Belorussian Polesie. Parasitol Res. 2001;87(4):356. Epub 2001/05/18.
90. Shimalov VV. [The helminth fauna of amphibians of open canals in meliorated regions of the Belorussian Poles'e]. Parazitologija. 2002;36(4):304-9. Epub 2002/09/28. Gel'mintofauna zemnovodnykh otkrytykh kanalov v meliorirovannykh raionakh Belorusskogo Poles'ia.
91. Johnson P, Lunde KB, Ritchie EG, Launer AE. the effect of trematode infection on amphibian limb development and survivorship. Science. 1999;284:802-4.
92. Brumpt E. Présence en Corse d'*Alaria tetracystis* chez la Couleuvre à collier (*Tropidonotus natrix*) et cycle évolutif probable de ce parasite. Ann Parasitol Hum Comp. 1945;20(34):118-24.
93. Shimalov VV, Shimalov VT. Helminth fauna of snakes (Reptilia, Serpentes) in Belorussian Polesye. Parasitol Res. 2000;86(4):340-1. Epub 2000/04/26.
94. Baars G. Distomeen (*Agamodistomum suis*) in der Muskulatur des Schweines. Thirärztl Rdsch. 1942;48:255-7.
95. Shimalov VV, Shimalov VT. Helminth fauna of the European polecat (*Mustela putorius* Linnaeus, 1758) in Belorussian polesie. Parasitol Res. 2002;88(3):259-60. Epub 2002/04/17.
96. Shimalov VV, Shimalov VT. Helminth fauna of the stoat (*Mustela erminea* Linnaeus, 1758) and the weasel (*M. nivalis* Linnaeus, 1758) in Belorussian Polesie. Parasitol Res. 2001;87(8):680-1. Epub 2001/08/21.
97. Shimalov VV, Shimalov VT, Shimalov AV. Helminth fauna of otter (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758) in Belorussian Polesie. Parasitol Res. 2000;86(6):528. Epub 2000/07/14.
98. Shimalov VV, Shimalov VT. Helminth fauna of the American mink (*Mustela vison* Schreber, 1777) in Belorussian Polesie. Parasitol Res. 2001;87(10):886-7. Epub 2001/11/02.
99. Sudarikov WE. Skrjabin KI Trematodes of animals and man, essentials in trematodology. Moskow: Ac Sci USSR Helm Lab (1960), Israel program f. sci. transl. (1965); 1960.
100. Shimalov VV, Shimalov VT. Helminth fauna of the European mole (*Talpa europaea* Linnaeus, 1758) in Belorussian Polesie. Parasitol Res. 2001;87(9):790-1. Epub 2001/09/26.
101. Shimalov VV. Helminth fauna of the striped field mouse (*Apodemus agrarius* Pallas, 1778) in ecosystems of Belorussian Polesie transformed as a result of reclamation. Parasitol Res. 2002;88(11):1009-10. Epub 2002/10/11.
102. Dollfus RP, Chabaud AG. *Distomum musculorum suis*, mesocercaria of *Alaria alata* in the wild boar *Sus scrofa* L. Ann Parasitol Hum Comp. 1953;28(5-6):354-64. Epub

