

ACADEMIE DE MONTPELLIER

---

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

---

DIPLOMES D'ETUDES APPROFONDIES

PARASITOLOGIE ET PATHOLOGIE

RAPPORT DE STAGE

INTRODUCTION A L'ÉTUDE DU POLYMORPHISME ENZYMATIQUE DE  
L'ESPECE *ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS* LEUCKART, 1863

---

présenté par

Christophe CHARTIER

Date de soutenance : Septembre 1984

MP 52091

9527



## STAGE

effectué au Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie

(Faculté de Médecine de Créteil)

sous la direction de M. le Professeur HOUIN

(une partie de ce stage a été réalisée au  
laboratoire de Parasitologie comparée, Professeur EUZET, U.S.T.L.,  
Montpellier).

## PLAN

---

### INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : Connaissances actuelles sur le genre *Echinococcus*  
Référence particulière sur *Echinococcus multilocularis*

#### I/ Les différentes espèces et sous-espèces du genre *Echinococcus*

1. *Echinococcus granulosus*
2. *Echinococcus oligarthrus*
3. *Echinococcus vogeli*
4. *Echinococcus multilocularis*

#### II/ Critères taxonomiques dans le genre *Echinococcus* : intérêts et limites

1. critères morphologiques
2. critères biologiques et physiologiques
3. critères géographiques
4. critères immunologiques
5. critères biochimiques

SECONDE PARTIE : Etude préliminaire du polymorphisme enzymatique chez  
*Echinococcus multilocularis*

#### I/ Matériel et méthodes

1. Obtention des parasites
2. Préparation des parasites
3. Electrophorèse

#### II/ Résultats

#### III/ Discussion

### CONCLUSION

## INTRODUCTION

Echinococcus Batsch, 1786 est un plathelminthe appartenant à la classe des Cestoda, à l'ordre des Cyclophyllidea et à la famille des Taeniidae. Ce genre est divisé en espèces et sous-espèces. Son cycle biologique est de type hétéroxène à un hôte intermédiaire impliquant une relation proie-prédateur. Le passage de l'hôte définitif (H.D.) à l'hôte intermédiaire (H.I.) s'effectue par émission d'œufs dans le milieu ; le retour au stade adulte est assuré par la chaîne alimentaire. La spécificité du stade adulte - mésoparasite du tube digestif - est assez étroite (Carnivores) tandis que celle du stade larvaire - endoparasite dans différents tissus et viscères - est beaucoup plus large (nombreux mammifères). Les échinococcoses sont des zoonoses imparfaites (ou hémizoonose), l'homme étant un H.I. anormal. Le parasite ne peut en effet retourner chez l'animal pour deux raisons :

- le parasite égaré chez l'homme n'atteint pas le stade permettant le passage à l'H.D.  
- absence de protoscolex -. C'est le cas d'Echinococcus multilocularis.
- la relation proie-prédateur nécessaire à l'infestation de l'H.D. ne peut évidemment pas se produire dans les conditions habituelles (exception faite pour les tribus primitives où les cadavres humains ne sont pas ensevelis).

Le parasite est ainsi dans une impasse évolutive ou/et épidémiologique. Les modalités de l'infestation humaine donnent à cette zoonose les caractères tantôt d'euthyzoose (transmission immédiate par les embryophores sur l'H.D. vivant ou mort) tantôt de mesityzoose (transmission médiate par des éléments inanimés - eau, végétaux - ou animés - insectes coprophiles... -, éléments qui portent à la surface les embryophores (EUZÉBY, 1984).

Cependant la gravité clinique et l'absence de thérapeutique autre que chirurgicale (elle même non satisfaisante pour l'échinococcose alvéolaire) font de cette affection une des zoonoses parasitaires les plus redoutables.

La répartition géographique du genre Echinococcus est, toutes espèces confondues mondiale.

Sur le plan taxonomique les études infragénériques et infraspécifique de ce parasite ont fait l'objet de nombreuses analyses. Cependant, celles-ci, par leurs divergences et leurs limites, ne permettent pas à l'heure actuelle d'établir une classification unanime. Le propos de ce travail est d'effectuer, dans un premier temps, une revue générale du genre Echinococcus et ensuite d'envisager le cas particulier d'Echinococcus multilocularis à travers une étude préliminaire de son polymorphisme enzymatique.

## PREMIERE PARTIE : CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LE GENRE ECHINOCOCCUS - REFERENCE PARTICULIERE SUR ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS

### I - Les différentes espèces et sous-espèces du genre Echinococcus

Nous allons envisager pour chacune d'entre elle, de manière systématique, l'étude morphologique du parasite, sa répartition géographique, les hôtes naturellement infestés, la biologie des stades adulte et larvaire et les données épidémiologiques essentielles.

#### 1. Echinococcus granulosus Batsch, 1786

Cette espèce est scindée en 9 sous-espèces sur des considérations morphologiques et biologiques. Cependant RAUSCH en 1967 n'admet comme valides sur le plan taxonomique les seules sous-espèces E.g. granulosus et E.g. canadensis (1). D'autres auteurs depuis se sont intéressés à la subspéciation d'E. granulosus, tout particulièrement en Grande Bretagne et en Australie, le terme "race" remplaçant celui de sous-espèce (3) (12) (14) (9).

##### 1.1 - Morphologie

Stade adulte : E. granulosus se distingue nettement des 3 autres espèces d'échinocoque connues actuellement (voir annexe 1). Par contre la discrimination morphologique au sein de l'espèce paraît plus délicate, d'autant que la variabilité en ce domaine est fort accentuée et mal appréhendée par les taxonomistes (13). Cependant on peut avec EUZEBY (1971) retenir les "sous-espèces" ou "variants" suivants : E.g. granulosus, E.g. equinus, E.g. canadensis et E.g. borealis.

Stade larvaire : aucune distinction infraspécifique n'est possible à ce niveau. La larve élémentaire est monokystique, le plus souvent globuleuse. Elle peut être unique ou multiple, dans ce dernier cas les kystes sont disséminés ou agminés, l'agmination résultant elle-même d'une infestation massive d'emblée ou plus rarement d'un processus d'échinococcose secondaire. Quoiqu'il en soit, les kystes restent indépendants, limités par une adventice propre et l'on parle d'hydatidose polykystique ou pseudomultiloculaire (2) (7).

##### 1.2 - Répartition géographique et hôtes naturels

E.g. granulosus : découvert en Allemagne par GOEZE (1782). Ce parasite originaire d'Europe connaît actuellement une diffusion très large à la suite de la diffusion de ses hôtes naturels lors des phénomènes migratoires de colonisation : continents américain, eurasiatique, africain, australien ainsi que Nouvelle Zélande, Japon... Ses hôtes définitifs (H.D.) appartiennent au super ordre des Carnivores et quasi exclusivement à la famille des Canidae : le genre Canis (C. familiaris, C. lupus, C. mesomelas, C. aureus, C. latrans, C. dingo) est de loin le plus important, les genres Vulpes (V. vulpes), Lycaon (L. pictus) et Dusicyon participent également mais leur rôle réel est mal connu. Deux autres familles sont impliquées : celle des Hyenidae (Crocuta crocuta) et des Felidae (Panthera leo). Les hôtes intermédiaires appartiennent au super ordre des Ongulés. L'ordre des Perissodactyles est peu concerné (famille des Equidae : zèbre africain) tandis que l'ordre des Artiodactyles renferme la presque totalité des H.I. : familles des Suidae, Camelidae, Cervidae, Antilocapridae, Bovidae (sous-famille des Bovinae, Ovinae, Caprinae...) et des Giraffidae. L'hydatidose à E.g. granulosus se rencontre également chez les Macropodidae (sous-classe des Metathériens) et chez de nombreux singes (ordre des primates) (1) (2) (6) (13).

Cependant E.g. granulosus ne paraît pas être un taxon homogène mais plutôt un ensemble de souches pour lesquelles les H.I. pourraient être très spécifiques. Ainsi on suspecte

l'existence d'une souche "dromadaire", d'une souche "cervidés sauvages" (dans la région de Cordoue en Espagne 10% des ruminants domestiques sont infestés alors que le cerf ne l'est jamais), d'une souche "kangourou" en Australie (incapable de se développer chez le mouton alors que l'inverse est possible), d'une souche "herbivores sauvages" en Afrique (dont l'H.D. est le lion)... La spéciation au sein d'*E. granulosus* est donc particulièrement complexe mais d'importance épidémiologique capitale car les différentes souches ne semblent pas toutes infestantes pour l'homme (64) (3).

*E. g. equinus* : individualisé en Grande Bretagne par WILLIAMS et SWEATMAN en 1963, ce parasite implique typiquement le chien domestique et les équidés dans le cycle naturel. Le renard d'une part, les bovidés et suidés d'autre part ne participeraient pas ou très peu au maintien du parasite, ce qui le distingue clairement d'*E. g. granulosus*. Sa répartition géographique restera peu précise tant que son statut ne sera pas nettement défini; on l'a signalé uniquement en Europe (Royaume Uni, Belgique, Hollande, France, Allemagne, Hongrie...) (9).

*E. g. canadensis* : distribué dans le nord du Canada et en Alaska ses H.D. sont le chien et le loup et ses H.I. le renne et sa variété sauvage le caribou (*Rangifer rangifer*)

*E. g. borealis* : de même répartition que la population précédente ses H.D. sont le chien, le loup, le coyote et le renard roux (*Vulpes fulva*) tandis que la larve se développe chez l'élan (*Alces alces*) et le wapiti (*Cervus canadensis*). Les deux derniers échinocoques nord américains sont responsables de zoonoses (2).

### 1.3 - Biologie du parasite

**Stade adulte** : la période prépatente est de 6 à 8 s pour *E.g. granulosus*, 7 s pour *E.g. equinus* et 5 à 6 s pour *E.g. canadensis* et *borealis*. La durée de vie moyenne, connue seulement pour *E.g. granulosus* est de 4 à 6 mois mais peut atteindre parfois 1 à 2 ans.

Des études expérimentales in vivo et in vitro ont permis de comparer le développement des souches *granulosus* et *equinus*. De grandes différences apparaissent in vitro sur un milieu de culture diphasique : celui-ci permet le développement jusqu'à la maturité sexuelle pour *E.g. granulosus* tandis qu'*E.g. equinus*, bien que survivant longtemps, ne dépasse jamais le stade de présegmentation quel que soit le milieu utilisé. Une différence d'ordre physiologique ou nutritionnelle est soupçonnée entre les deux souches (9).

**Stade larvaire** : la longévité des hydatides est de plusieurs années (correspondant à la durée de vie des H.I.) et l'acquisition de la fertilité, quand elle existe, demande 8 à 12 mois. Leur localisation est variable suivant la souche considérée.

- pour *E.g. granulosus* : 90% des larves sont retrouvées au niveau du foie et du poumon, les 10% restant ayant une localisation très variable (rate, coeur, rein, os...). La nature de l'H.I. ne semble pas influencer de manière évidente cette localisation.
- pour *E.g. equinus* : l'hydatidose équine est quasi exclusivement hépatique (98% des larves) avec une très grande fertilité des vésicules.
- pour *E.g. canadensis* et *borealis* : le site de prédilection de la larve semble être les poumons.

### 1.4 - Epidémiologie

Les cycles sauvage et "urbain" sont possibles pour *E.g. granulosus*, cependant le cycle rural semble être le plus largement répandu (cycle classique chien/mouton). La relation entre ces trois types de circulation du parasite (en particulier sauvage-rural) n'est plus considérée actuellement comme une évidence (cycles dingo/kangourou en Australie

et lion/herbivores sauvages en Afrique tropicale) (64) (3). Pour E.g. equinus, la spécificité vis-à-vis de l'H.I. est telle que, dans certains pays comme l'Irlande, l'hydatidose équine présente une prévalence très forte, tandis que l'hydatidose ovine n'existe pas, alors que dans d'autres régions (comme la Nouvelle-Zélande) l'inverse se produit. Par ailleurs des infestations très fortes sur les chiens de meute au Royaume Uni, compte tenu de la promiscuité avec les chasseurs et les cavaliers, n'ont été aucunement corrélées avec des cas d'hydatidose humaine, ceux-ci étant limités quasi exclusivement au pays de Galles (zone majeure d'hydatidose ovine avec le nord ouest du pays) (9).

La relativement grande longévité d'E. granulosus et celle considérable de la larve contribuent à une stabilité permanente des possibilités d'infestation, accrue par l'absence d'immunité acquise de l'H.D. sujet à de nombreuses réinfestations (1).

## 2. Echinococcus oligarthrus Diesing, 1863

### 2.1 - Morphologie

**Stade adulte :** Cette espèce se situe sur le plan morphologique à un niveau intermédiaire entre E. granulosus et E. multilocularis (voir annexes) (4).

**Stade larvaire :** les kystes sont de petite taille (1-5 cm) et ont tendance à se cloisonner. L'aspect polykystique est particulier, intermédiaire entre une lésion hydatique et une lésion multiloculaire. Elle ressemble totalement à la larve d'E. vogeli (voir infra).

### 2.2 - Répartition géographique et hôtes naturels

Découvert au Brésil en 1850, ce ténia est limité à l'Amérique centrale et l'Amérique du Sud (en particulier Costa Rica, Panama, Colombie, Brésil et Argentine). Ses H.D. appartiennent à la famille des Felidae et au genre Felis exclusivement : le puma F. concolor (Costa Rica, Panama, Colombie, Brésil), le jaguar F. onca (Panama), le jaguarondi F. eyra (Panama, Colombie), l'ocelot F. pardalis (Colombie), le kudmu F. colocolo et le F. geoffroyi (Argentine). Les H.I. appartiennent à l'ordre des rongeurs; ce sont des agoutis (Dasyprocta aguti, D. fuliginosa, D. punctata), le paca (Cuniculus paca), le rat à piquant (Proechimys semispinosus, P. guyannensis) et le ragondin (Myocastor coypus) découverts infestés à Panama, au Brésil et en Colombie (10). Il est à noter que l'infestation expérimentale du chien a toujours échoué alors qu'elle est positive chez le chat. Considérée initialement comme zoonose par THATCHER et coll. (1966), les différents cas humains d'échinococcose polykystique sur le continent sud-américain s'avèrent finalement avoir pour étiologie E. vogeli (5) (4).

### 2.3 - Biologie du parasite

Les connaissances sont minces sur le stade adulte. Les vésicules parasitaires, quel que soit l'H.I., se développent le plus souvent dans la musculature superficielle (sous cutané, extrémités), le coeur, le diaphragme, les psoas et la paroi abdominale interne. On les trouve plus rarement dans le foie, les poumons ou la rate excepté chez Proechimys sp pour qui ces localisations sont habituelles.

### 2.4 - Epidémiologie

Compte tenu des H.D. actuellement connus, le cycle d'E. oligarthrus est exclusivement sauvage et ne semble pas impliquer l'homme comme H.I. accidentel.

### 3. Echinococcus vogeli Rausch et Bernstein, 1972

#### 3.1 - Morphologie

**Stade adulte :** Cette espèce possède des traits morphologiques très originaux : grande longueur du strobile (seul E. granulosus peut avoir une taille supérieure), rapport de la longueur de la portion antérieure (c'est-à-dire sans le segment grvide) sur la longueur du segment grvide de 1/1,9 à 1/3, utérus grvide de forme tubulaire (voir annexes).

**Stade larvaire :** dans l'H.I. naturel, la larve prend l'aspect d'un kyste unique, subsphérique, asymétrique, rempli de liquide, d'une taille allant jusqu'à 3 cm de diamètre. Les kystes sont associés en petits groupes parfois très denses. Chaque kyste est subdivisé en de nombreux compartiments issus d'une prolifération endogène du tissu germinal et lamellaire. Chez l'homme par contre un phénomène invasif par prolifération exogène est observé, ce développement atypique résultant vraisemblablement d'une incompatibilité hôte-parasite observée également chez E. multilocularis (voir infra) (7).

#### 3.2 - Répartition géographique et hôtes naturels

Ce cestode répertorié récemment a été découvert en 1972 en Equateur sur le chien sauvage d'Amérique du Sud (Speothos venaticus) puis sur le chien domestique en Colombie. Les H.I. naturels recensés sont le paca, l'agouti (D. aguti) et vraisemblablement le ragondin en Colombie et au Vénézuéla. La répartition de ces hôtes laisse supposer une distribution d'E. Vogeli en Amérique du Sud allant au moins de Panama au Paraguay. D'autre part 13 cas d'hydatidose polykystique humaine en Colombie et dans les régions environnantes furent diagnostiqués sur la morphologie des crochets du rostre comme étant dus à E. vogeli(10) (8).

