

# **DISTRIBUTION DES FECES LE LONG DU GRADIENT D'URBANISATION ET INFLUENCE DE QUELQUES VARIABLES ENVIRONNEMENTALES SUR LE STATUT INFECTIEUX DES FECES**

---

L'infection des hôtes intermédiaires et des hôtes définitifs par *E. multilocularis* est spatialement très hétérogène. Les prévalences chez les hôtes intermédiaires, à niveau de perception régionale, généralement faibles, se situent autour de 0,1%. Cependant, à niveau de perception locale, des micro foyers d'infection ont été observés avec des prévalences de 10% en milieu rural (Delattre et al. 1988, Delattre et al. 1990b, Giraudoux et al. 2002) et pouvant atteindre 39% en milieu urbain pour les Arvicolidae (Gottstein et al. 1996, Hofer et al. 2000). L'infection des hôtes définitifs est également très agrégée. La transmission du parasite par le renard roux est probablement réalisée par un ou quelques individus avec une très forte charge parasitaire représentant parfois jusqu'à 80% de la biomasse parasitaire d'une population vulpine (cf Partie I; (Hofer et al. 2000)). En milieu urbain, la distribution inégale des densités d'hôtes intermédiaires (cf Partie II), les densités importantes d'hôtes définitifs ayant des territoires plus petits qu'en zone rurale (Deplazes et al. 2004), pourraient être à l'origine d'une grande hétérogénéité dans la répartition spatiale de l'infection.

A échelle locale, les micro-foyers d'infection sont favorisés par de fortes densités de fèces, des œufs protégés de la dessiccation et de fortes densités d'hôtes intermédiaires (Giraudoux et al. 2002). Le but de ce chapitre est donc de d'examiner la relation entre la distribution des fèces et celle des rongeurs le long du gradient d'urbanisation, afin de mettre en évidence la capacité de circulation du parasite entre le milieu extérieur et les hôtes intermédiaires *Microtus sp.* et *A. terrestris*.

Les prévalences fécales estimées à partir de tests ELISA ont montré une distincte augmentation de l'infection du milieu urbain au milieu péri-urbain (Stieger et al. 2002). Cependant, les caractéristiques environnementales des zones urbanisées où des fèces contaminées ont été trouvées ne sont pas documentées. Le second but de ce chapitre est donc de clarifier l'influence de variables environnementales, telles que le type de milieu, la saison et le niveau d'urbanisation, sur le niveau d'infection des « populations fécales ». Ce chapitre cherchera également à mettre en évidence s'il existe un lien entre

les populations de *Microtus sp.* et d'*Arvicola terrestris* et le niveau d'infection des fèces afin d'estimer si le risque d'exposition au parasite de ces deux populations est analogue.

Nous répondrons ainsi aux questions suivantes :

*Les densités de fèces varient-elles le long du gradient d'urbanisation ?*

*Quelle est l'influence du milieu, de la saison et des densités d'hôtes intermédiaires sur les densités de fèces ?*

*Les densités optiques mesurées lors de la détection de coproantigènes par ELISA à partir des fèces sont-elles liées au niveau d'urbanisation ?*

*Quelle est l'influence du milieu, de la saison et des densités de *Microtus sp.* et d'*A. terrestris* sur les densités optiques mesurées?*

## **E.1. Matériel et Méthodes**

### **E.1.1. Parcelles d'étude**

Les sites d'étude sont les 68 parcelles dans lesquelles le mode d'exploitation de la ressource disponible a été estimé (cf. Partie II). Elles ont été sélectionnées en fonction du niveau d'urbanisation (urbain, péri-urbain, rural) et du type de milieu (prairie, pâture, friche, allées de jardins, parcs). Tous les milieux ne sont pas représentés pour chaque niveau d'urbanisation. Ils sont distribués de la manière suivante :

- Prairies et pâtures en zone rurale.
- Prairies, pâtures et jardins en zone péri-urbaine.
- Friches, jardins et parcs en zone urbaine.