- 1953/01/01. *Distomum musculorum* suis H.C.J. Duncker 1896, mesocercaire d'*Alaria alata* (J.A.E. Goeze 1782), (Trematoda, Strigeata) chez un sanglier (*Sus scrofa* L. 1758, Fera).
103. Prokopowicz D, Wasiluk A, Rogalska M. Oportunistyczne inwazje pasozytnicze zagrazajace czlowiekowi. *Kosmos, Problemy nauk biologiznych*. 2005;54(1 (266)):109-13.
104. McDonald HR, Kazacos KR, Schatz H, Johnson RN. Two cases of intraocular infection with *Alaria mesocercaria* (Trematoda). *Am J Ophthalmol*. 1994;117(4):447-55. Epub 1994/04/15.
105. Walters JC, Freeman RS, Shea M, Fallis AM. Penetration and survival of mesocercariae (*Alaria* spp.) in the mammalian eye. *Can J Ophthalmol*. 1975;10(1):101-6. Epub 1975/01/01.
106. DGAL. Note de service DGAL/SDSSA/N2008_8037: Gestion des suspicions et des cas d'infestations de sangliers sauvages par le parasite *Alaria alata*. Optimisation des prélèvements et de l'analyse de recherche dans les départements concernés. In: DGAL, editor. 2008.
107. EU-Commisson. Commission Regulation (EC) No.2075/2005 of 5th December 2005 laying down specific rules on official controls for *Trichinella* in meat. Commission E, editor: Official Journal of the European union L 338/60; 2005.
108. BfR. Bundesinstitut für risikobewertung Wildschweinfleisch kann des gefährlichen Duncker'schen Muskelegel enthalten. Stellungnahme Nr. 027/2007 des Bfr vom 1. Juli 2007. 2007.
109. Anonymous. Einstufung von Organismen, Parasiten. Heraus-gegeben vom Bundesamt für Umwelt, Wald un Landschaft (BUWAL), Bern, Federal office of the environment. 2003.
110. Pesson B, Kristensen A. Un réservoir sauvage: le Renard roux en Alsace. *L'Eurobiologiste*. 1989;XXIII(184):365-73.
111. Froment G. Etude du portage des *Taenidae* (Cestoda) chez le Renard roux (*Vulpes vulpes*) dans deux populations à habitats contrastés: Thèse d'exercice Pharmacie: Reims 2005.
112. Burlot Y. Le sanglier (*Sus scrofa* L.) hôte de trématodes. A propos d'une observation en Champagne Ardenne. Reims: Thèse d'exercice pharmacie: Reims 2005.
113. Portier J, Jouet D, Ferté H, Gibout O, Heckmann A, Boireau P, et al. New data in France on the trematode *Alaria alata* (Göeze, 1792) obtained during *Trichinella* inspections. *Parasite*. 2011;18(3):271-5. Epub 2011/09/07.
114. Vallee I, Mace P, Forbes L, Scandrett B, Durand B, Gajadhar A, et al. Use of proficiency samples to assess diagnostic laboratories in France performing a *Trichinella* digestion assay. *J Food Prot*. 2007;70(7):1685-90. Epub 2007/08/10.
115. Woolhouse ME, Gowtage-Sequeria S. Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2005;11:1842-7.
116. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008;451:990-3.
117. Freeman RS, Stuart PF, Cullen SJ, Ritchie AC, Mildon A, Fernandes BJ, et al. Fatal human infection with mesocercariae of the trematode *Alaria americana*. *Am J Trop Med Hyg*. 1976;25(6):803-7. Epub 1976/11/01.
118. Portier J, Jouet D, Vallée I, Ferté H. Detection of *Planorbis planorbis* and *Anisus vortex* as first intermediate hosts of *Alaria alata* (Göeze, 1792) in natural conditions in France: Molecular evidence. *Vet Parasitol*. 2012(190 (1-2)):151-8. Epub 2012/07/17.
119. Jaksic S, Unitil S, Vucemilo M. Nachweiss von Mesozerkarien des Saugwurms *Alaria alata* im Wildschweinfleisch. *Z Jagdwiss*. 2002;48:203-7.
120. Grösse K, Wüste T. Der Duncker'sche Muskelegel: Funde bei der Trichinenuntersuchung mittels Verdauungsverfahren. *Fleischwirtschaft*. 2006;86(4):106-8.