#### 3.3 - Biologie du parasite

La larve se localise typiquement au foie ou de manière accidentelle au niveau du ligament hépatique ou du mésentère. Les kystes sont en majorité en surface du parenchyme (85%) au nombre moyen de 22 par organe (7).

#### 3.4 - Epidémiologie

Les cycles sauvage et rural coexistent naturellement, ce dernier étant vraisemblablement à l'origine de l'hydatidose polykystique humaine sud américaine. L'infestation du chien, d'ailleurs, doit être relativement fréquente puisque les viscères du paca - viande fort appréciée de l'homme - sont donnés aux chiens de chasse (10).

Remarque : Au terme de l'étude de ces deux échinocoques autochtones du continent sud américain, il nous faut signaler deux autres espèces découvertes dans ces mêmes régions et tombées par la suite en synonymie avec les espèces préalablement décrites. Il s'agit d'E. patagonicus Szidat, 1963, trouvé sur le renard andino-patagon (Dusicyon culpaes) identifié comme E. granulosus par RAUSCH et NELSON (1963) et d'E. pampeanus Szidat, 1967, trouvé sur le kudmu (Felis colocolo) en Argentine identifié comme un jeune exemplaire d'E. oligarthrus par RAUSCH et BERNSTEIN (1972).

### 4. Echinococcus multilocularis Leuckart, 1863

Cette espèce a été primitivement signalée et décrite en Allemagne, puis RAUSCH et SCHILLER en 1954 décrivent en Alaska (Ile St Laurent) un échinocoque très semblable

qu'ils appellent E.sibiricensis et qui tombe rapidement en synonymie avec la première espèce. Cependant VOGEL en 1957 le replace en sous-espèce : E.multilocularis sibiricensis (par rapport à E. m.multilocularis). Enfin VOGEL en 1960 et RAUSCH en 1967 proposent les termes de "variant" "race" ou "forme" pour ces deux échinocoques considérant les réelles différences morphologiques, biologiques et géographiques comme non valables sur le plan taxonomique.

#### 4.1 - Morphologie

**Stade adulte** : les caractéristiques générales sont présentées dans le tableau A. Sur le tableau C apparaissent les différences morphologiques relevées entre trois souches d'E.multilocularis en particulier celles d'Allemagne et d'Alaska (voir Annexes)

**Stade larvaire** : il est formé typiquement par une masse de petites vésicules irrégulières (3 à 4 mm de diamètre) reliées les unes aux autres, disposées de manière rayonnante et devenant plus volumineuses à la périphérie de la grappe. Les vésicules (ou kystes) contiennent des capsules proligères (renfermant les protoscolex) et un magma gélatineux semi-liquide. Elles sont produites par un phénomène de prolifération exogène (extension de la membrane germinative) conduisant à l'invasion du tissu de l'hôte. Ce bourgeonnement vésiculaire est vraisemblablement contrôlé par un mécanisme intrinsèque lié à la production de protoscolex (7) (11).

#### 4.2 - Répartition géographique (voir carte)

##### 4.2.1 - Description des foyers

E.multilocularis est mondialement réparti dans l'hémisphère Nord au dessus du 30e degré de latitude. La distribution du parasite particulièrement hétérogène est responsable de foyers endémiques apparemment distincts entre eux.

**Foyer arctique nord américain** : il s'étend probablement sur l'ensemble du territoire d'Alaska (principalement sur l'île St Laurent et la côte où la population Esquimo a révélé la maladie) ainsi que dans la zone arctique canadienne (île de Banks et de Cornwallis, Pointe Esquimo...)

**Foyer nord américain** : il inclut la partie centre-sud du Canada (Alberta, Saskatchewan, Manitoba) et la partie centre-nord des Etats-Unis (Montana, Dakota Nord et Sud, Minnesota, Wyoming et Iowa).

**Foyer d'Europe occidentale** : France (Centre et Est), Allemagne de l'Ouest (Sud-Ouest), Suisse, Autriche, Italie (Nord)

**Foyers européens isolés** : îles Scandinaves (2), Bulgarie, Grèce, Moldavie soviétique, Ukraine (URSS)

**Foyer d'Eurasie Orientale** : Turquie (Anatolie Orientale), URSS (Caucase, Haute Volga, Astrakan, Tadjikistan, Georgie, Arménie, Ouzbékistan, Azerbaïdjan, Kazakhstan, Kirghizistan, Turkménistan, Altaï, Sibérie occidentale, centrale et orientale, Saïan, Kamtchatka, îles de Bering, Kouriles, Commandeur), Iran (Nord-Ouest et Nord-Est), Afghanistan (Nord), Inde (Cachemire et Jammu au nord), Chine (Nord-Ouest : provinces de Gansu, Qinghai, Sichuan, Xinjiang et Ningxia), Japon (île de Rebun, Est d'Hokkaido).

D'autres foyers d'importation vraisemblablement accidentelle ont été mentionnés en Grande Bretagne et en Sardaigne (WALSHE 1954 et BIOCCA 1956 cités par EUZEBY 1971).

D'autre part l'échinococcose alvéolaire humaine a été signalée sur le continent africain et demande une enquête approfondie (57).

#### 4.2.2 - Discussion

La focalisation de l'échinococcose à E. multilocularis bien que très apparente peut être en partie due au manque d'investigation épidémiologique systématique (taïga nord américaine, Europe centrale, territoire de l'Union Soviétique et pays frontaliers au sud). Par ailleurs plusieurs foyers peuvent être communs :

**Les foyers arctiques nord américain et soviétique :** la situation épidémiologique comparable entre les Iles St Laurent, Bering et Commandeur (H.I. - Clethrionomys rutilus) fait dire à RAUSCH en 1952 que le foyer de l'île St Laurent est d'origine asiatique, le fort courant existant dans le détroit de Bering permettant le passage de rongeurs d'un continent à l'autre par l'intermédiaire des icebergs (66).

**Les foyers nord-américain arctique et central :** RAUSCH en 1956 prévoit déjà l'introduction d'E. multilocularis au centre du continent nord américain par des chiens importés des régions arctiques (55). Après la découverte du premier renard infesté aux USA (Nord Dakota en 1964) et les enquêtes épidémiologiques qui ont suivi, l'étendue géographique de la parasitose au centre du continent paraît trop limitée par rapport à la distribution des hôtes naturels potentiels pour que E. multilocularis soit indigène dans ces régions. Ceci suggère donc une introduction naturelle du cestode depuis le nord (faible distance entre la pointe sud du foyer arctique - pointe Esquimo - et la pointe nord du foyer américano-canadien central - Manitoba) ou accidentelle par l'intervention de l'homme (transport de chiens, de fourrures de renard...) (26, 49). Ainsi l'on peut penser qu'E. multilocularis a été établi au centre de l'Amérique du Nord dans les années 60 et que la rareté des cas humains dans ce foyer (premier cas aux USA en 1979 au Minnesota) est due à la lenteur de l'apparition des symptômes cliniques de la maladie humaine (61).

**Le foyer japonais et le foyer arctique soviétique :** ces deux foyers sont certainement continus par l'importation initiale de renards polaires bleus des Iles Commandeur aux Iles Kouriles puis, en 1924 par le transports de 12 couples de renards roux de ces dernières îles à l'île Rebun. La présence du parasite dans la zone de Nemuro en Hokkaïdo est vraisemblablement due également à l'importation de renards (à partir des îles Kouriles ?). Le premier cas humain au Japon fut d'ailleurs signalé en 1936 chez un patient ayant vécu sur l'île de Rebun (71).

#### 4.3 - Hôtes naturels du parasite (Voir tableaux D et E en annexe).

Les hôtes définitifs appartiennent à la famille des Canidae (genre Canis, Vulpes, Alopex) et des Felidae (genre Felis) tandis que les hôtes intermédiaires impliquent de manière quasi exclusive l'ordre des Rongeurs tout particulièrement la famille des Muridae et celle des Cricetidae c'est-à-dire des animaux à durée de vie courte (12 à 18 mois). Cependant le stade larvaire a été retrouvé naturellement chez des mammifères appartenant à 3 ordres différents comprenant 8 familles et plus de 20 genres.

**Le foyer arctique étudié principalement en Alaska** se caractérise par un cycle sauvage de type renard-rongeur : dans les régions de toundra du nord et de l'ouest les 2 types de renards sont présents (renard polaire : Alopex lagopus et renard roux : Vulpes fulva) et le principal H.I., sinon l'unique, est un lemming (Lemmus sibiricus) (55). Le rôle épidémiologique des deux H.D. n'est d'ailleurs pas le même si l'on en juge par le nombre de cestodes par animal : 30.000 en moyenne chez le renard polaire (avec un maximum de 160.000) 150 pour le renard roux (maximum de 250) (26, 25, 49). Sur les îles St Laurent, Bering et Commandeur d'autres rongeurs comme Microtus oeconomus et Clethrionomys rutilus servent d'H.I. (66) (24). Le foyer arctique sud s'appuie sur ces derniers et sur le renard roux. Il faut signaler enfin qu'un cycle semi-domestique implique le chien de traîneau comme H.D. majeur (jusqu'à 25% de chiens parasités

dans certains villages esquimos) (61).

**Le foyer nord américain** compte le renard roux comme H.D. dans la plupart des régions : on observe chez lui la plus forte prévalence (7 à 70%) et la plus forte intensité d'infestation (en général au dessous de 500 cestode/animal mais parfois plus de 2.000) (26) (49). Dans les régions plus arides ou plus montagneuses le renard roux est absent et le coyotte le remplace comme H.D. principal (prévalence de 4% dans le Nord Dakota et le Montana) (49) (60). Les H.I. principaux sont Peromyscus maniculatus et Microtus pennsylvanicus. Le premier est très largement distribué en Amérique du Nord; chez lui la larve se développe modérément en formant un nombre limité de protoscolex. De plus ses moeurs favorisent l'infestation : habitus alimentaire (végétaux et insectes), habitat fréquent dans d'anciens terriers de renard. On le considère comme l'H.I. le plus important et la prévalence de son infestation de 3 à 5,5% est souvent en corrélation avec celle du renard roux (voir épidémiologie) (49) (25) (26). Le second plus limité géographiquement et plus sensible à la parasitose a une prévalence généralement plus faible. Le rat musqué (Ondatra zibethica) pourrait jouer un rôle important (prévalence de 1% dans le Montana) tandis que le rat des bois à queue touffue (Neotoma cinerea rupicola) trouvé infesté au Wyoming semble être un H.I. accidentel (absence de protoscolex et de corpuscules calcaires) (60) (39) (46).

Parallèlement au cycle sauvage, LEIBY et coll. ont décrit en 1972 l'infestation naturelle de deux chats et d'une souris domestiques dans le Nord Dakota et l'intrication étroite entre les foyers sauvage et rural (voire urbain). Le chat cependant semble représenter un H.D. assez médiocre pour E. multilocularis comparé au renard roux ou au chien (100 vers par individu, longueur moyenne du strabile de 1 mm). Le chien n'a pas été signalé infesté dans ce foyer (20) (50).

**Le foyer européen** admet le renard vulgaire (Vulpes vulpes) comme seul H.D. connu dans son cycle sauvage. En France la prévalence observée varie de 5 à 8 % (départements du Nord-Est, Auvergne) et atteint 47% dans le foyer hyperendémique de Haute-Savoie (33) (58) (54) (28) (32); en Allemagne fédérale la Souabe est la plus infestée (40%) suivi du Wurtemberg (13,5%) puis des régions de Baden, Bayern, Hersen, Niedersachsen et Nordrhein-Westfalen (8%) (59) (62); en Suisse le canton de Thurgau a une prévalence de 40% (59). L'intensité de l'infestation est très variable : en Haute-Savoie 46% des renards ont plus de 500 vers et 26% plus de 1.000 tandis qu'en Allemagne fédérale 70% ont moins de 1.000 vers et 30% de 1.000 à 200.000 (32) (62). Les H.I. de ce cycle sylvestre sont en France le campagnol terrestre (Arvicola terrestris) 0,3% et 2,44% respectivement dans le Jura et en Auvergne) (41) (42) (52), en Allemagne fédérale : le ragondin (Myocastor coypus) - Première découverte d'E. multilocularis en Europe en 1950 -, le rat musqué et le campagnol roussâtre (Clethrionomys glareolus) (respectivement 1,4 et 0,9%) et surtout le campagnol des champs Microtus arvalis (0,5%) (59) (62) (63). Il faut signaler qu'Arvicola terrestris est le seul H.I. trouvé naturellement infesté en France et qu'en Auvergne plus de 90% des larves trouvées sur le terrain étaient stériles (60% des larves examinées étaient de jeunes kystes) (52). Un cycle domestique pourrait également s'ajouter à ce cycle sauvage : le chien a été trouvé naturellement infesté en France (Haute Savoie) et par deux fois en Allemagne (Bade Wurtemberg) (32) (31) (61); le chat a été signalé infesté en Allemagne par ECKERT et coll. (1974) et ZEYHLE et coll. (1982). Le chien semble là encore plus favorable au parasite que le chat, la croissance et la segmentation de l'échinocoque étant plus rapides, la taille et le nombre des vers par individu plus grands et le nombre d'oeufs par proglottis plus important (69).

#### **Le foyer d'Eurasie orientale**

- URSS : Dans les régions boréales d'URSS (toundra, toundra sylvestre) le renard

polaire bleu (variété d'Alopex lagopus) constitue l'H.D. essentiel (prévalence de 17% avec une intensité d'infestation de 1.000 à 200.000 cestodes par animal dans la presqu'île de Yamal) tandis que les principaux H.I. sont des lemmings (51). Cependant par le jeu des grandes migrations d'hiver le renard bleu pénètre profondément dans la taïga en suivant le réseau hydrographique et s'alimente, en plus des lemmings, de rongeurs de la famille des Muridae (78). Dans les autres régions d'URSS le renard vulgaire est le principal H.D. car sa diffusion est très large (toundra, steppe, forêt, montagne, désert...); les autres carnivores semblent avoir un rôle secondaire car peu abondants, il s'agit du loup (dont l'alimentation, de surcroît, est constituée d'Artiodactyles sauvages) en Sibérie occidentale, du renard corsac (Vulpes corsac) au Tadjikistan et Kazakhstan et du chat tacheté (Felis libica sarda) au Kazakhstan, ce dernier étant très sensible mais très focalisé (78). Trente espèces de rongeurs servent d'H.I. mais les importants appartiennent aux sous-familles des Microtinae et Murinae (Microtus, Apodemus, Arvicola, Clethrionomys, Ondatra...). Les carnivores domestiques et les rongeurs synanthropes participent à un cycle domestique sous la forme de microfoyers très localisés et temporaires d'une grande importance épidémiologique dans l'échinococcose alvéolaire humaine. Ainsi à Viliouisk - province de Iakoutsk - la prévalence d'E. multilocularis chez le chien peut atteindre 64% et cette région est considérée par NABOROV (1978) comme la plus forte zone endémique d'URSS (11 cas pour 100.000 habitants par an). Le chat a été trouvé infesté en Sibérie occidentale et la souris domestique dans le Iakoutsk et la Moldavie ; ces deux espèces s'intègrent parfaitement dans le cycle parasitaire par une relation proie-prédateur bien définie l'un ou l'autre assurant la liaison avec le cycle sauvage (51).

- **Pays frontaliers de l'URSS** : dans ces pays tout particulièrement, l'échinococcose alvéolaire humaine est le premier et seul révélateur bien souvent de l'existence du parasite. Peu d'informations épidémiologiques sont disponibles. Le foyer turc se situe dans la région des plateaux de l'Anatolie orientale à proximité des territoires soviétiques de Géorgie et d'Arménie (40 cas humains jusqu'en 1971) (36). Les régions nord de l'Iran et de l'Afghanistan sont endémiques ainsi que les montagnes boisées du Cachemire et du Jammu en Inde (Premier cas humain signalé en 1978) (2) (27) (45). En Chine 90 cas humains répertoriés jusqu'en 1980 se répartissent sur 5 provinces voisines situées dans la partie nord ouest du pays (39) (43).

- **Japon** : la zone endémique se situe au nord du pays (au contact des îles Kouriles soviétiques), l'île Rebun et la région de Nemuro dans l'est de l'Hokkaido. Le cycle sauvage fait intervenir le renard vulgaire (prévalence de 19% dans ce foyer) et deux Microtinés : Clethrionomys rufocanus (3%) et C. rutilus (2,4%). Le chien a été également trouvé infesté (1,6%) (44) (71).