### **E.1.2. Estimation des densités relatives de *Microtus sp.* et d'*Arvicola terrestris* et collecte de fèces**

L'estimation des densités relatives de *Microtus sp.* et d'*A. terrestris* ainsi que la collecte des fèces de renards roux ont été réalisées lors du parcours des transects parcellaires par la méthode indiciaire (cf. Partie II). Les parcelles des friches, parcs et jardins ont été rééchantillonnées chaque saison en 2005 et 2006, soit huit fois et celles des prairies et pâtures à chaque saison en 2006, soit quatre fois. Les densités de *Microtus sp.* et d'*A. terrestris* sont exprimées par le rapport du nombre d'intervalles de 10 m présentant des indices de présence du rongeur sur le nombre d'intervalles parcourus dans la parcelle. Les parcelles et les fèces collectées ont été géoréférencées à l'aide d'un GPS.

### **E.1.3. Coprotest ELISA (Enzyme-Linked Immunoborbent Assay)**

#### **E.1.3.1. Principe du test**

Les coprotests ELISA sont généralement utilisés à titre de diagnostic individuel pour la recherche de coproantigènes d'*Echinococcus sp.* sécrétés par le parasite pendant la phase intestinale du cycle chez l'hôte définitif. Un échantillon de fèces est utilisé afin d'attribuer un statut parasité ou non à l'animal. La phase solide du test est sensibilisée avec des anticorps polyclonaux anti-*Echinococcus* qui vont fixer les antigènes présents dans l'échantillon à tester. L'antigène capté est alors détecté à l'aide d'un second anticorps polyclonal anti-*Echinococcus* couplé à la peroxydase qui, par oxydation d'un substrat chromogène, provoquera en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> une coloration plus ou moins intense selon la quantité d'antigènes capturés par les anticorps. La densité optique mesurée pour l'échantillon est comparée à une valeur de Densité Optique (DO) seuil afin de définir le statut parasitaire de l'animal.

#### **E.1.3.2. Réalisation du test**

La préparation des surnageants de fèces pour coprotests ELISA a été réalisée au LERRPAS de Nancy. Après décontamination des fèces à -80°C pendant une semaine et stockage à -30°C, les fèces ont été décongelées à température ambiante. Un gramme de chaque échantillon de fèces a été mis en suspension avec 3 ml de solution de dilution du

CHEKIT-Echinotest (Kit commercial du Dr. Bommeli AG. version 2005). Après avoir été vigoureusement agitées, les préparations ont été centrifugées à 3000g durant 10 minutes et le surnageant prélevé a été stocké jusqu'à analyse à  $-30^{\circ}\text{C}$ . Par la suite, les coprotests EM-ELISA (Deplazes et al. 1999) ont été réalisés par l'équipe du Pr. Deplazes à l'Institut de Parasitologie de l'Université de Zürich, en Suisse.

Les valeurs de DO sont lues à 405 nm. La valeur seuil qui sépare les positifs des négatifs (cut-off) est déterminée à partir du calcul de la moyenne des DO d'un nombre variable de témoins négatifs à laquelle est ajouté 2 fois la valeur de l'écart-type. Cette technique mathématique repose sur une hypothèse de normalité qui devrait être vérifiée pour chaque analyse. Ce qui est rarement réalisé. Les valeurs seuils sont donc arbitraires et non standardisées. Les témoins négatifs proviennent d'animaux sauvages exempts d'*E. multilocularis* mais pouvant héberger d'autres helminthes intestinaux. Le témoin négatif n'est donc pas standardisé et non homogène. Les scores de sensibilité et de spécificité des tests sont évalués à partir d'échantillons de référence issus de cadavres dont l'autopsie a permis un comptage exact du nombre d'échinocoques présents.

Dans le cadre d'une étude éco-épidémiologique, Raoul et al. (2001) ont mis en évidence l'intérêt des densités optiques pour estimer les niveaux d'infection d'une population. Si cette méthode n'élimine pas le problème posé par l'existence de réactions croisées, elle permet d'échapper à l'arbitraire de la définition d'un seuil de positivité, sous l'hypothèse que l'intensité de contamination de la population statistique fécale est d'autant plus élevée que sa DO mesurée par sa moyenne ou sa médiane est élevée.