121. Milešević M, Ekert M, Mahnik M. Incidence of mesocercaria of *Alaria alata* in the meat of wild boars killed in the hunting grounds "Povavske sume" from 4 september to 10 december 2003. *Veterinarska Stanica*. 2004;35(4):215-9.
122. Fernandes BJ, Cooper JD, Cullen JB, Freeman RS, Ritchie AC, Scott AA, et al. Systemic infection with *Alaria americana* (Trematoda). *Can Med Assoc J*. 1976;115(11):1111-4. Epub 1976/12/04.
123. Odening K. Zur diagnostik des Mesocercarie von *Alaria alata*, eines möglichen Parasiten des Menschen in Europa, an Hand experimenteller Befunde beim Affen. *Mber Dtsch Akad Wiss Berlin*. 1963;5:385-90.
124. Riehn K, Hamedy A, Grosse K, Zeitler L, Lucker E. A novel detection method for *Alaria alata* mesocercariae in meat. *Parasitol Res*. 2010;107(1):213-20. Epub 2010/04/21.
125. Riehn K, Hamedy A, Alter T, Lucker E. Development of a PCR approach for differentiation of *Alaria* spp. mesocercariae. *Parasitol Res*. 2011;108(5):1327-32. Epub 2011/01/07.
126. Riehn K, Hamedy A, Grosse K, Wuste T, Lucker E. *Alaria alata* in wild boars (*Sus scrofa*, Linnaeus, 1758) in the eastern parts of Germany. *Parasitol Res*. 2012;111(4):1857-61. Epub 2012/05/09.
127. Kulldorff M. A spatial scan statistic. *Communications in Statistics: Theory and Methods*. 1997;26:1481-96.
128. Kulldorff M. SaTScan user guide for version 9.1. 2011; Available from: Available at: [http://www/statscan.org/](http://www.statscan.org/).
129. Team RdC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2009. 409 p.
130. Team QGDC. Quantum GIS Geographic Information System. <http://qgis.osgeo.org>: Open Source Geospatial Foundation Project; 2012; Available from: <http://qgis.osgeo.org>.
131. Murphy TM, O'Connell J, Berzano M, Dold C, Keegan JD, McCann A, et al. The prevalence and distribution of *Alaria alata*, a potential zoonotic parasite, in foxes in Ireland. *Parasitol Res*. 2012;111(1):283-90. Epub 2012/02/22.
132. Choquenot D, McIlroy J, Korn T. Managing vertebrate pests: Feral Pigs. Canberra: Bureau of Resource Sciences; 1996.
133. Baubet E, Ropert-Coudert Y, Brandt S. Seasonnal and annual variations in earthworm consumption by wild boar (*Sus scrofa scrofa* L.). *Wildlife research*. 2003;30:179-86.
134. Baubet E. Biologie du sanglier en montagne. Lyon: *PhD thesis*. Université Claude Bernard Lyon 1; 1998.
135. Andreas K. Helminthen einheimischer Froschlurche [Vet diss]. Berlin: FU Berlin; 2006.
136. Anonymous. National inventory of natural heritage. 2003-2012; Available from: <http://inpn.mnhn.fr/accueil/index>.
137. Pflieger V. Guide des coquillages et mollusques. Hatier, editor. Paris: Hatier; 1989. 191 p.
138. Hofer DP, Johnson AD. *Alaria mustelae*, *A. marciana*, and *A. arisaemoides*: chemical naturen of mesocercarial capsule. *Trans Am Microsc Soc*. 1970;89(2):254-9.
139. Shoop WL, Corkum KC. Migration of *Alaria marciana* (Trematoda) in domestic cats. *J Parasitol*. 1983;69(5):912-7. Epub 1983/10/01.
140. Kidawa D, Kowalczyk R. The effects of sex, age, season and habitat on diet of the red fox *Vulpes vulpes* in northeastern Poland. *Acta theriologica*. 2011;56(3):209-18. Epub 2011/07/19.
141. Segovia JM, Guerrero R, Torres J, Miquel J, Feliu C. Ecological analyses of the intestinal helminth communities of the wolf, *Canis lupus*, in Spain. *Folia Parasitol (Praha)*. 2003;50(3):231-6. Epub 2003/10/11.

142. Wasiluk A. [Alariosis--newly diagnosed trematodiasis]. *Wiad Parazytol.* 2009;55(4):349-52. Epub 2009/01/01. Alarioza--przywrzyca nowo rozpoznawana.
143. Gadomska K. The qualitative and quantitative structure of the helminthocoenosis of wild boar (*Sus scrofa* L.) living in natural (Kampinos National Park) and breeding conditions. *Acta parasitologica Polonica.* 1981;28(16):151-70.
144. ONCFS. Tableaux de chasse des ongulés sauvages saison 2010-2011. Supplément Faune Sauvage. 2011;292:8.
145. ONCFS. Tableaux de chasse des ongulés sauvages saison 2009-2010. Supplément Faune Sauvage. 2010;289:8.
146. ONCFS. Tableaux de chasse des ongulés sauvages saison 2008-2009. Supplément Faune Sauvage. 2010;287:8.
147. Massei G, Genov PV, Staines BW, Gorman ML. Factors influencing home range and activity of wild boar (*Sus scrofa*) in a Mediterranean coastal area. *J Zool.* 1997;242:411-23.
148. Massei G, Genov PV. The environmental impact of wild boar. *Galemys.* 2004;16:135-45.