Remarque : Les données chiffrées concernant la prévalence du parasite chez l'H.D. ou l'H.I. ont une valeur purement indicative compte tenu de leurs grandes fluctuations (voir épidémiologie).

#### 4.4 - Biologie du parasite

**Stade adulte** : l'infestation expérimentale du chien a montré qu'E. multilocularis isolé se développe préférentiellement dans le dernier quartier de l'intestin grêle et dans les deux derniers quand sa croissance est concomitante avec E. granulosus. E. multilocularis s'insinue entre les villosités intestinales et son rostre pénètre dans les cryptes de Lieberkühn. Chez le chat par contre, il reste en superficie de la muqueuse.

La période prépatente chez le chien est de 28 jours pour les souches européennes, de 30 à 35 jours pour les souches nord-américaines (69). La longévité estimée habituellement à 2 ou 3 mois peut cependant dépasser 6 mois (67). La culture in vitro ne permet pas de segmentation normale pour *E. multilocularis* qui devient pourtant sexuellement mûr sous la forme d'individus appelés "monozoïque" (14).

**Stade larvaire :** contrairement au stade adulte, *E. multilocularis* et *E. granulosus* ne partagent aucun H.I. commun (11). La localisation quasi exclusive est le foie avec cependant des possibilités d'échinococcose multiloculaire métastatique. Le processus d'invasion limité de lui même chez les H.I. naturels à vie courte peut être indéfini dans des conditions d'incompatibilité hôte-parasite comme c'est le cas chez l'homme (7). Chez les hôtes favorables il y a formation de kystes nombreux, de grande taille (plusieurs mm de diamètre) et fertiles en deux mois environ ; on note également la présence d'abondants corpuscules calcaires. Chez les hôtes défavorables, au contraire, les kystes sont petits à fertilité retardée (5-6 mois) ou absente avec peu ou pas de corpuscules calcaires. Ainsi chez l'homme la larve reste en phase proliférative de manière lente et continue (sans production de protoscolex généralement) et la partie centrale de la lésion se transforme en une large cavité nécrotique (8). La présence d'un matériel gélatineux semi liquide dans les kystes est souvent signalée mais ne préjuge pas nécessairement d'un phénomène dégénératif (11).

Le développement de la larve dépend en tout premier lieu de l'espèce hôte, mais aussi des lignées génétiques au sein d'une même espèce (15) (22). De plus FAY en 1970 a démontré la corrélation étroite existant entre le moment de la maturation sexuelle de l'hôte et l'accélération du développement larvaire (en particulier l'apparition des protoscolex) chez *Microtus oeconomus*.

Enfin OHBAYASHI et coll. (1971) ont démontré expérimentalement une distinction entre la "race européenne" et la "race arctique" (Ile St Laurent) dans le degré de pathogénicité et la localisation des kystes parasitaires : chez *Microtus pennsylvanicus* et *Clethrionomys rutilus* le nombre de métastases intraabdominales et pulmonaires est particulièrement élevé pour la race européenne. De même, chez des hôtes identiques, le développement larvaire de la "race Nord Dakota" est plus lent que celui de la "race arctique" (22).

#### 4.5 Epidémiologie

Le cycle naturel de l'échinococcose multiloculaire est de type sauvage renard-rongeur. La prévalence de l'infestation chez les hôtes définitifs et intermédiaires varie dans le temps (année, saison) et dans l'espace (foyers très localisés d'hyperendémie) à la suite de modifications qualitatives et quantitatives du schéma proie-prédateur sur lequel s'appuie la circulation du parasite. Ces fluctuations ont été particulièrement mises en évidence en Alaska, au centre du continent Nord américain et en Géorgie (URSS) (24) (25) (26) (70). La "microfocalisation" est indéniable en Europe ainsi que les variations annuelles (ou pluriannuelles) de prévalence mais l'existence d'une véritable fluctuation d'origine saisonnière n'est pas démontrée.

**Facteurs influençant la prévalence de l'hôte définitif :** l'infestation de l'H.D se produisant par ingestion de l'H.I., la densité de ces H.I. sur les plans spatial et temporel conditionnera de manière primordiale la prévalence chez le renard. Ainsi les foyers d'hyperendémicité existeront dans les zones à forte densité de rongeurs H.I. et s'élargiront lors des années à pullulation de ces mêmes animaux. Cependant ces H.I. ne constituent plus, en certaine saisons, l'essentiel de l'alimentation du renard (par suite d'un manque de disponibilité); ce changement alimentaire réduit le risque d'infestation mais peut également provoquer une élimination plus rapide du ténia (ingestion de végétaux, de lapins...). Il faut remarquer à ce propos que la durée de vie moyenne d'*E. multilocularis* est d'un trimestre. C'est donc en partie dans les moeurs

alimentaires du renard que se trouvent les raisons de fluctuations évoquées ci-dessus, les différents rongeurs mis à sa disposition tenant par ailleurs une place variable dans le cycle du parasite (hôte développant une larve stérile, hôte présentant une parasitose exhubérante rapidement mortelle, hôte de sensibilité intermédiaire) (24) (26) (19). Signalons enfin que l'âge de l'H.D. ne semble pas influencer sur sa prévalence (la recherche active de proie commençant à 4-5 s chez le renard roux - Vulpes fulva) - (25).

**Facteurs influençant la prévalence de l'hôte intermédiaire :** la densité importante d'H.D. augmente le contact des rongeurs par les embryophores. Cette contamination cependant est fortuite (souillure des végétaux) d'où une prévalence généralement supérieure chez les adultes soumis de façon prolongée au péril parasitaire (25). La fluctuation saisonnière de prévalence (soit synchrone de celle de l'H.D. comme aux USA, soit décalée d'un semestre comme en Alaska ou en Géorgie) s'explique par la non disponibilité des oeufs de cestode couverts par la neige et par le vieillissement de la population en fin d'hiver (les rongeurs plus jeunes n'ayant pu résister aux rigueurs climatiques) ce qui aura pour conséquence une augmentation brutale de la prévalence au printemps. Il faut signaler qu'au delà de la simple prévalence, une notion paraît bien plus importante sur le plan épidémiologique : c'est le taux d'infectivité des larves (présence de protoscolex). Cette infectivité connaît une forte augmentation lors de la période de reproduction à la sortie de l'hiver (23) (24) (26). La longévité du stade larvaire est identique à la durée de vie normale de l'H.I. (12 à 18 mois environ).

Un cycle domestique ou semi-domestique, épiphénomène du cycle sauvage, se réalise dans la plupart des foyers endémiques sous la forme de "microfoyers". Ceux-ci peu importants dans le maintien du parasite favorisent par contre sa dispersion (transport d'animaux) et augmentent notablement l'incidence de l'échinococcose alvéolaire humaine.

## II - CRITERES TAXONOMIQUES DANS LE GENRE ECHINOCOCCUS : INTERETS ET LIMITES

### 1. Critères morphologiques

Ils sont fondamentaux dans la discrimination taxonomique classique.

Pour les adultes sont pris en compte la forme du strobile (taille, nombre de segments, position du segment mûr) avec une attention particulière dans le rapport longueur de la portion antérieure sur longueur du segment grvide, la taille et la forme des crochets du rostre, le nombre et la distribution des testicules ainsi que la forme de l'appareil génital femelle et de l'utérus grvide. En ce qui concerne les crochets du stade strobilaire, il faut signaler l'absence de méthode standard de mesure dans la littérature et par conséquent l'impossibilité la plupart du temps de comparer entre eux les résultats (4) (5). De plus les crochets varient largement en nombre (et sur un même individu en taille et en forme) selon son âge et son hôte, d'où la nécessité d'identifier ces échinocoques à partir d'animaux infestés expérimentalement pour en connaître l'âge exact et de faire une étude statistique sur un grand nombre d'individus afin d'appréhender les variations intraspécifiques (11) (6) (4). VERSTER cité par RAUSCH (1972) accorde une grande valeur à la distribution des testicules dans le segment mûr (et non au nombre), constante pour chaque "race définie", non affectée par la nature de l'hôte ou par les générations successives du parasite. La structure de l'appareil génital femelle présente les mêmes garanties.

Le stade larvaire a lui aussi fait l'objet d'études morphologiques en particulier dans la taille et la forme des crochets des protoscolex. Le phénomène de croissance des crochets existe également mais s'arrête une fois le stade infectieux atteint (130 j pour E. oligarthrus). L'influence de l'hôte apparemment faible pour E. vogeli ou E. oligarthrus entraîne de grandes variations de taille des crochets pour E. granulosus et E. multilocularis (5).

### 2. Critères biologiques et physiologiques

Les Taeniidae (genre Taenia et Echinococcus) ont une spécificité d'hôte particulièrement étroite à l'état adulte impliquant des mammifères de genres apparentés ou même un genre unique, ce qui n'est absolument pas le cas pour le stade larvaire (plus de 50 H.I. appartenant à de nombreux ordres différents et éloignés sur le plan phylogénique pour E. granulosus) (9) (10). Les hôtes naturels définitifs représenteront donc a priori un élément taxonomique solide (E. oligarthrus chez les Felidés sud-américains, E. granulosus chez les Canidés...). Cependant il n'est pas toujours aisé de distinguer l'hôte naturel normal de celui qui est anormal, voire accidentel (développement, importance du nombre de cestodes) donc de définir les critères d'une relation hôte-parasite normale ("problème" du renard et du lion pour E. granulosus) (7) (11). La notion d'espèce d'hôte s'avère parfois insuffisante et il faut parler de race, de lignée génétique et avoir recours à l'étude expérimentale sur des animaux génétiquement stables, d'âge identique et de nourriture comparable pour cerner la morphologie d'un Echinocoque (1). La situation est encore plus complexe chez l'hôte intermédiaire où le développement larvaire est également influencé par l'espèce, la lignée génétique, l'âge, mais aussi la maturité sexuelle de l'hôte (2) (5) (15) (larves pseudomultiloculaires chez les bovins pour E. granulosus, prolifération exogène de la larve d'E. vogeli chez l'homme). Ainsi un même parasite sur une même espèce d'H.I. elle-même provenant de différentes régions géographiques ne donnera pas nécessairement de résultats comparables (1).

La culture in vitro est également un critère taxonomique intéressant puisqu'il a permis

de confirmer la distinction entre *E. granulosus* et *E. multilocularis* et entre *E.g.granulosus* et *E.g.equinus* (originaires de Grande Bretagne) d'autre part. En effet ces différences dans le développement des vers adultes à partir des protoscolex (croissance, segmentation, maturité sexuelle) indiquent vraisemblablement des besoins physiologiques ou nutritionnels distincts. (9) (14)

Les échinocoques sont hermaphrodites avec autofécondation possible (démontrée chez *E. granulosus* par SMYTH et SMYTH en 1969). Si une mutation ponctuelle concernant un caractère récessif apparaît, ce caractère présent dans certains gamètes males et femelles peut se retrouver à l'état homozygote dans quelques oncosphères. L'oncosphère homozygote mutante peut alors s'établir dans un nouvel hôte où, par le biais d'une reproduction asexuée massive, un clone d'un millier d'individus génétiquement identiques va être produit. Ainsi l'autofécondation et la reproduction asexuée sont deux caractéristiques qui permettent plus facilement l'expression d'une mutation récessive (qui autrement serait perdue) et qui rendent compte de l'apparition de nouvelles populations ou variants dans le genre *Echinococcus*. (9)

### 3. Critères géographiques

"Le processus de spéciation consiste en un développement de mécanismes d'isolement reproductif ; les espèces sont donc des groupes de population pour lesquels l'échange génétique entre eux est limité ou empêché naturellement par ces mécanismes d'isolement". (DOBZHANSKY - 1951 - cité par FLOCKART et coll. - 1982).

La répartition géographique d'un parasite peut donc être considérée comme un critère taxonomique dans la mesure où les populations sont ségréguées totalement sur le plan reproductif. Cette ségrégation peut être géographique ou écologique (hôtes différents) et dans ce dernier cas elle implique une relation proie-prédateur originale. Si cet isolement reproductif est absent, les sous-espèces ou variants définis peuvent se croiser entre eux avec comme résultat la perte de leurs particularités génétiques et les variations constatées entre les populations ne seraient pas significatives (1) (11) (12). C'est par ce raisonnement que RAUSCH (1967) a considéré comme non valide sur le plan taxonomique les sous-espèces d'*E. granulosus* décrites, car coexistant de manière sympatrique avec *E.g.granulosus* d'origine européenne. L'allopatrie (d'ailleurs discutable, voir I.4.2.) des populations d'*E. multilocularis* permettrait par contre l'appellation en sous-espèces mais les différences morphologiques sont extrêmement faibles. Il faut remarquer enfin, comme le signalent THOMSON et coll. (1982) (1) que les notions de sympatrie et d'allopatrie sont établies pour des organismes dioïques et non pour des organismes hermaphrodites doués d'autofécondation.

### 4. Critères immunologiques

L'étude de la structure antigénique d'*E. granulosus* a permis de mettre particulièrement en évidence deux fractions immunogènes et allergéniques : l'antigène 5 et l'antigène B par immunoélectrophorèse (I.E.P.). Cependant la morphologie de l'arc 5, variable d'un sérum à l'autre, n'est pas encore bien définie. L'I.E.P., en ce qui concerne *E. multilocularis* a permis d'analyser 5 systèmes précipitants (analyse d'activité enzymatique, thermostabilité, nature chimique des fractions précipitantes) sans pouvoir différencier les 3 souches d'*E. multilocularis* étudiées (Alaska, Suisse, France). Deux de ces systèmes sont comparés aux antigènes 5 et B. Seule l'image de l'arc B est comparable chez les deux espèces et de plus les caractéristiques physico-chimiques de ces précipitines ("5" et "B") sont nettement discordants entre les deux espèces (72).

La technique de l'I.E.P. bidimensionnelle réalisée pour les 3 souches d'*E. multilocularis* a permis de relever des différences quantitatives mais aussi qualitatives au niveau des pics de précipitation, ce qui laisse supposer une certaine hétérogénéité au sein de l'espèce (18).

La localisation des sites antigéniques sur les téguments des protoscolex ne semble pas identique chez *E. granulosus* et *E. multilocularis* lors d'immunofluorescence indirecte (I.F.I.) (avec étalement de scolex sur lame et sérums humains homologues), la fluorescence spécifique n'intéressant que la partie opposée à la zone d'évagination chez *E. multilocularis* alors qu'elle concerne la totalité des téguments chez *E. granulosus*. Par contre les larves des deux espèces présentent des degrés de réactivité antigénique voisins vis-à-vis des sérums homologues et hétérologues en I.F.I. (73).

En ce qui concerne l'hydatidose polykystique à *E. vogeli*, D'ALESSANDRO et coll. en 1979 réalisent sur des patients des diagnostics immunologiques à l'aide d'un antigène *E. multilocularis*; l'intradermoréaction et le test d'hémagglutination sont toujours positifs tandis que dans un cas seulement l'I.E.P. montre un arc assimilé à l'antigène 5 par les auteurs (8).

## 5. Critères biochimiques

Afin de compléter les données épidémiologiques et expérimentales en vue de distinguer les souches ovine et équine d'*E. granulosus* en Grande Bretagne, LEE et coll. (cité par SMYTH, 1977) réalisent une étude comparative portant sur la composition protéinique et l'activité estérasique non spécifique des fractions obtenus par la méthode électrophorétique de focalisation isoélectrique (F.I.E.) sur homogénéisat de protoscolex. Le profil protéinique obtenu est caractéristique de chacune des souches et se distingue également de celui d'*E. multilocularis*. Les différences concernant les estérases ne sont que quantitatives (9). D'autres distinctions sont révélées entre ces trois parasites dans leur composition chimique (taux de DNA, de RNA, protéines, lipides et polysaccharides) et leur métabolisme des hydrates de carbone (mesure des consommations en O<sub>2</sub>, glycogène endogène; mesure des productions : lactate, succinate...) (74). L'étude du polymorphisme enzymatique dans le genre *Echinococcus* est réalisée de manière systématique pour la première fois en 1979 sur les souches ovine et équine de Grande Bretagne par F.I.E. (étude électrophorétique de 10 systèmes enzymatiques). Les profils enzymatiques pour 9 de ces 10 systèmes permettent une distinction nette entre les 2 souches et "vis-à-vis" d'*E. multilocularis*. Par contre l'absence totale de variabilité à l'intérieur de chacune des souches laisse supposer un isolement reproductif total et une tendance à la "consanguinité" (reproduction en milieu très fermé). La capacité d'autofécondation de ce parasite hermaphrodite explique vraisemblablement une réduction de la variabilité génétique intra-souche et un accroissement de cette variabilité entre les souches (75). MAC PHERSON et coll. en 1982 reprennent cette technique pour étudier les hydatides isolés de l'homme, des ovins, des caprins et des camelins au Kenya sur la base de deux systèmes enzymatiques (P.G.I., P.G.M.). Deux souches sont mises en évidence, là encore monomorphes pour leurs profils enzymatiques (absence de variabilité intra-souche) : la première affectant l'homme et le mouton, la seconde le chameau; la chèvre présentant tantôt l'un tantôt l'autre. La similarité du profil enzymatique chez la larve et l'adulte homologue (P.G.I. et P.G.M.) a permis en outre de déterminer l'origine de l'infestation naturelle de 26 chiens (76). Enfin une étude de 16 systèmes enzymatiques (intervenant dans le métabolisme des hydrates de carbone) sur une souche d'*E. multilocularis* française par électrophorèse sur agarose laisse supposer une composition enzymatique se modifiant en fonction de l'âge (larve mature/ larve immature) (77). Ainsi, mis à part quelques travaux préliminaires, l'étude

électrophorétique du polymorphisme enzymatique comme facteur discriminatoire n'a porté que sur Echinococcus granulosus.