#### E.1.3.3. Calcul de la densité optique

Sur chaque plaque, deux témoins négatif et positif sont inclus en duplicat pour mesurer le bruit de fond et l'intensité du signal de réaction témoin.

Le test EM-ELISA inclut en plus une réaction de contrôle pour chaque échantillon. Chaque fèces est donc testée sur 2 puits. Un des deux puits a été sensibilisé avec des IgG de lapin avant immunisation contre *E. multilocularis* (réaction contrôle négatif) et le deuxième puits est sensibilisé avec des IgG de lapin immunisé contre *E. multilocularis* (réaction spécifique). La valeur DO "spécifique" de chaque échantillon correspond à la valeur de DO spécifique de laquelle on soustrait la valeur de la DO de contrôle.

Si la valeur de DO de contrôle d'un échantillon est supérieure à la moitié de la valeur de DO spécifique de cet échantillon, l'échantillon est considéré inexploitable.

Afin de permettre des comparaisons entre plaques, il est nécessaire que la variabilité inter plaques, due à des facteurs externe, tels que la température ou la différence entre lots de plaques, soit compensée. Ainsi, une des plaques choisie au hasard a été utilisée comme plaque de référence. Un couple de témoins négatifs et positifs, choisi comme témoins de référence, a été utilisé sur toutes les plaques afin d'ajuster les DO de l'échantillon selon la formule suivante (Besnard J.C. et Morin J.F. 1997 dans Raoul, 2001):

$$DO = \left[ \frac{T_{neg.ref} - T_{pos.ref}}{T_{neg.X} - T_{pos.X}} \right] \times DO_{ech} + \left( T_{neg.ref} - \left( \left[ \frac{T_{neg.ref} - T_{pos.ref}}{T_{neg.X} - T_{pos.X}} \right] \times T_{neg.X} \right) \right)$$

où :

$T_{neg.ref}$  = DO témoins négatif de la plaque de référence

$T_{pos.ref}$  = DO témoins positif de la plaque de référence

$T_{neg.X}$  = DO témoin négatif sur plaque X

$T_{pos.X}$  = DO témoin positif sur plaque X

$DO_{ech}$  = DO fèces sur plaque = DO spécifique – DO contrôle

## **E.1.4. Analyses statistiques**

### **E.1.4.1. Analyse des densités de fèces**

Les fèces étant distribuées de façon agrégée, le lien utilisé pour les modèles est supposé suivre une fonction binomiale négative. Cette hypothèse a été vérifiée en comparant la variance des données à leur moyenne : lorsque le rapport est largement supérieure à un, il indique qu'une distribution binomiale négative est plus appropriée qu'une distribution de Poisson. Les mêmes parcelles étant ré-échantillonnées chaque saison (mesures répétées), une comparaison des abondances moyennes de fèces dans les parcelles au cours du temps a été effectuée. Dans le cas où une différence significative apparaissait nous avons considéré que la mesure répétée au cours du temps pouvait conduire à une pseudoréplication. Nous avons donc considéré la variable parcelle comme une variable aléatoire dans un modèle généralisé à effet mixte (GLMM). Chaque modèle utilisé intégrait en plus des variables « environnementales » et comme première variable

explicative le nombre d'intervalles parcourus « ninter », afin de prendre en compte l'effort d'échantillonnage dans chaque parcelle. Il n'existe actuellement aucune méthode totalement satisfaisante d'un point de vue strictement mathématique permettant la comparaison des GLMMs (Antonio et Beirlant 2007) car l'optimisation des paramètres est fondée sur une méthode pénalisée de quasi-vraisemblance. La sélection des modèles a été réalisée ici par comparaison des critères d'Akaike pour petits échantillons (AICc) (Burnham et Anderson 2002). Les intervalles de confiance des paramètres ont été calculés par bootstrap (p=1000). La qualité de l'ajustement a été examinée par observation graphique de la variabilité et de la normalité des résidus.