Résumé

Le parasite *Alaria alata* (Goeze, 1782) est un trématode qui nécessite trois hôtes obligatoire et qui présente la particularité de pouvoir infester un grand nombre d'espèces animales (oiseaux, reptiles, mammifères) au stade mésocercaire..Depuis que la recherche de trichine par des méthodes de digestion a été rendu obligatoire chez les sangliers chassés dans l'ensemble des pays de l'union européenne, elle a permis également la détection des mésocercaires dans les muscles de ces animaux. L'étude de la répartition des déclarations de sangliers porteurs montre que les cas se situent majoritairement dans l'Est de la France. Le nombre de déclarations en augmentation entre 2007 et 2010 est probablement lié à la sensibilisation des laboratoires à la présence d'*A. alata* plutôt qu'une réelle émergence. A partir d'une base de données de déclaration dans le Bas-Rhin montre que la répartition spatiale des sangliers porteurs du parasite se limite à la vallée du Rhin bornée par le massif des Vosges soulignant ainsi l'importance des zones humides pour la maintien du parasite. Une relation significative existe entre le portage du parasite et les saisons printemps-été ainsi qu'une émergence réelle du parasite entre 2007 et 2010. Par une approche moléculaire le rôle de *Planorbis planorbis* et *Anisus vortex* comme premier hôte intermédiaire a été confirmée *in natura* lors de l'examen de mollusques. La nature des biotopes des mollusques a été abordée ainsi que leur périodes d'émission des cercaires d'*A. alata* ce qui explique partiellement la saisonnalité des cas observée chez les sangliers du Bas-Rhin..Des prélèvements de muscles sur 6 sangliers chassés dans des zones de forte circulation du parasite, soumis à une méthode de Baermann modifiée, ont permis de mettre en évidence des taux d'infestation de plus de 1000 mésocercaires pour 100 gr. La distribution des mésocercaires chez le sanglier est très large avec toutefois des localisations ciblées vers les tissus antérieurs au diaphragme. Nous avons également mis en évidence une sensibilité du parasite à la congélation et une longue persistance dans les viandes en décomposition.. A partir de mésocercaires isolées sur sanglier, des infestations sur souris ainsi que des tests de survie *in vitro* ont été effectués :. Chez les souris, chez certains amphibiens et *in vitro*, une encapsulation active des mésocercaires a été observée ce qui tend à montrer que le parasite dispose de moyens d'éviter la réaction de l'hôte. Si le parasite (au stade cercaires et mésocercaires) est fortement inféodé aux milieux humides, il est capable de phénomène de transfuge à une grande variété d'hôtes paraténiques qui ainsi participent très largement à son maintien et à sa dispersion.

Summary

The parasite *Alaria alata* (Goeze, 1782) is a flatworm which needs three obligatory hosts for its development but its particularity lies in that it can infect a wide number of hosts (birds, reptiles, mammals) at the mesocercarial stage. Since the search of *trichinella* by pepsinic digestion in the muscles of hunted wild boars has become mandatory in the European union, this analysis has also lead to the detection of *Alaria alata* in the muscles of these animals. The study of case distributions shows that most of the cases have occurred in the East of France. The number of infected wild boars has increased between 2007 and 2010 which is probably more due to the awareness of laboratories to the presence of *A. alata* mesocercaria than to a true emergence. Using database for the Bas-Rhin *département*, we were able to show a geographical cluster of positive wild boars around the Rhine Valley and bordered by the Vosges Mountains, hence showing the importance of wetland areas for the sustenance of the parasite. A significant association between *A. alata* positivity and the spring and summer seasons was noted as well as a true emergence of the parasite between 2007 and 2010. We then sought to identify the first intermediate snail hosts using molecular tools on snail and cercaria collected in infected areas which lead us to identify two Planorbid species: *Planorbis planorbis* and *Anisus vortex*. Search of these two species on different biotopes showed that specific environmental conditions were needed for these species, and therefore the parasite, to be present. We proceeded to test different muscular samples from 6 wild boars using a test derived from the Baermann method. Tests showed the highest parasite burdens ever observed in the literature with several samples over 1000 mesocercaria/100g. Distribution within the carcass is very wide though it appears to be oriented to the tissues anterior to the diaphragm. We also showed that the parasite was sensitive to freezing but long persisting in decaying meat. From the mesocercaria collected on the wild boars, experimental infections were performed on mice and survival tests were done *in vitro*. In mice, but also in amphibians and *in vitro*, mesocercaria actively formed an inert capsule which would tend to prove the existence of equipments to evade the host's reactions. The works presented here show two important aspects of *A. alata*'s life cycle: the importance of wetlands for its sustenance and also the parasite's ability to persist in a wide variety of paratenic hosts which participate in its sustenance and dispersal.

Mots clés : *Alaria alata*, Trématode, Helminthe, Hôte, paraténicité, épidémiologie, diagnostic, cycle, Planorbidés, *Anisus vortex*, *Planorbis planorbis*, sanglier, mésocercaire, furcocercaire.