L'espèce Echinococcus multilocularis a une répartition géographique très large et très hétérogène, ce qui laisse supposer l'existence de plusieurs groupes allopatriques. Par ailleurs les différentes populations offrent des caractéristiques tendant à les particulariser :

- caractéristiques morphologiques et biométriques du stade strobilaire pour les souches Alaska, Souabe (RFA) et Sibérie.
- caractéristiques biologiques du stade strobilaire chez le chien (période prépatente de 28 j pour les souches européennes, de 30 à 35 j pour les souches nord-américaines).
- caractéristiques biologiques du stade larvaire chez un même hôte intermédiaire (degré de pathogénicité et localisation des kystes différents entre les souches Alaska et européenne)
- caractéristiques immunologiques du stade larvaire pour les souches Alaska, France et Suisse par immunoélectrophorèse bidimensionnelle.

## DEUXIEME PARTIE : ETUDE PRELIMINAIRE DU POLYMORPHISME ENZYMATIQUE CHEZ ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS

### I - Matériel et méthodes

#### 1. Obtention des parasites

L'étude isoenzymatique d'E. multilocularis a porté sur huit souches représentant 6 régions géographiques différentes au niveau mondial. Deux foyers seulement sont représentés par deux échantillons distincts. La faible prévalence de la parasitose observée chez les hôtes intermédiaires naturels ainsi que les contraintes techniques pour conserver ces souches au laboratoire expliquent le petit nombre des échantillons étudiés :

- **Souche ALA<sub>1</sub>** : Souche originaire d'Alaska, maintenue au Japon sur le rat du coton (Sigmodon hispidus) puis maintenue à Créteil à partir du 1er septembre 1983 sur un mériion (Meriones unguiculatus) - 3 passages sur mériion -

Une partie de ce matériel a été repiqué sur un mériion shawi (Meriones shawi) après deux passages sur le mériion "classique" (M. unguiculatus). C'est la seule souche étudiée dans ce travail à provenir de cet hôte.

- **Souche ALA<sub>2</sub>** : originaire d'Alaska, maintenue au Canada sur le rat du coton puis sur le mériion à Créteil à partir d'août 1982.
- **Souche MON<sub>1</sub>** : originaire du Montana (E.U) à partir d'un renard roux (Vulpes fulva) puis passée sur rat musqué (Ondatra zibethica) et rat du coton, arrivée à Créteil en août 1982 pour être maintenue sur mériion - 1 passage sur mériion -.

Remarque : Souche MON<sub>2</sub> : originaire du Montana à partir d'un renard roux, cette souche n'a donné qu'une très faible masse vésiculaire au premier passage sur mériion à Créteil et ce matériel, dans sa totalité a servi au repiquage.

- **Souche JAP** : originaire du Japon à partir d'un rongeur (Clethrionomys), maintenue sur rat du coton puis arrivée à Créteil en septembre 1983 pour être passée sur le mériion - 2 passages sur mériion -.
- **Souche DAN** : originaire du Danube (RFA) à partir d'un rat musqué, envoyée directement à Créteil en avril 1984 puis passage sur mériion - 1 passage -.
- **Souche SUI** : isolée d'un foie humain en Suisse, arrivée à Créteil le 27 février 1981 et maintenue sur mériion (5 passages) après un premier repiquage sur le campagnol terrestre (Arvicola terrestris)
- **Souche JUR<sub>1</sub>** : originaire du Jura à partir d'un campagnol terrestre le 25 septembre 1980, maintenue sur mériion.
- **Souche JUR<sub>2</sub>** : originaire du Jura à partir d'un campagnol terrestre le 22 novembre 1979, maintenue sur mériion.

Au total 8 souches sont disponibles ALA<sub>1</sub> (+ ALA'1), ALA<sub>2</sub>, MON<sub>1</sub>, JAP, DAN, SUI, JUR<sub>1</sub> et JUR<sub>2</sub>.

## 2. Préparation des parasites

Les kystes sont prélevés lors de l'autopsie du mérion : la masse parasitaire volumineuse envahit la cavité abdominale et enserre la quasi totalité des organes qui s'y trouvent. La dissection de la larve, phase délicate car l'intrication avec les tissus de l'hôte est importante, est suivie de son rinçage à l'eau physiologique. Trois types de préparation ont été essayés.

**Préparation 1 :** utilisation immédiate ou après stockage à  $-20^{\circ}\text{C}$  : un petit cube de kyste de 0,3 mm de côté est broyé dans une cupule, le produit étant dilué dans 4 gouttes d'un liquide de broyage\*.

**Préparation 2 :** les kystes frais sont broyés en eau salée à 1 o/oo au Warning-blender plusieurs fois pendant quelques secondes. Le produit est mis au congélateur dans un mortier pendant 12 h puis est décongelé et broyé au mortier glace. Le broyat est centrifugé pendant 1 h 1/2 à 8.500 t/mn à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le surnageant est récupéré et mis à dialyser pendant 12 h au moins (obtention d'un extrait pâteux) contre une solution à 50-60% de subtosan-P.V.P. dans du tampon véronal salé à pH 8,2. L'extrait sec est repris dans une solution salée à 1 o/oo afin d'obtenir une concentration 60 fois supérieure à celle du départ. Le produit est stocké en tubes dans l'azote liquide

**Préparation 3 :** Pour 35 g de kystes frais on rajoute 33 cc d'une solution stabilisante d'enzymes (11 cc d'EDTA 2 mM + 11 cc de DTT 2 mM + 11 cc d'acide caproïque 2 mM). L'ensemble est broyé au Turax dans la glace 3 fois 10 " puis soumis aux ultrasons en milieu liquide pendant 30 minutes. Le produit est agité à  $+4^{\circ}\text{C}$  toute la nuit et centrifugé le lendemain à  $+4^{\circ}\text{C}$ , pendant 45 minutes à 15.000 t/mn. Le surnageant est récupéré, filtré et stocké en azote liquide.

Les échantillons MON<sub>1</sub>, JAP, DAN, SUI, ALA<sub>1</sub> et ALA'1 sont préparés selon la technique 1 ; ALA<sub>2</sub>, JUR<sub>1</sub> et JUR<sub>2</sub> selon la technique 2 ; ALA<sub>1</sub> selon la technique 3.

---

\* Composition du liquide de broyage : 1,2 g TRIS + 0,37 g EDTA + 1 l eau distillée (ajustement du pH à 6,8 avec HCl concentré) + 40 mg NADP.

### 3. Electrophorèse

#### 3.1 - Principe

L'électrophorèse est une méthode d'étude de la structure chimique d'un corps (ici une enzyme) en mesurant sa vitesse de migration dans un milieu support (ici l'amidon) entre les extrémités duquel on a établi une différence de potentiel. L'enzyme est ensuite révélée à la fois par une réaction spécifique faisant appel à son substrat et par une technique de coloration. La vitesse de migration de l'enzyme dépend de la taille de la molécule, de sa forme et surtout de sa charge électrique globale, résultante de la charge électrique individuelle des différents acides aminés qui constituent la structure primaire de l'enzyme. La colinéarité des séquences acide aminé-ADN implique que deux enzymes à même fonction mais différant par leur vitesse de migration électrophorétique (= isoenzymes) sont codées par des séquences d'ADN différant par au moins une paire de bases. Ainsi le procédé électrophorétique donne des renseignements indirects (phénotype) assez précis du génome lui-même. Cependant dans quelques cas un changement dans la structure tertiaire ou quaternaire de la molécule peut être à l'origine d'isoenzymes sans que le génome soit directement en cause. Par ailleurs, SHAW 1970 (cité par TIBAYRENC 1979) estime que l'électrophorèse iso enzymatique ne détecte que 30% des changements d'acides aminés.

#### 3.2 - Préparation du gel

Deux types de gel ont été utilisés : amidon en gel mince (1 mm d'épaisseur), amidon en gel épais (1 cm d'épaisseur).

**Amidon en gel mince** : on prépare une solution à 10% d'amidon : 20 g dans 200 ml de tampon dilué au 1/10 ou 1/5 selon le système enzymatique étudié. Le mélange dissous est chauffé directement à la flamme en agitant fortement le ballon de manière continue jusqu'à obtenir une solution visqueuse présentant une très légère ébullition. La cuisson est stoppée et la solution est dégazée totalement à l'aide d'une pompe à vide. Le gel est coulé à une extrémité du moule sur sa largeur puis étalé dans celui-ci à l'aide d'une règle en plastique. Il est alors recouvert d'un bac protecteur pendant environ 10 mn à la température ambiante puis recouvert par une autre plaque de verre montée sur des règles de 3 mm d'épaisseur, et placé à 4°C pour être utilisé le lendemain.

**Amidon en gel épais** : la technique est la même avec un gel à 12% d'amidon (48 g pour 400 ml de tampon dilué). Celui-ci est simplement coulé dans le moule et recouvert après sa prise en masse d'une feuille de cellophane.

#### 3.3 - Electrophorèse proprement dite

**Amidon en gel mince** : à 7 cm du bord du gel on applique un peigne en aluminium à 8 dents. Dans chacune des 8 fentes formées on dépose un brin de fil de coton à crocheter, de même dimension, préalablement imprégné (puis essoré) d'extrait parasitaire. Le gel dans son moule en verre est alors posé sur la platine réfrigérante, un pont en "chamex" est réalisé à chaque extrémité entre les cuves et le gel (sur 2 cm environ). Une plaque de verre est posée en travers du gel directement à son contact et une autre superposant exactement le moule et maintenant les deux portions de "chamex" au contact du gel. Le courant est alors établi et à l'issue de la migration, le gel avec son moule est soumis à la révélation enzymatique. Pour cela un cadre en plastique de même dimension que le moule est posé sur lui permettant ainsi le maintien contre le gel de la solution de coloration. La fixation à l'acide acétique à 10% pendant 15 ' intervient après le temps de coloration. Puis le gel est rincé

à l'eau distillée. Après révélation et lecture, le gel est dégagé délicatement de son moule et conservé à + 4°C en enveloppe plastique.

**Amidon en gel épais :** à 6 cm du bord du gel on applique un peigne en aluminium à 24 dents. De petits rectangles de papier Whatman No 3 imbibés d'extrait sont insérés dans les fentes. Une goutte de Bleu de Bromophénol déposée dans chacune des fentes visualise le front de migration permettant ainsi de contrôler celle-ci et de vérifier l'homogénéité du gel. Le gel est recouvert de son film de cellophane et une grande plaque de verre maintient les ponts en "chamex". La migration s'effectue à 4°C et un bac de glace pilée est placé sur la plaque de verre. Le gel est retiré à l'issue de la migration, découpé en 5 tranches de 2 mm d'épaisseur, la tranche supérieure étant éliminée, les 4 autres servant aux colorations histochimiques (MAAZOUN, 1982).

### 3.4 - Liste des systèmes enzymatiques étudiés

Sur 14 systèmes enzymatiques éprouvés 9 d'entre eux se révèlent interprétables. Il sont présentés dans le tableau suivant.

## II - Résultats

D'une manière générale il a été noté la grande difficulté rencontrée dans la technique électrophorétique sur gel mince, tandis que l'emploi du gel épais et des techniques qui lui sont associées ayant déjà été largement utilisées sur des protozoaires et des helminthes (MAAZOUN, 1982; RENAUD et coll., 1983) donne des résultats encourageants pour Echinococcus multilocularis.

L'emploi des 3 types de préparation d'extrait parasitaire a donné des résultats comparables pour les zymogrammes étudiés, la seule précaution résidant dans l'obtention d'un extrait suffisamment dilué afin d'éviter l'apparition de trainées sur le gel par suite d'une présence trop importante de lipides.

Cinq systèmes enzymatiques n'ont, dans ce travail, donné aucun résultat interprétable : il s'agit de la Phosphoglucose mutase (PGM) présentant néanmoins deux loci, de l'Hydroxybutyrate déshydrogénase (HBDH) présentant 1 locus à très faible activité et enfin de l'Enzyme malique (E.M.), l'Aspartate-amino-transférase (AAT) et la Glutamate désaminase (GDA) qui ne sont pas révélées aux tampons utilisés.

Les zymogrammes obtenus avec les neuf autres systèmes enzymatiques sont présentés sur les figures - 1 -, - 2 - et - 3 -.

**Système 6 PGDH :** un seul locus se révèle et tous les échantillons sont homozygotes pour l'allèle présent. Cependant ALA<sub>2</sub> ne révèle pas d'activité enzymatique.

**Système M.P.I. :** deux loci monomorphes sont présents MPI<sub>1</sub> et MPI<sub>2</sub>. L'échantillon ALA<sub>2</sub> ne révèle aucun des deux loci tandis que JAP ne révèle que le locus rapide MPI<sub>2</sub>.

**Système M.D.H. :** 3 loci sont présents mais seuls deux loci sont interprétables : MDH<sub>1</sub> et MDH<sub>2</sub>. MDH<sub>1</sub> semble être un locus monomorphe présent sur tous les échantillons sauf JAP. MDH<sub>2</sub> semble présenter deux allèles : un allèle rapide sur tous les extraits sauf ALA<sub>1</sub> qui présente l'allèle lent, aucun hétérozygote n'est présent. ALA<sub>2</sub> ne révèle pas le locus MDH<sub>2</sub>.

**Système PGI :** deux loci sont révélés. PGI<sub>2</sub> est monomorphe et révélé pour tous les échantillons. PGI<sub>1</sub> présente 2 allèles : un allèle rapide sur tous les extraits sauf ALA<sub>1</sub> qui présente un allèle lent. ALA<sub>2</sub> ne révèle pas PGI<sub>1</sub> et il n'y a aucun hétérozygote à ce locus.