#### *E.1.4.1.1 Influence de l'urbanisation sur les densités de fèces*

Pour analyser l'influence de l'urbanisation sur les densités de fèces, la variable « saison » et la variable « milieu » ont été ajoutées à la variable « ninter » du modèle. Ceci dans le but de tenir compte de la variabilité saisonnière due à la dynamique de population et de la possible variabilité due à l'utilisation préférentielle de certains habitats par le renard roux.

L'effet du gradient péri-urbain/rural « zone<sub>a</sub> » a été analysé sur les milieux prairies et pâtures en intégrant les effets « saison » et « milieu ». L'effet du gradient urbain/péri-urbain « zone<sub>b</sub> » a été analysé sur les allées de jardins en intégrant les effets « saison » et « année », les jardins ayant été échantillonnés pendant deux années consécutives.

#### *E.2.4.1.1 Influence de la saison, du milieu, des densités de *Microtus sp.* et d'*A. terrestris* sur les densités de fèces*

Lorsqu'aucun effet de l'urbanisation n'a été mis en évidence sur les densités de fèces, un modèle global a été ajusté à partir des données de 2006, seule année où l'ensemble des milieux ont été échantillonnés. Ce modèle intégrait comme variables explicatives l'ensemble des milieux étudiés « milieu », les saisons « saison », et le nombre d'indices positifs en *Microtus sp.* « mapos » et en *A. terrestris* « atpos ».

#### E.1.4.2. Analyse des densités optiques

Les mêmes parcelles étant ré-échantillonnées chaque saison (mesures répétées), une comparaison des DO moyennes des fèces dans les parcelles, au cours du temps, a été effectuée. Dans le cas où une différence significative apparaissait nous avons considéré que la mesure répétée au cours du temps pouvait conduire à une pseudoréplication et avons donc utilisé un modèle généralisé à effet mixte (GLMM) (Pinheiro et Bates 2000). Afin de suivre une loi normale, les densités optiques ont été transformées par fonction logarithmique. Les modèles ont été sélectionnés à partir du critère d'Akaike pour petits échantillons (AICc) (Burnham et Anderson 2002).

##### *E.1.4.2.1 Influence de l'urbanisation sur les densités optiques de fèces*

L'effet du gradient péri-urbain rural « zone<sub>a</sub> » sur les densités optiques des fèces collectées dans les prairies et pâtures, a été analysé en intégrant l'effet de la saison « saison » et du type de milieu « milieu ». L'effet du gradient péri-urbain/urbain « zone<sub>b</sub> » sur les densités optiques des fèces collectées dans les jardins a été analysé en intégrant l'effet de la saison « saison » et de l'année de collecte « année ».

##### *E.2.4.2.1 Influence de la saison, du milieu, des densités de *Microtus sp.* et d'*A. terrestris* sur les densités optiques de fèces*

Afin de mettre en évidence l'influence du milieu, de la saison et des densités de *Microtus sp.* et d'*A. terrestris* sur les densités optiques des fèces, des modèles ont été ajustés à partir des données de 2006 (seule année où l'ensemble des milieux a été échantillonné). Les modèles testés étaient donc composés des variables saison « saison », milieu « milieu », densité de *Microtus sp.* « maindex » et densité d'*A. terrestris* « atindex ». Lorsqu'un effet du niveau d'urbanisation a été mis en évidence précédemment, la variable « zone » a également été testée. Tout les types de milieux n'étant pas représentés dans chaque niveau d'urbanisation, la variable milieu était supprimée lorsque la variable zone était testée.

### E.3.4.2.1 Analyse spatiale

Les valeurs des logarithmes de densités optiques ont également été analysées afin de vérifier la présence d'une structure spatiale particulière. Le modèle linéaire a été sélectionné par AICc à partir d'un modèle saturé correspondant aux coordonnées x et y et leurs interactions possibles ( $\ln(\log(Dox)) \sim x*y*I(x^2)*I(y^2)$ ). Les courbes de tendance, représentant les prévalences prédites, sont issues du modèle sélectionné par AICc. L'absence d'autocorrelation des résidus a été vérifiée à partir des coefficients I de Moran.

Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel R 2.4.1 (R Development Core Team, 2006). Les packages utilisés sont pgirmess 1.3.1, lme4 0.9975-10 pour les GLMMs, nlme 3.1-78 pour les modèles linéaires mixtes et spdep 0.3-25, geoR 1.6-11 pour les analyses spatiales.

## E.2. Résultats

### E.2.1. Densités de fèces

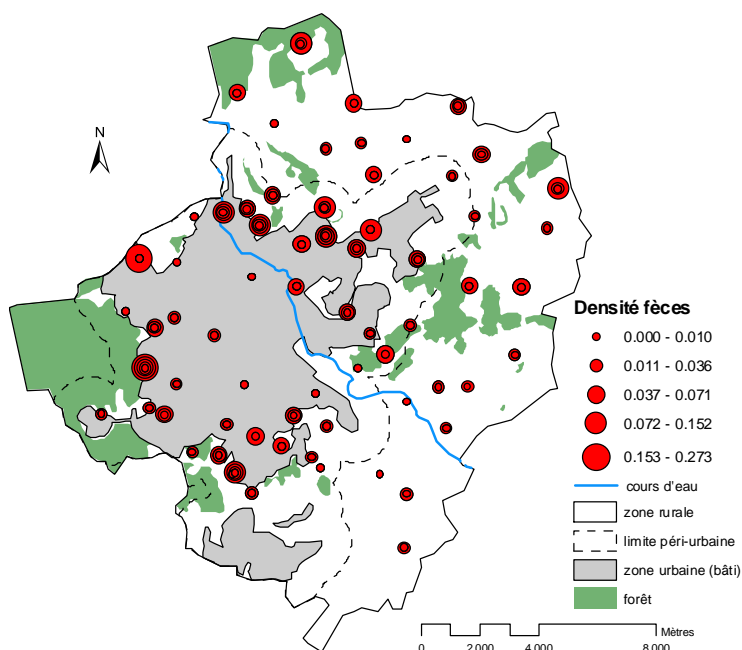


Figure 20: Distribution géographique des densités de fèces (n fèces par intervalles de 10 mètres). Un cercle correspond à une densité parcellaire de fèces à une saison donnée.



Le parcours des transects parcellaires a permis la collecte de 248 fèces pour un total de 19194 intervalles de 10 m parcourus. Les indices kilométriques d'abondance des fèces s'échelonnent de 0,77 au printemps jusqu'à 1,94 en hiver (Figure 20 et Tableau 8). Lors des deux années de collecte, les indices kilométriques de fèces ont respectivement été de 1,25 en 2005 et 1,32 en 2006 (en 2005 la zone rurale n'a pas été échantillonnée). Les parcs (IKA fèces= 0,48) présentent les plus petits indices kilométriques de fèces alors que le maximum est atteint dans les friches (IKA fèces= 1,98). Quarante et une fèces ont été récoltées en milieu urbain, 119 en milieu péri-urbain et 48 en milieu rural, représentant respectivement des indices kilométriques d'abondance de 1,24; 1,42 et 1,11.

Tableau 8: Distribution des fèces et des indices positifs en *Microtus sp.* et en *A. terrestris* en fonction des variables environnementales étudiées. ninter : nombre d'intervalles parcourus; IKA fèces : indices kilométriques d'abondance de fèces ; mapos/100inter : nombre d'intervalles positifs en *Microtus sp.* pour 100 intervalles parcourus; atpos/100inter : nombre d'intervalles positifs en *A. terrestris* pour 100 intervalles parcourus.

Variables environnementales		ninter	Nombre de fèces collectées	IKA fèces	mapos	atpos
Zone	Rural	4314	48	1,11	8,00	4,36
	Péri-urbain	8355	119	1,42	6,06	7,97
	Urbain	6525	81	1,24	4,44	6,50
Saison	Hiver	4643	90	1,94	12,77	8,21
	Printemps	4662	36	0,77	2,51	7,01
	Été	4238	58	1,37	0,78	3,66
	Automne	5651	64	1,13	7,04	7,34
Milieu	Friche	1367	27	1,98	17,41	3,66
	Jardin	4482	85	1,90	0,71	2,61
	Parc	2898	14	0,48	1,24	11,39
	Pâturage	7095	59	0,83	6,23	4,34
	Prairie	3352	63	1,88	11,72	14,11
Année	2005	8243	103	1,25	6,39	7,19
	2006	10951	145	1,32	5,61	6,26
	Total	19194	248	1,30	5,60	6,70