**Système LDH :** quatre loci monomorphes sont révélés. JAP et ALA<sub>2</sub> ne révèlent que LDH<sub>1</sub>. MON<sub>1</sub> et DAN ne révèlent que LDH<sub>1</sub>, 2 et 3 tandis que les autres révèlent les 4 loci.

|                                                    | Gel mince                                                                            |                               | Gel épais      |                               |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------|-------------------------------|
|                                                    | Tampons                                                                              | Constantes<br>de<br>migration | Tampons        | Constantes<br>de<br>migration |
| Phosphoglucose<br>isomérase PGI                    | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>pH: 6,1 8,1 | 300V/10-30<br>mA<br>3h - 3h30 | TCE 9,4<br>TME | 80V/50mA<br>80V/80mA<br>5h    |
| Malate<br>déshydrogénase MDH                       | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>ac.critique<br>pH: 6,2 7,0                       | 300V/30mA<br>3h30             | TCE 9,4        | 80V/80mA<br>5h                |
| Isocitrate<br>déshydrogénase ICD                   | id.                                                                                  | id.                           | TME 7,4        | 80V/80mA<br>5h                |
| Glucose 6-phosphate<br>déshydrogénase G6PDH        | -                                                                                    | -                             | id.            | id.                           |
| Acide 6 Phosphogluconique<br>déshydrogénase 6 PGDH | -                                                                                    | -                             | id.            | id.                           |
| Adénylate kinase AK                                | -                                                                                    | -                             | id.            | id.                           |
| Purine nucléotide<br>phosphorylase NP              | -                                                                                    | -                             | TC 8,0         | id.                           |
| Mannose phosphate<br>isomérase MPI                 | -                                                                                    | -                             | id.            | id.                           |
| Lactate déshydrogénase<br>LDH                      | -                                                                                    | -                             | -              | -                             |

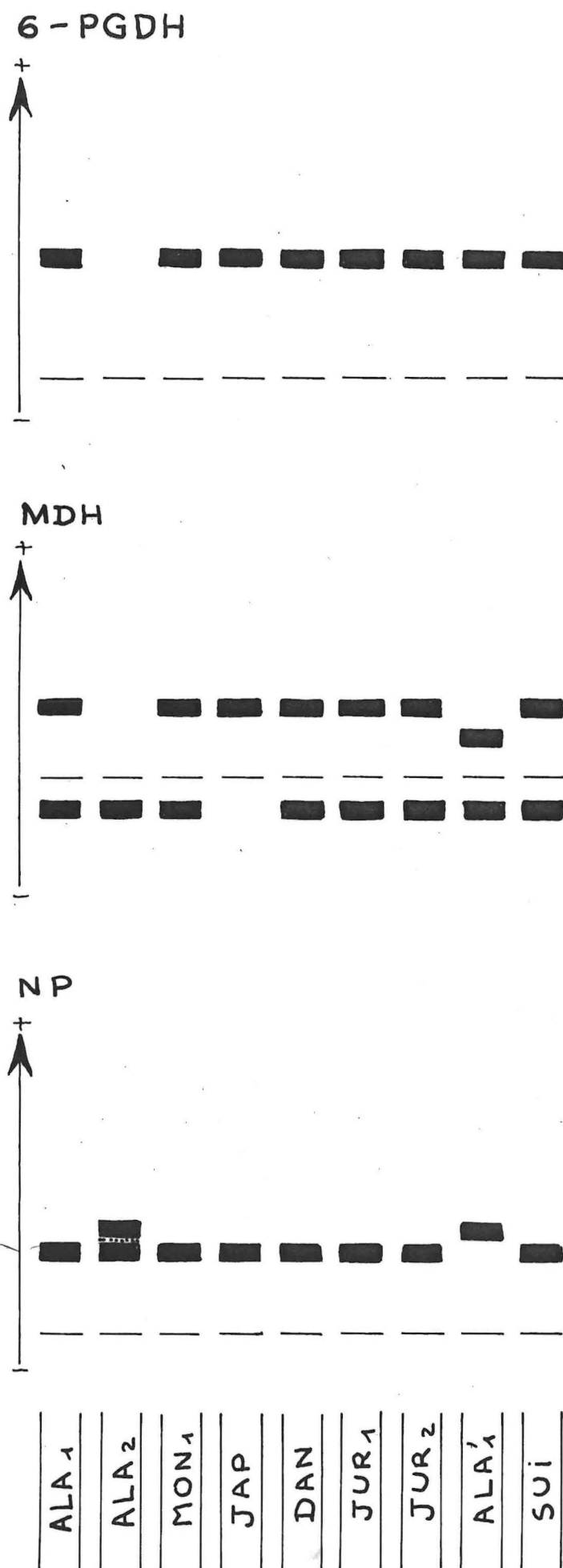


FIGURE 1

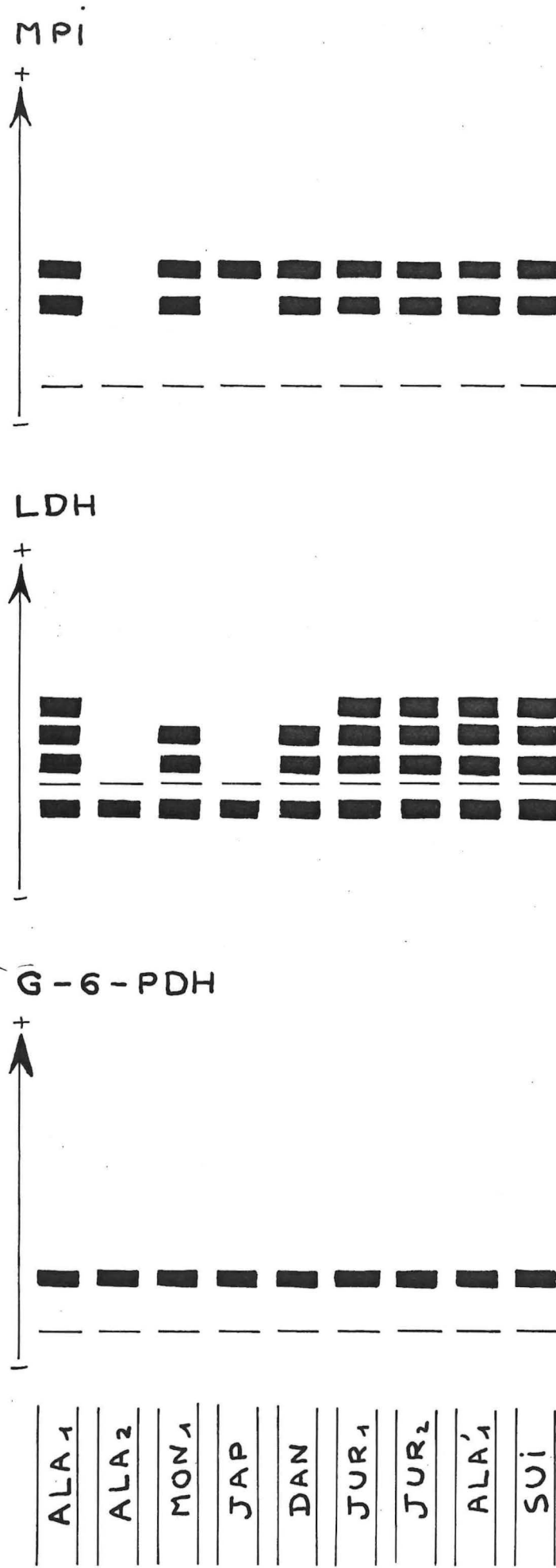


FIGURE 2

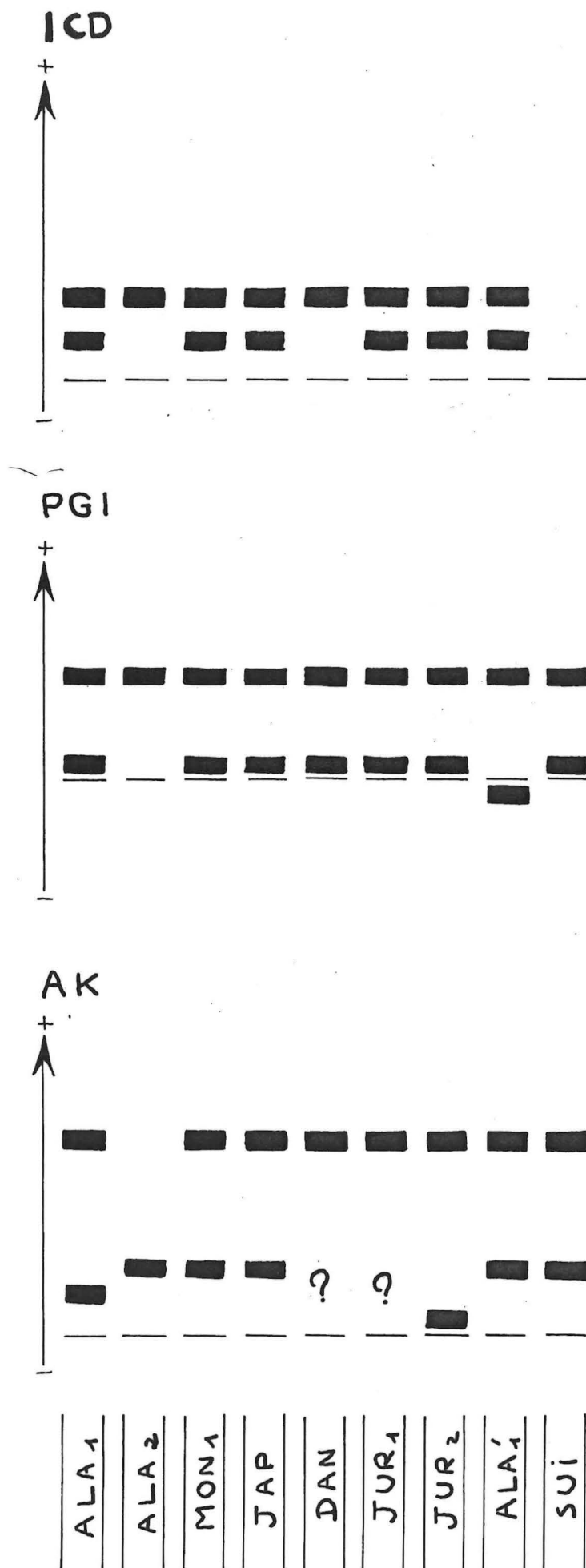


FIGURE 3

**Système ICD :** deux loci semblent présents. ICD<sub>1</sub> est monomorphe et ne se révèle pas sur ALA<sub>2</sub> et DAN. ICD<sub>2</sub> est monomorphe et présent sur tous les échantillons. Cependant SUI ne révèle aucune activité enzymatique.

**Système AK :** deux loci sont révélés. AK<sub>2</sub> est monomorphe et non révélé sur ALA<sub>2</sub>. Le locus AK<sub>1</sub> semble polymorphe à 3 allèles : un allèle lent sur JUR<sub>2</sub> un allèle intermédiaire sur ALA<sub>1</sub> et un allèle rapide pour les autres extrait sauf DAN et JUR<sub>1</sub> qui ne sont pas interprétables à ce locus pour les électrophorèses réalisées.

Deux extraits utilisés sont identiques mais proviennent d'hôtes expérimentaux différents. Il s'agit d'ALA<sub>1</sub> élevé sur Meriones unguiculatus et d'ALA'<sub>1</sub> élevé sur Meriones shawi. Tous les autres extraits proviennent de M. unguiculatus. Pour trois loci, MDH<sub>2</sub>, PGI<sub>1</sub> et NP, ALA'<sub>1</sub> présente un allèle différent de ALA<sub>1</sub> tandis que les autres extraits possèdent le même allèle que ALA<sub>1</sub>. Il pourrait donc s'agir pour ces trois loci d'une expression tissulaire de l'hôte.

Sur gel mince trois systèmes enzymatiques éprouvés se révèlent. Il s'agit de M.D.H., P.G.I. et ICD. Globalement les résultats concordent avec les zymogrammes obtenus en gel épais pour les souches utilisées (JUR<sub>1</sub>, JUR<sub>2</sub>, ALA<sub>1</sub> et ALA<sub>2</sub>) : 3 loci pour MDH, 2 pour PGI et ICD. Cependant il est à noter que PGI<sub>1</sub> ne se révèle ni pour ALA<sub>2</sub> (comme en gel épais) ni pour ALA<sub>2</sub> et que pour MDH les électromorphes obtenus sont beaucoup plus nombreux qu'en gel mince. De plus les paramètres électriques utilisés entraînent une très forte migration anodique et cathodique qui, sur un gel imparfaitement homogène, peut être responsable de distorsion dans les électromorphes.

### III - Discussion

Ce travail préliminaire ayant pour but d'approcher le polymorphisme enzymatique d'E. multilocularis, l'obtention des zymogrammes pour les neuf systèmes enzymatiques étudiés ne peut en aucun cas conduire à une quelconque interprétation génétique. Plusieurs questions se posent, en effet, avant de continuer cette investigation :

- la valeur du kyste d'E. multilocularis : l'infestation naturelle de l'H.J. se produit par ingestion d'un ou de plusieurs embryophores. La croissance invasive quasi maligne de la larve aboutit à un conglomérat de vésicules dans laquelle il est vain de chercher à individualiser les différents clones, contrairement au kyste à E. granulosus toujours individualisé par sa cuticule externe. Il en est de même lors du maintien expérimental du parasite au laboratoire par inoculation intrapéritonéale d'un broyat vésiculaire. De plus dans ce cas il se produit vraisemblablement lors du "repiquage" en série une perte d'informations au sens génétique par l'élimination de certains individus à l'occasion des passages dans les différents milieux hôtes (rat musqué, rat du coton, mérion...) avec un mode d'infestation expérimental (très différent du développement habituel à partir de l'embryophore). Ainsi nous avons pour un extrait parasitaire un ou plusieurs individus et de surcroît non représentatifs des parasites dans leurs hôtes naturels. Le travail sur le cestode adulte garantit bien évidemment le caractère individuel du parasite mais, outre les risques considérables liés à la manipulation de ce matériel pour l'homme impliquant des précautions lourdes et coûteuses pour une telle étude, le format d'Echinococcus multilocularis (1,1 mm à 3,7 mm) suppose la mise au point d'une micro-technique électrophorétique.
- la nature du kyste parasitaire : un kyste d'Echinocoque est constitué de 3 éléments

: les membranes externe et interne, les protoscolex et le liquide vésiculaire dans lequel baignent les deux constituants précédents. Ce mélange tissulaire complexe rend délicat la lecture des zymogrammes car l'on ignore quel(s) tissu(s) est (sont) responsable(s) des loci s'exprimant lors de l'électrophorèse. La solution réside peut-être en la séparation chimique des protoscolex du reste de la larve par la pepsine de Hanks (MC MANUS et SMYTH 1979), ce qui permet de travailler sur un matériel homogène et stable.

- la relation du kyste parasitaire avec son hôte : chez l'hôte naturel la larve se développe soit dans le foie (inoculation intrahépatique) soit dans la cavité abdominale soit en d'autres lieux selon les métastases produites. A des degrés divers, le contact avec les tissus de l'hôte implique une contamination extrinsèque du parasite sans que l'on puisse la définir ou la quantifier. Probablement mineure dans le cas de kystes péritonéaux (voire sous-cutanés, DURIEZ-VAUCELLE et coll. 1983) cette contamination reste à élucider par l'adjonction pour chaque préparation parasitaire d'un extrait tissulaire individuel de l'hôte (foie par exemple). Par ailleurs, pour une même souche parasitaire donnée il pourrait être envisagé une quantification de l'effet hôte sur le zymogramme en fonction de la localisation des kystes d'E. multilocularis.
- le nombre peu important d'échantillons : dans ce travail nous disposons de 8 souches distinctes : 2 originaires d'Alaska, 2 du Jura, 1 de Suisse, 1 d'Allemagne fédérale, 1 du Japon et 1 du Montana. Le manque relatif de matériel s'explique par la faible prévalence générale du stade larvaire chez l'hôte (et donc la difficulté de recueillir en milieu naturel des rongeurs parasités) ainsi que par le matériel nécessaire au maintien de la souche en laboratoire. Dans ces conditions il apparaît évident qu'il est impossible de caractériser une population à partir de 1 ou 2 échantillons et a fortiori de comparer ces populations entre elles. Il est donc nécessaire dans un premier temps de limiter cette étude à une population sympatrique donnée en essayant de recueillir le maximum d'échantillons possible (environ une trentaine). La caractérisation de chacune des populations pourra dans un second temps donner lieu à une comparaison.
- l'interprétation des zymogrammes : Dans le cadre des restrictions émises précédemment (possibilité d'avoir plusieurs individus au sein d'une masse parasitaire, contamination par les enzymes de l'hôte, complexe tissulaire du kyste formé d'au moins deux éléments) il apparaît cependant pour les échantillons une grande homogénéité dans les zymogrammes obtenus. En effet pour 4 systèmes enzymatiques G 6 PDH, 6 PGDH, MPI et LDH, les zymographes pour les 8 souches sont identiques (certains loci ne sont pas révélés : échantillons à mettre en cause ou existence d'allèles nulles ?). Pour les cinq autres systèmes : MDH, PGI, NP, ICD et AK, certains loci semblent polymorphes (avec l'existence de 3 allèles pour AK<sub>1</sub> par exemple, de deux allèles pour NP, MDH 2 et PGI<sub>1</sub>) et laissent supposer une certaine hétérogénéité au sein des diverses populations d'E. multilocularis. Ce point essentiel demande une investigation sur d'autres échantillons de ces mêmes populations. En tout état de cause, la nature des isoenzymes révélées et en particulier leur commande génétique ou non (isoenzymes multigéniques ou unigéniques selon OGITA 1968 cité par TIBAYRENC 1979) doivent être explorées.

## CONCLUSION - PERSPECTIVES D'AVENIR

L'étude préliminaire du polymorphisme enzymatique chez Echinococcus multilocularis a permis de mettre en évidence quelques points encourageants :

- la technique électrophorétique en gel épais d'amidon, largement utilisée par ailleurs, donne de bons résultats pour les systèmes enzymatiques suivants : PGI, MDH, ICD, G 6 PDH, 6 PGDH, AK, NP, MPI et LDH. La technique en gel mince, plus délicate, nécessite encore une mise au point en ce qui concerne le coulage du gel et les paramètres électriques afin d'éviter les phénomènes de distorsion rendant les zymogrammes difficilement interprétables; néanmoins MDH, GPI et ICD sont révélés par cette technique.
- la collecte de nombreux échantillons au sein d'une même population dans le milieu naturel paraît indispensable en associant l'étude électrophorétique sur les deux stades du parasite.
- la préparation du stade larvaire des parasites devrait inclure au préalable un isolement des protoscolex, seul matériel retenu pour l'électrophorèse. De plus pour chaque échantillon l'association avec un extrait hépatique de l'hôte permettrait d'appréhender l'importance de la contamination enzymatique.

## **ANNEXES**

TABLEAU A : Caractéristiques morphologiques des quatre espèces d'Echinococcus

| Source :<br>RAUSCH<br>BERSTEIN<br>1972 | Taille du<br>strobile<br>(mm) | Nombre de<br>segments<br>du<br>strobile | Longueur portion<br>antérieure<br>Longueur segment<br>gravidé | Position du pore<br>génital                       | Longueur des crochets<br>(mm)<br>petits<br>crochets | longs<br>crochet      | Nombre de<br>testicules | Distribution<br>des testicu-<br>les/pore gé-<br>nital du S.M | Forme de<br>l'utérus<br>gravidé |
|----------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| <i>E. granulosus</i>                   | 2-7                           | 3-4<br>(rarement<br>5-6)                | $\frac{1}{0,86}$ à $\frac{1}{1,3}$                            | dans la<br>moitié<br>postérieure { S.M.<br>S.G. } | 0,0288<br>à<br>0,034                                | 0,0375<br>à<br>0,0421 | 32-68                   | égale ou<br>antérieure                                       | ramifié                         |
| <i>E. oligarthrus</i>                  | 2,2-2,9                       | 3                                       | $\frac{1}{0,96}$ à $\frac{1}{1,1}$                            | 1/2 antér.<br>au milieu S.M.<br>S.G.              | 0,028<br>à<br>0,045                                 | 0,043<br>à<br>0,060   | 15-46                   | nettement<br>postérieure                                     | sacci-<br>forme                 |
| <i>E. multilocularis</i>               | 1,2-3,7                       | 2-5<br>(rarement<br>6)                  | $\frac{1}{0,31}$ à $\frac{1}{0,8}$                            | dans la<br>moitié<br>antérieure { S.M.<br>S.G. }  | 0,0204<br>à<br>0,026                                | 0,0249<br>à<br>0,0328 | 16-35                   | très<br>nettement<br>postérieure                             | sacci-<br>forme                 |
| <i>E. vogeli</i>                       | 3,9-5,6                       | 3                                       | $\frac{1}{1,9}$ à $\frac{1}{3}$                               | dans la<br>moitié<br>postérieure { S.M.<br>S.G. } | 0,030<br>à<br>0,047                                 | 0,049<br>à<br>0,057   | 50-67                   | antérieure                                                   | tubulaire                       |

(S.M = segment mûr ; S.G. = segment gravidé)

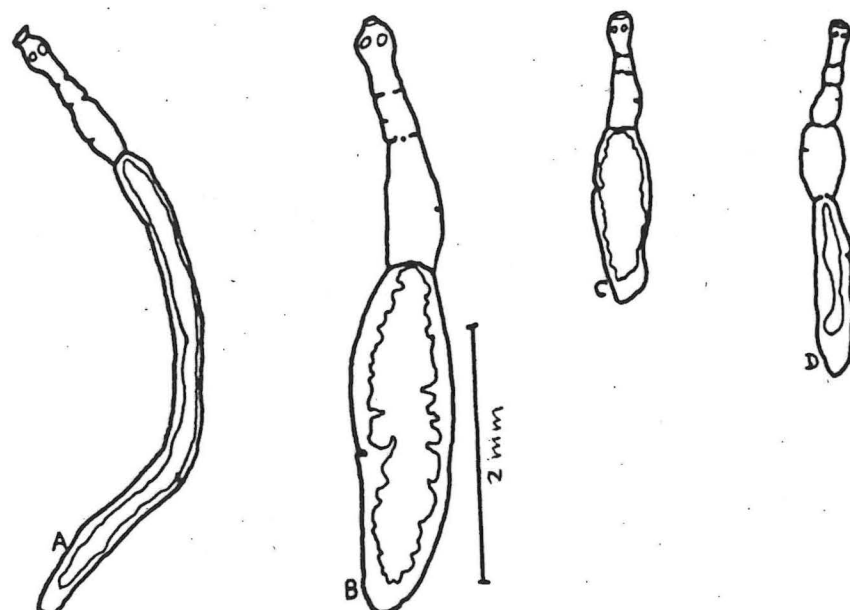


Fig. 1. Les espèces du genre Echinococcus (strobiles)

- A - *E. vogeli*
- B - *E. granulosus*
- C - *E. oligarthrus*
- D - *E. multilocularis*

TABLEAU B : Critères morphologiques distinctifs des sous-  
espèces d'*Echinococcus granulosus*

| Source<br>EUZEBY 1971        | <i>E.g.granulosus</i>           | <i>E.g.equinus</i>                                                          | <i>E.g.canadensis</i>                                      | <i>E.g.borealis</i> |
|------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------|
| Nombre de segments           | 3-5                             | -                                                                           | 2                                                          | 3                   |
| Segment mûr                  | 1                               | 1                                                                           | 1                                                          | 1                   |
| Longueur                     | —                               | —                                                                           | —                                                          | —                   |
| Segment gravidé              | 2                               | 3                                                                           | 4                                                          | 3                   |
| Nombre de testicules         | 40-70                           | 32-42                                                                       | 20-40                                                      | 35-55               |
| Localisation du pore génital | moitié postérieure des segments | -                                                                           | moitié antérieure des segments                             | moitié des segments |
| Particularités               | -                               | - poche et canal du cirre<br>- manche des crochets<br>- taille des crochets | - 3ème rangée de crochets (incomplète)<br>- poche du cirre | - poche du cirre    |

TABLEAU C : Critères morphologiques distinctifs des souches d'Echinococcus multilocularis

| Sources<br>RAUSCH 1963<br>VOGEL 1957 | Longueur du<br>strobile<br>(mm) | Nombre de<br>segments | Position du<br>pore<br>génital                                      | Nombre de<br>testicules | Distribution<br>des testicules           | Longueur des crochets<br>(mm) |                       |
|--------------------------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
|                                      |                                 |                       |                                                                     |                         |                                          | petits                        | grands                |
| Souche Alaska<br>(Ile St Laurent)    | 1,2 à 3,7                       | 2 parfois<br>3 ou 4   | dans la { SM<br>moitié { SG<br>antérieure                           | 17 - 26                 | Postérieure à<br>la moitié du<br>segment | 0,019<br>à<br>0,026           | 0,023<br>à<br>0,029   |
| Souche Souabe<br>(Allemagne)         | 1,1 à 2,7                       | 3 parfois<br>4 à 5    | id.                                                                 | 15 - 31                 | antérieur au<br>pore génital             | 0,0227<br>à<br>0,031          | 0,0276<br>à<br>0,0343 |
| Souche Sibérie<br>(URSS)             | 1,2 à 2,2                       | 2 à 4                 | dans la moitié<br>postérieure<br>pour la moitié<br>des SM sinon id. | 16 - 24                 | -                                        | 0,027<br>à<br>0,029           | 0,030<br>à<br>0,034   |

TABLEAU D : Hôtes intermédiaires naturels d'E.multilocularis

| Mammifères hôtes                     | Régions ou pays                                             | Sources bibliographiques |
|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------|
| ORDRE DES RONGEURS                   |                                                             |                          |
| - famille des <u>Muridae</u> :       |                                                             |                          |
| + sous-famille des <u>Microtinae</u> |                                                             |                          |
| * <u>Microtus</u>                    |                                                             |                          |
| M. <u>nivalis</u>                    | Bulgarie                                                    | 38                       |
| M. <u>socialis</u>                   | Georgie : URSS, Turquie                                     | 26, 2                    |
| M. <u>arvalis</u>                    | RFA, URSS                                                   | 42, 59, 62, 2            |
| M. <u>pennsylvanicus</u>             | Saskatchewan : Canada,<br>Iowa et Nord Dakota : EU          | 40, 48, 26               |
| M. <u>oeconomus</u>                  | Alaska, URSS                                                | 2, 59, 22                |
| M. <u>gueutheri</u>                  | Turquie, URSS                                               | 2                        |
| M. <u>gregalis</u>                   | URSS                                                        | 2                        |
| M. <u>hyperboreus</u>                | Sibérie : URSS                                              | 2                        |
| * <u>Clethrionomys</u>               |                                                             |                          |
| C. <u>rufocanus</u>                  | Japon                                                       | 44                       |
| C. <u>rutilus</u>                    | Japon, Alaska, URSS                                         | 59, 22, 44, 2            |
| C. <u>glareolus</u>                  | RFA, péninsule finno-scandinave                             | 63, 2                    |
| C. <u>sikotanensis</u>               | Japon                                                       | 2                        |
| * <u>Arvicola</u>                    |                                                             |                          |
| A. <u>terrestris</u>                 | France, URSS                                                | 2, 42, 52                |
| * <u>Ondatra</u>                     |                                                             |                          |
| O. <u>zibethica</u>                  | Kazakstan : URSS,<br>Montana : EU, RFA                      | 26, 60, 37               |
| * <u>Lemmus</u>                      |                                                             |                          |
| L. <u>lemmus</u>                     | Norvège                                                     | 2                        |
| L. <u>sibiricus</u>                  | Alaska                                                      | 22                       |
| L. <u>obensis</u>                    | Sibérie : URSS                                              | 2                        |
| * <u>Ellobius</u>                    |                                                             |                          |
| E. <u>talpinus</u>                   | Ouzbékistan : URSS                                          | 2                        |
| + sous-famille des <u>Murinae</u>    |                                                             |                          |
| * <u>Mus</u>                         |                                                             |                          |
| M. <u>musculus</u>                   | Astrakan, Moldavie,<br>Iakoutsk : URSS, Nord<br>Dakota : EU | 50, 78                   |
| M. <u>sylvaticus</u>                 | URSS                                                        | 2                        |

TABLEAU D (suite)

|                                         |                                                                                          |                           |  |
|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|--|
| * <u>Apodemus</u>                       |                                                                                          |                           |  |
| A. <u>agrarius</u>                      | URSS                                                                                     | 2                         |  |
| * <u>Nesokia</u>                        |                                                                                          |                           |  |
| N. <u>indica</u>                        | Iran                                                                                     | 2                         |  |
| * <u>Rattus</u>                         |                                                                                          |                           |  |
| R. <u>norvegicus</u>                    | Ile de Bering : URSS                                                                     | 78                        |  |
| + sous-famille des <u>Gerbillinae</u>   |                                                                                          |                           |  |
| * <u>Meriones</u>                       |                                                                                          |                           |  |
| M. <u>unguiculatus</u>                  | Iran, Mongolie                                                                           | 2                         |  |
| * <u>Rhombomys</u>                      |                                                                                          |                           |  |
| R. <u>optimus</u>                       | Kazakstan : URSS                                                                         | 2                         |  |
| + sous-famille des <u>Myospalacinae</u> |                                                                                          |                           |  |
| * <u>Myospalax</u>                      |                                                                                          |                           |  |
| M. <u>myospalax</u>                     | URSS                                                                                     | 78                        |  |
| - famille des <u>Cricetidae</u>         |                                                                                          |                           |  |
| * <u>Peromyscus</u>                     |                                                                                          |                           |  |
| P. <u>maniculatus</u>                   | Nord et Sud Dakota,<br>Minnesota, Iowa, Montana :<br>EU, Alberta et Manitoba :<br>Canada | 40, 30, 48, 31,<br>22, 26 |  |
| * <u>Neotoma</u>                        |                                                                                          |                           |  |
| N. <u>cinerea</u>                       | Wyoming : EU                                                                             | 47                        |  |
| - famille des <u>Sciuridae</u>          |                                                                                          |                           |  |
| * <u>Sciurus</u>                        |                                                                                          |                           |  |
| S. <u>vulgaris</u>                      | URSS                                                                                     | 2                         |  |
| * <u>Citellus</u>                       |                                                                                          |                           |  |
| C. <u>undulatus</u>                     | Alaska, Mongolie                                                                         | 2                         |  |
| - famille des <u>Myocastoridae</u>      |                                                                                          |                           |  |
| * <u>Myocastor</u>                      |                                                                                          |                           |  |
| M. <u>coypus</u>                        | RFA, URSS                                                                                | 59, 78                    |  |
| - famille des <u>Castoridae</u>         |                                                                                          |                           |  |
| * <u>Castor</u>                         |                                                                                          |                           |  |
| C. <u>fiber</u>                         | URSS                                                                                     | 78                        |  |
| - famille des <u>Dipodidae</u>          |                                                                                          |                           |  |
| * <u>Allactaga</u>                      |                                                                                          |                           |  |
| A. <u>elater</u>                        | Azerbaïdjan : URSS                                                                       | 2                         |  |

TABLEAU D (fin)

ORDRE DES INSECTIVORES

- famille des Soricidae

\* Sorex

S. tundrensis

Alaska

59

S. jacksoni

Alaska

22

ORDRE DES LAGOMORPHES

\* Ochotona

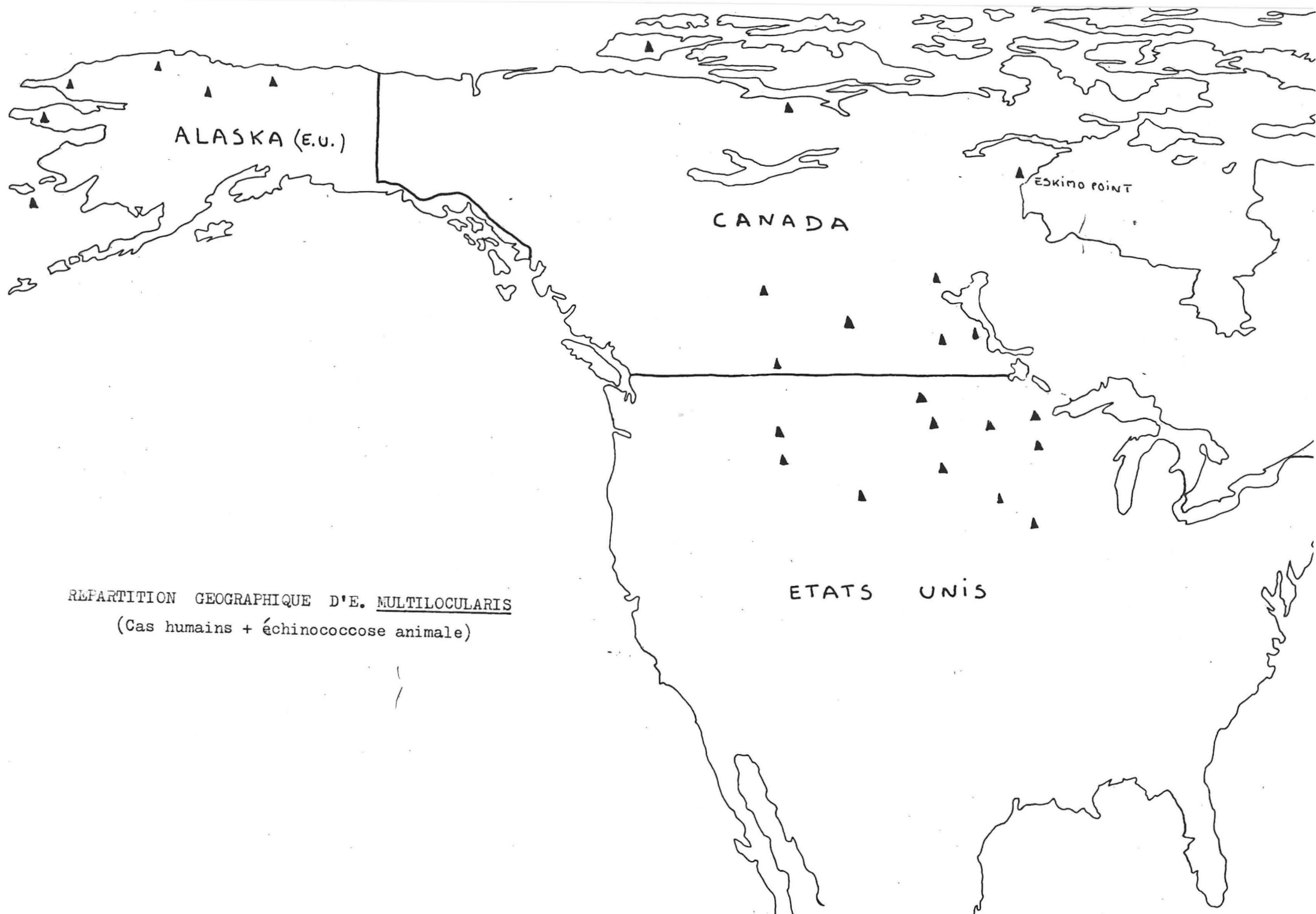
O. daurica

Mongolie

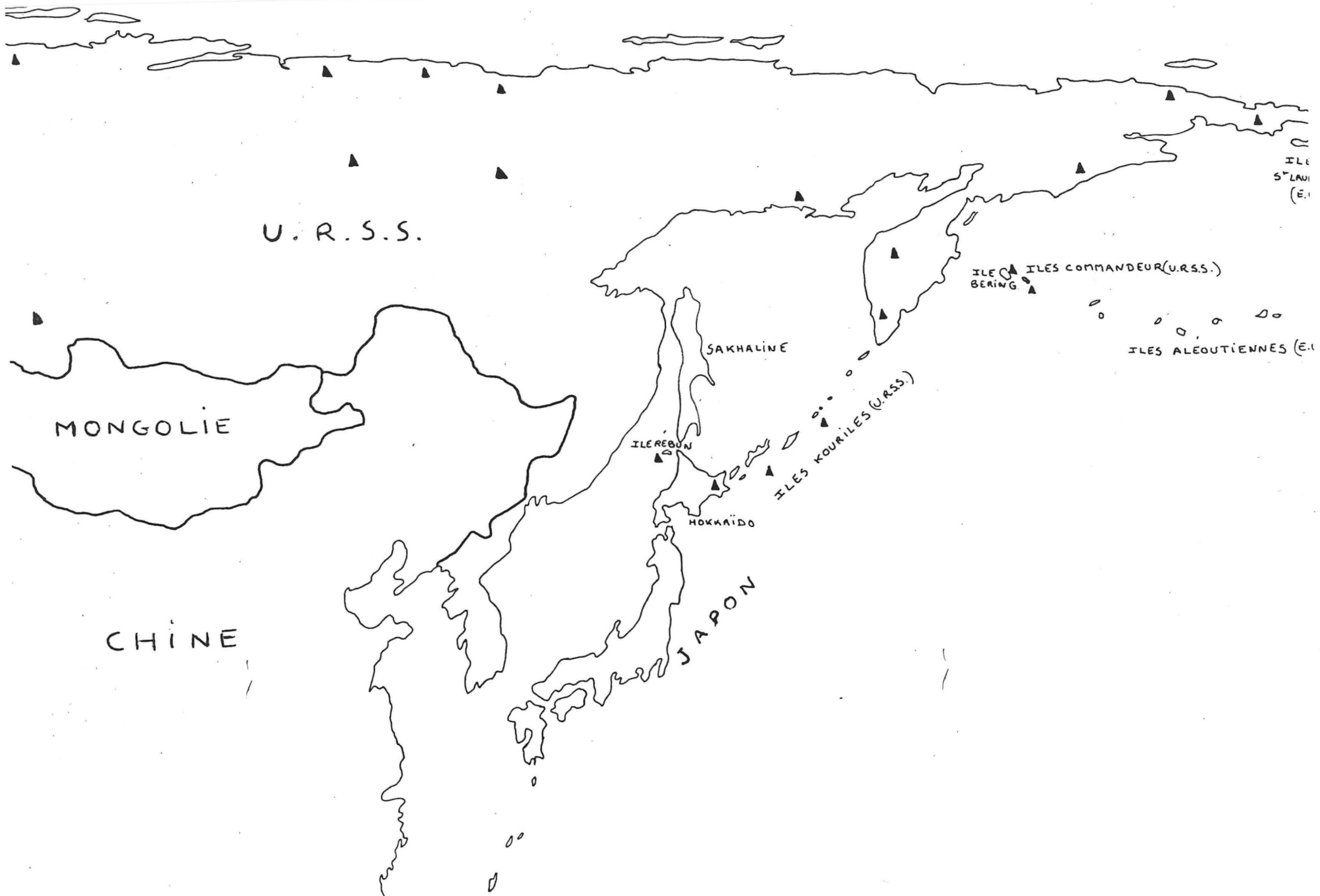
2

TABLEAU E : Hôtes définitifs d'E.multilocularis

| Mammifères hôtes             | Régions ou pays                                                                 | Sources bibliographiques |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| <b>ORDRE DES CARNIVORES</b>  |                                                                                 |                          |
| - famille des <u>Canidae</u> |                                                                                 |                          |
| * <u>Canis</u>               |                                                                                 |                          |
| C. <u>familiaris</u>         | Alaska, France, RFA, URSS, Japon                                                | 21, 61, 32, 78<br>71     |
| C. <u>lupus</u>              | Alaska, URSS                                                                    | 11, 64, 78               |
| C. <u>latrans</u>            | Nord-Dakota et Montana (EU)                                                     | 48, 60                   |
| * <u>Vulpes</u>              |                                                                                 |                          |
| V. <u>vulpes</u>             | France, RFA, Suisse, URSS                                                       | 59, 62, 78, 33<br>53, 32 |
| V. <u>fulva</u>              | Alaska, Iowa, Minnesota, Dakota Nord et Sud, Montana (EU)                       | 55, 48, 60, 25<br>37, 30 |
| V. <u>corsac</u>             | Tadjikistan, Kazakstan (URSS)                                                   | 78                       |
| * <u>Alopex</u>              |                                                                                 |                          |
| A. <u>lagopus</u>            | Alaska, Iles Banks (Canada), régions boréales d'URSS, Iles Kuriles (URSS)       | 78                       |
| - famille des <u>Felidae</u> |                                                                                 |                          |
| * <u>Felis</u>               |                                                                                 |                          |
| F. <u>catus</u>              | Nord Dakota (EU), Saskatchewan (Canada), RFA, Sibérie occidentale (URSS), Japon | 21, 62, 78               |
| F. <u>libica sarda</u>       | Kazakstan (URSS)                                                                | 21                       |



REPARTITION GEOGRAPHIQUE D'*E. MULTILOCULARIS*  
(Cas humains + échinococcose animale)





Lxxxx1

NP

Lxxxx1

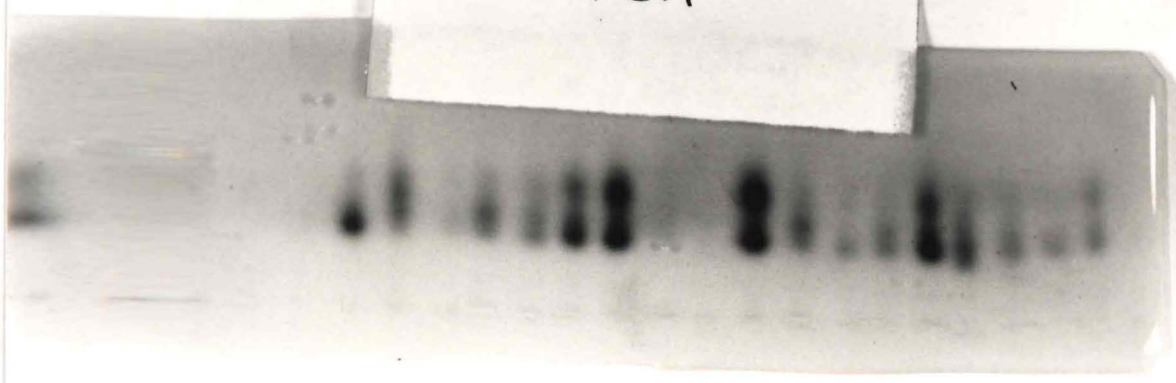
MPi

Lxxix

Idh = Icd

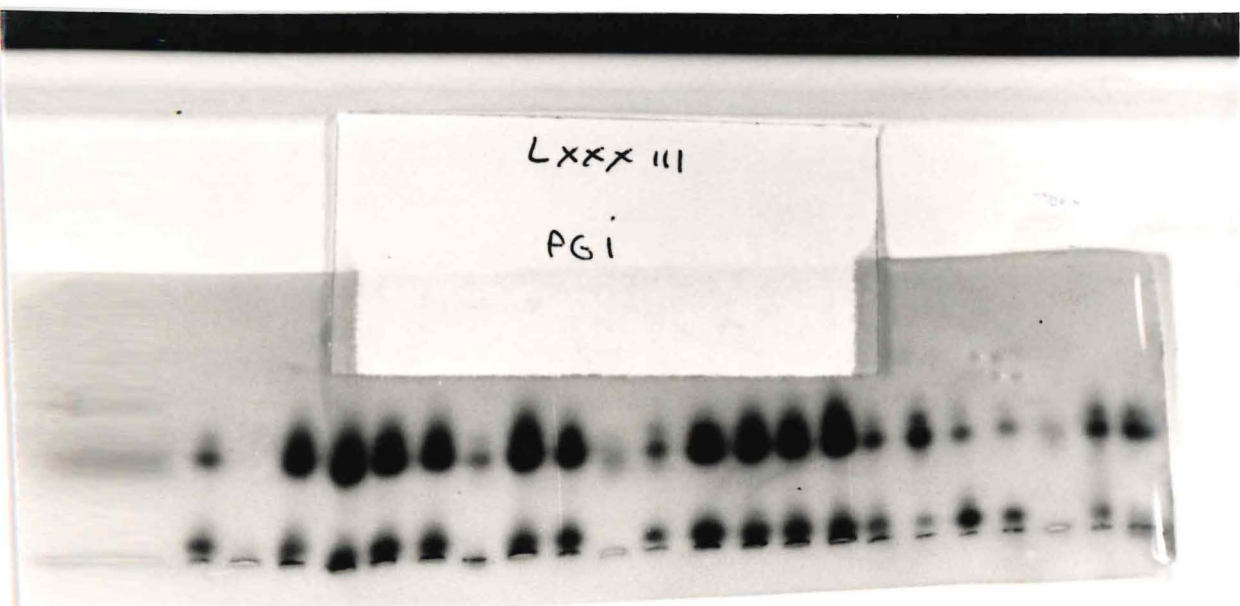
Lxxxiii

PGM



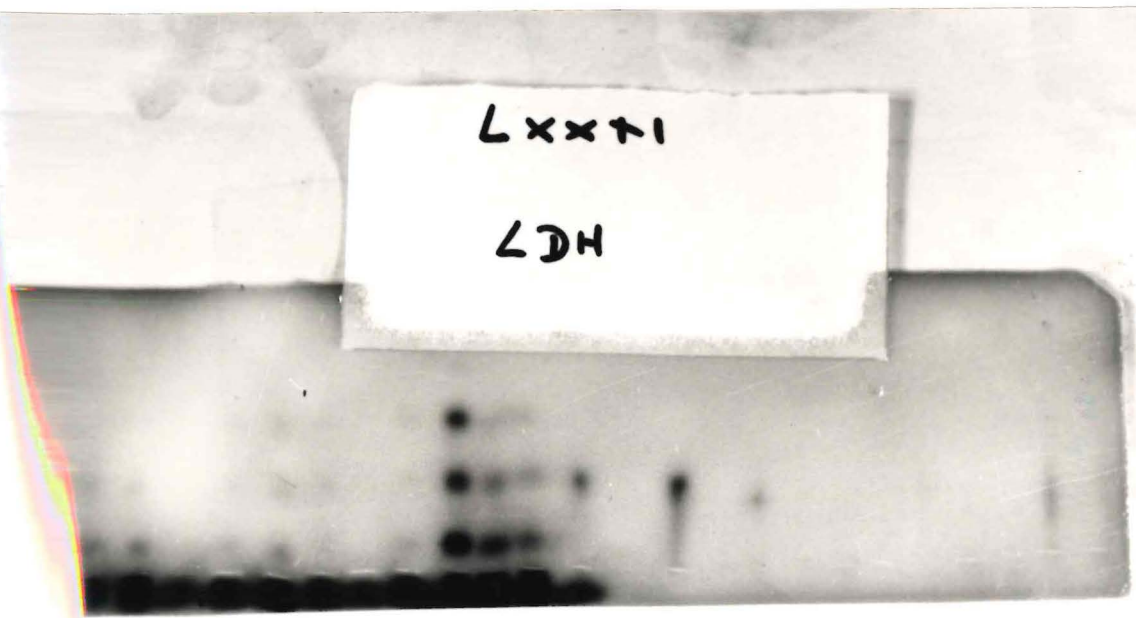
Lxxxiii

PGI



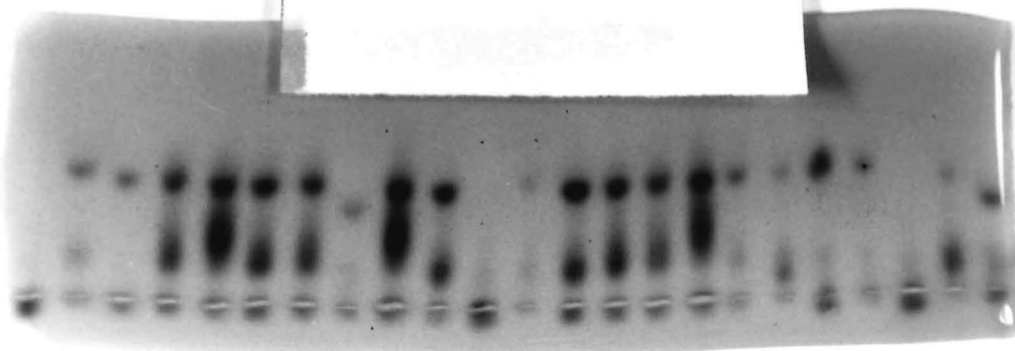
Lxxxvi

LDH



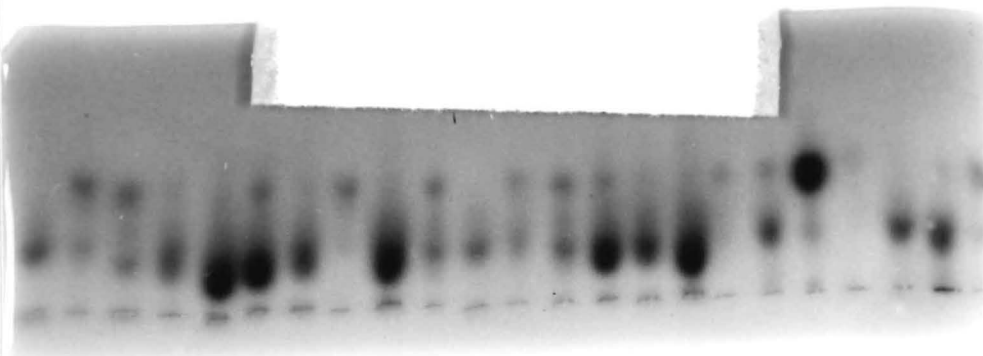
LXXXIII

MDH



LXXXIII

AK



## BIBLIOGRAPHIE

---

1. RAUSCH (R.L.).- A consideration of intraspecific categories in the genus Echinococcus, Rudolphi, 1801 (Cestoda : Taeniidae). Journal of Parasit. 1967, 53, 3 : 484-491.
2. EUZEBY (J.).- Les échinococcoses animales et leurs relations avec les échinococcoses de l'homme. Vigot frères éd., 1971, Paris : 163 p.
3. THOMPSON (R.C.A.), KUMARATILAKE (L.M.).- Intraspecific variation in Echinococcus granulosus : the Australian situation and perspectives for the future. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1982, 76, 1 : 13-16.
4. THATCHER (V.E.), SOUSA (O.E.).- Echinococcus oligarthrus Diesing, 1863, in Panama and a comparison with a recent human hydatid. Ann. Trop. Med. Parasit., 1966, 60 : 405-416.
5. RAUSCH (R.L.), RAUSCH (V.R.) et coll.- Discrimination of the larval stages of Echinococcus oligarthrus and Echinococcus vogeli. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1978, 27 : 1195-1202.
6. RAUSCH (R.L.) et al. .- Echinococcus vogeli sp.n. (Cestoda : Taeniidae) from the bush dog, Speothus venenaticus (lund.). Z. Tropenmed. Parasitol, 1972, 23 : 25-34
7. RAUSCH (R.L.), D'ALESSANDRO (A.) et coll.- Characteristics of the larval E. vogeli in the naturel intermediate host, the Paca, Cuniculus paca. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1981, 30 : 1043-1052.
8. D'ALESSANDRO (A.), RAUSCH (R.L.) et coll.- Echinococcus vogeli in man, with a review of polycystic hydatid disease in Colombia and neighboring countries. Am. J. Trop. Hyg., 1979, 28 (2) : 303-317.

9. SMYTH (J.D.).- Strain differences in Echinococcus granulosus, with special reference to the status of equine hydatidosis in the united Kingdom.  
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1977, 71 : 93-100.
- 10.- D'ALESSANDRO (A.), RAUSCH (R.L.) et coll..- Echinococcus infections in Colombian animals.  
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1981, 30 : 1263-1276
11. RAUSCH (R.L.).- Taxonomic characters in the Genus Echinococcus (Cestoda : Taeniidae).  
Bull. O.M.S., 1968, 39 : 1-4.
12. THOMPSON (R.C.A.).- Biology and speciation of Echinococcus granulosus.  
Austr. Vet.J. , 1979, 55, 3 : 93-98.
13. RAUSCH (R.L.), NELSON (G.S.).- A review of the genus Echinococcus Rudolphi, 1801.  
Ann. Trop. Med. Paras., 1963, 57 : 127-135.
14. SMYTH (J.D.), BARRET (N.).- In vitro culture of Echinococcus.  
Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg., 1980, 74, 1 p.117.
15. LIANCE (M.), VUITTON (D.) et coll..- Etude expérimentale du développement intrahépatique d'Echinococcus multilocularis chez des souris consanguines.  
Bull. Soc. Franc. Parasit., 1983, 1 : 67-70.
16. FLOCKHART (H.A.), HARRISON (S.E.) et coll.- Enzyme polymorphism in Trichinella.  
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1982, 76, 4 : 541-545.
17. DAVID L. BALDING.- Echinococcus multilocularis.  
in Text book of Parasitology, 3 th. édition : 640-644.
18. HOUIN (R.), LIANCE (M.) et coll.- Echinococcus multilocularis espèce unique ou complexe ?.  
article dactylographié.  
Bulletin de la Société française de Parasitologie : sous presse.
19. HOUIN (R.), PUEL (F.) et coll..- Echinococcus multilocularis.  
Hôtes intermédiaires et réservoirs du parasite.  
Document personnel, non publié.

20. CRELLIN (J.R.), MARCHIONDO (A.A.) et coll..- Comparaison of suitability of dogs and cats as hosts of Echinococcus multilocularis.  
Am. J. Vet. Res, 1981, 42 (11) : 1980-1981.
21. ECKERT (J.), MULLER (B.) et coll..- The domestic cat and dog as natural definitive hosts of Echinococcus (Alveolus) multilocularis in Southern Federal Republic of Germany.  
Tropen. Med. Parasit., 1974, 25 : 334-337.
22. OHBAYASHI (R.), RAUSH (R.L.) et coll..- On the ecology and distribution of Echinococcus sp (Cestoda, Taeniidae) and characteristics of their development in the intermediate host.  
II.- Comparative studies on the development of larval E. multilocularis Leuckart 1863 in the intermediate host.  
Jap. J. Vet. Res., 1971, 19 (3) suppl. : 1-53 pl.
23. FAY (F.H.).- Development of larval Echinococcus multilocularis Leuckart in relation to maturation of the intermediate host.  
J. Parasit., 1970, 56 (4, sect.2)  
Int. Cong. Parasit. (2nd) Washington.D.C., 1970, proceeding P<sup>t</sup>I : 97-98.
24. FAY (F.H.), RAUSCH (R.L.).- The seasonal cycle of abundance of Echinococcus multilocularis in naturally infected arctic foxes.  
Proc. 1st. Int. Congr. Parasit. Rome, 1964, 2 : 765.
25. KRITSKY (D.C.), LEIBY (P.D.).- Studies on sylvatic echinococcosis. V. Factors influencing prevalence of Echinococcus multilocularis Leuckart 1863, in red foxes from North Dakota, 1965-1972.  
J. Parasitol., 1978, 64 (4) : 625-634.
26. RAUSCH (R.L.), RICHARDS (S.H.).- Observations on parasite-host relationships of Echinococcus multilocularis Leuckart, 1863, in North Dakota.  
Can. J. Zool., 1971, 49 (10) : 1317-1330.
27. AIKAT (B.K.), BHUSNURMATH (S.R.) et coll..- Echinococcus multilocularis infection in India : first case report proved at autopsy.  
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1978, 72, 6 : 619-621.
28. BOISSIEU (J.J.), MORAND (M.).- Note relative à l'échinococcose du renard dans le Jura.  
Bull. Soc. Sci. Vét. et Méd. comparée, Lyon, 1981, 83 (5) : 259-262.

29. BOUREE (P.), SEGUIN (M.) et coll..- Echinococcose alvéolaire multiple : infestation probable dans la Creuse.  
Nouv. Presse Méd., 1978, 7, 28 : 2480
30. CARNEY (W.P.), LEIBY (P.D.).- Echinococcus multilocularis in Peromyscus maniculatus and Vulpes vulpes from Minnesota.  
J. Parasit., 1968, 54 : 714.
31. CHALMERS (G.A.), BARRET (M.W.).- Echinococcus multilocularis Leuckart, 1863 in rodents in Southern Alberta.  
Can. J. of Zool., 1974, 52 (8) : 1091.
32. CONTAT (F.), PETAVY (A.F.) et coll..- Contribution à l'étude épidémiologique de l'échinococcose alvéolaire en Haute-Savoie.  
Bull. Soc. Franc. Parasit., 1983, (1) : 55-58.
33. COUDERT (J.), EUZEBY (J.) et coll..- Fréquence de E. multilocularis chez le renard commun (Vulpes vulpes) dans le secteur Nord-Est de la France.  
Lyon Médical, 1970, 234 (32) : 293-298.
34. DELMONT (J.), SALDUCCI (J.) et coll..- Présentation d'un cas d'échinococcose alvéolaire observée en Provence.  
Arch. Fr. Mal. App. Dig., 1965, 54 : 1171-1172.
35. DENIS (P.), PERCEBOIS (G.) et coll..- L'échinococcose alvéolaire en Lorraine. Données épidémiologiques.  
Lyon Médical, 1970, 224, 32 : 299-302.
36. DOGRU (A.M.).- Echinococcose alvéolaire chez l'homme.  
A propos de 9 cas cliniques.  
Lyon Chirurgical, 1971, 67/5 : 371-373.
37. EASTMAN (K.L.), WORLEY (D.E.).- The Muskrat as an Intermediate host of Echinococcus multilocularis in Montana.  
J. of Parasit., 1979, 65 (1) : 34.
38. GENOV (T.P.), SVILENOV (D.K.) et coll..- The natural occurrence of Alveococcus multilocularis in the Microtus nivalis in Bulgaria.  
Compt. rendus. de l'Académie bulgare des Sciences, 1980, 33, 7 : 981-984.

39. HAN FANG, LIU RUICHANG et coll..- Echinococcosis alveolaris in Qinghai province.  
Chinese Medical Journal, 1981, 94 (6) : 391-395.
40. HNATIUK (J.M.).- First occurrence of Echinococcus multilocularis Leuckart, 1863, in Microtus pennsylvanicus in Saskatchewan.  
Can. J. Zool., 1966, 44 : 493.
41. HOUIN (R.), DENIAU (M.) et coll..- Arvicola terrestris an intermediate host of Echinococcus multilocularis in France : epidemiological consequences.  
Int.Journ. Parasit., 1982, vol.12 (6) : 593-600.
42. HOUIN (R.), LIANCE (M.) et coll..- Arvicola terrestris réservoir et élément focalisateur de l'échinococcose alvéolaire en France.  
First th. International Congress of Parasitology, Toronto, Canada, 7-14 août 1982.
43. JIANG CIPENG.- Liver alveolar echinococcosis in the North west.  
Report of 15 patients and a collective analysis of 90 cases.  
Chinese Medical Journal, 1981, 94 (11) : 771-778.
44. KAMIYA (H.), OHBAYASHI (M.) et coll..- An epidemiological survey of multilocular echinococcosis in small mammals of eastern Hokkaido, Japan.  
Jap.J. of Parasit., 1977, 26, 3 : 148-156.
45. KHURROO (M.S.), DATTA (D.V.) et coll..- Alveolar hydatid disease of the liver with Buddchiari syndrome.  
Postgraduate Medical Journal, 1980, 56 : 197-201.
46. KRITSKY (D.C.), LEIBY (P.D.) et coll..- The natural occurrence of Echinococcus multilocularis in the bushy-tailed woodrat, Neotoma cinerea rupicola, in Wyoming.  
Am. Journ. of Trop. Med. Hyg., 1977, 26, 5 : 1046-1047.
48. LEIBY (P.D.).- Natural host occurrence and geographic distribution of Echinococcus multilocularis in central North America.  
Int. Congr. Parasit. (2 nd) Washington DC 1970, Proceeding Pt I : 205-206.

49. LEIBY (P.D.), CARNEY (W.P.) et coll..- Studies on sylvatic echinococcosis.III.- Host occurrence and geographic distribution of Echinococcus multilocularis in the North Central United States. J. of Parasit., 1970, 56, 6 : 1141-1150.
50. LEIBY (P.D.), KRISTKY (D.C.).- Echinococcus multilocularis : a possible domestic life cycle in central North America and its public health implications. J. of Parasitology, 1972, 58, 6 : 1213-1215.
51. LUKASHENKO (N.P.).- Problems of epidemiology and prophylaxis of Alveococcosis (multilocular echinococcosis) : a general review with particular reference to the USSR. Int. Journ. for Parasit., 1971, vol.1 : 125-134.
52. PETAVY (A.F.), DEBLOCK (S.).- Connaissance du foyer auvergnat d'échinococcose alvéolaire. Recherche de l'hôte intermédiaire, descriptions des lésions. Ann. Parasit. Hum. Comp., 1983, 58 , 5 : 439-453.
53. PETAVY (A.F.), DEBLOCK (S.).- Helminthes du renard commun (Vulpes vulpes) dans la région du Massif Central (France). Ann. Parasitol. Hum. comp., 1980, 55, 4 : 379-391.
54. PETAVY (A.F.), REY (M.) et coll..- L'Auvergne nouveau foyer d'échinococcose alvéolaire en France. Lyon Médical, 1981, 245 , n° hors série : 111-115.
55. RAUSCH (R.L.).- Studies on the helminth fauna of Alaska. XXX .- The occurrence of Echinococcus multilocularis Leuckart, 1863, on the mainland of Alaska. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 1956, 5 : 1086-1092.
56. REY (M.), LUSSON (J.R.) et coll..- Présence en Auvergne de l'échinococcose alvéolaire (à propos de 3 cas). Rev. Med. Clermont-Ferrand, 1978, 5 : 441-451.
57. ROBBANA (M.), BEN RACHID (M.S.) et coll..- Première observation d'échinococcose alvéolaire autochtone en Tunisie. Arch. Anat. Cytol. Path., 1981, 29, 5 : 311-312.
58. THEODOROPoulos (G.), KOLITSOPoulos (A.) et coll..- Echinococcose alvéolaire hépatique. Trois observations en Grèce. La nouvelle presse médicale, 1978, 7 (34) : 3056.

59. VOGEL (H.).- Tiere als natürliche Wirte des Echinococcus multilocularis in Europa.  
Zeitschrift für Tropen medizin und Parasitologie, 1960, 11,  
36-42.
60. WORLEY (D.E.), FEIGLEY (H.P.) et coll..- Hosts, distribution and potential human health hazard of a Montana focus of Echinococcus multilocularis.  
dans fiches informatiques ICOPA V.
61. WILSON (J.F.), RAUSCH (R.L.).- Alveolar hydatid disease. A review of clinical features of 33 Indigenous cases of Echinococcus multilocularis infection in Alaskan Eskimos.  
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1980, 29 (6) : 1340-1355.
62. ZEYHLE (E.).- Die Verbreitung von Echinococcus multilocularis in Süd west deutschland.  
Aktuelle Probleme in chirurgie and orthopädie., 1982, 23, 26-33.
64. EUZEBY (J.).- Les parasitoses humaines d'origine animale. Caractères épidémiologiques.  
Ed. Flammarion, Paris 1984 : 324 p.
65. RAUSCH (R.), SCHILLER (E.L.).- Hydatid disease (echinococcosis) in Alaska and the importance of rodents intermediate hosts.  
Sciences 1951, 113 : 57-58.
66. RAUSCH (R.).- Studies on the helminth fauna of Alaska. XI.- Helminth parasites of microtine rodents. Taxonomic considerations.  
J. Parasit., 1952, 38 : 415-444.
67. CHERMETTE (R.).- Importance et situation actuelle des échinococcoses larvaires en France.  
1ère partie : l'hydatidose. Conséquences en médecine vétérinaire.  
2ème partie : l'échinococcosse multiloculaire.  
1. Le point vétérinaire, 1983, vol.14, (70) : 15-24.  
2. Le point vétérinaire, 1983, vol.15, (74) : 20-35.
68. MOSIMANN (F.).- Is alveolar hydatid disease of the liver incurable ?  
Annals of Surgery, 1980, 192, 1 : 118-123.

69. THOMPSON (R.C.A.), ECKERT (J.).- Observations on Echinococcus multilocularis in the definitive host.  
Z. Parasitenkd, 1983, 69 : 335-345.
70. KURASHVILI (B.E.).- Alveolar echinococcosis in Georgia (URSS).  
Proc. of the first int. congress of Parasitologie. Rome  
Tamboriné ed. , Milan, 1964, 2 : 747-750.
71. KASAI (Y.), KOSHINA (I.) et coll..- Alveolar Echinococcosis of the liv  
Ann. Surg., 1980, 191, 2 : 145-152.
72. LIANCE (M.), PONTEGNIE (L.) et coll..- Etude immunoélectrophorétique  
des antigènes d'Echinococcus multilocularis.  
Réunion Soc. France Parasit., 27-28 janvier 1984.  
Fac. Med. Pitié Salpêtrière , Paris.
73. LIANCE (M.), HOUIN (R.) et coll..- Valeurs comparées des antigènes  
homologue et hétérologue dans le diagnostic de l'hydatidose et  
l'échinococcose alvéolaire par immunofluorescence.  
Bull. Soc. Path. Ex., 1983, 76 : 417-424.
74. MAC MANUS (D.P.), SMYTH (J.D.).- Differences in the chemical compo-  
sition and carbohydrate metabolism of Echinococcus granulosus  
(horse and sheep strains) and E. multilocularis.  
Parasit., 1978, 77 : 103-109.
75. MAC MANUS (D.P.), SMYTH (J.D.).- Isoelectric focusins of some enzymes  
from Echinococcus granulosus (horse and sheep strains) and  
Echinococcus multilocularis.  
Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg., 1979, 73, 3 : 259.
76. MAC PHERSON (C.N.L.) MAC MANUS (D.P.).- A comparative study of  
Echinococcus granulosus from human and animal hosts in Kenya  
using isoelectric focusing and isoenzyme analysis.  
Int. Journ. Parasit., 1982, 12, 6 : 515-521.
77. DURIEZ VAUCELLE (T.), PLATTEUO BOUTHEMY (F.) et coll..- Résultats  
préliminaires de l'étude enzymatique d'un antigène frais de  
Echinococcus multilocularis.  
Bull. Soc. Franc. Parasit., 1983, 1 : 101-104.

78. LUKASHENKO (N.P.).- Multilocular hydatidosis, an anthroponosis of natural focality.  
Voprosy prirodoï ochagovosti boleznei, 1978, 9 : 29-49. Ru
79. TIBAYRENC (M.).- Les isoenzymes et l'entomologie médicale.  
Cah. ORSTOM, série Ent. méd. et Parasitol., 1979, 17, 4 : 249-256.
80. RENAUD (F.), GABRION (C.) et coll..- Le complexe Bothriocephalus scorpii (Mueller, 1776) : différenciation par électrophorèse enzymatique des espèces parasites du Turbot (Psetta maxima) et de la Barbue (Scophthalmus rhombus).  
C.R. Acad. Sc., 1983, 296, III : 127-129.
81. MAAZOUN (R.).- Identification des leishmanies dans l'ancien monde.  
Signification de la variation isozymique.  
U.S.T.L., Montpellier, 1982, Thèse de 3ème cycle.