### E.2.1.1. Influence de l'urbanisation sur les densités de fèces

Le rapport variance sur moyenne du nombre de fèces récoltées dans les prairies/ pâtures et dans les jardins, largement supérieur à un (Prairies et pâtures :  $1,71 / 0,56 \gg 1$  ; jardins :  $3,61/1,81 \gg 1$ ) indique une distribution agrégative. Un modèle binomial négatif a donc été utilisé. La comparaison des abondances moyennes des parcelles, indépendamment de la saison, du milieu et de la zone, indique un effet significatif de la parcelle sur les données des prairies et pâtures et des jardins ( $p(\chi^2) \ll 0,001$ ). Un modèle mixte a donc été utilisé.

La comparaison des AICc des GLMMs, intégrant l'effet de la saison et du type de milieu, n'a pas permis de mettre en évidence une influence des niveaux d'urbanisation péri-urbain et rural sur les densités de fèces des prairies et pâtures (Tableau 9a). Les densités de fèces des prairies et pâtures semblent expliquées par la saison avec des densités plus importantes en hiver (Coef=1,89 ; IC=[0,73-2,99]) et au printemps (Coef=1,53 ; IC=[0,33-2,56]) par rapport à l'automne. De la même façon aucune influence du gradient urbain-péri-urbain n'a été mise en évidence sur les densités de fèces des jardins (Tableau 9b). En effet, les densités de fèces des jardins sont également conditionnées par la saison avec des densités plus faibles au printemps qu'en automne (Coef= -1,39 ; IC=[-1,89 -0,04]).

Tableau 9: Comparaison des modèles expliquant l'influence de la saison, du milieu et du niveau d'urbanisation sur les densités de fèces. LL : log-vraisemblance maximisée ; K : nombre de paramètres estimés ; n/K : nombre d'observations/K ; AICc : Critère d'information d'Akaike de second ordre ;  $\Delta_i$  : différence entre l'AICc et la plus faible valeur d'AICc ;  $w_i$  : poids d'Akaike ; ninter : nombre d'intervalles parcourus.

<b>a) Prairies et pâtures</b>	LL	K	n/K	AICc	$\Delta_i$	$w_i$
ninter + saison	-53,8	5	24,4	120,1	0,0	0,58
ninter + saison + milieu	-53,4	6	20,3	121,6	1,5	0,27
ninter + saison + milieu + zone <sub>a</sub>	-53,4	7	17,4	123,7	3,6	0,10
ninter + saison + milieu*zone <sub>a</sub>	-53,4	3	40,7	124,9	4,8	0,05
ninter	-61,9	3	40,7	130,0	9,9	0,00
<b>b) Jardins</b>	LL	K	n/K	AICc	$\Delta_i$	$w_i$
ninter + saison	-30,8	6	12,0	74,8	0,0	0,48
ninter	-34,6	3	24,0	75,5	0,7	0,34
ninter + saison + année	-30,8	7	10,3	77,3	2,5	0,14
ninter + saison + année + zone <sub>b</sub>	-30,7	8	9,0	79,8	5,0	0,04

### E.2.1.2. Influence du milieu, de la saison et des densités de *Microtus sp.* et d'*A. terrestris* sur les densités de fèces

Le rapport variance sur moyenne du nombre de fèces récoltées en 2006 dans les divers milieux est largement supérieur à un ( $1,53 / 0,60 \gg 1$ ) indiquant une distribution agrégative. La comparaison des abondances moyennes des parcelles, indépendamment de la saison, du milieu, des indices de présence de *Microtus sp.* et d'*A. terrestris*, indique un effet significatif de la parcelle sur les densités de fèces ( $p(\chi^2) \ll 0,001$ ). Les divers niveaux d'urbanisation n'ayant pas d'effet sur les densités de fèces, des modèles mixtes intégrant différentes combinaisons des variables « milieu », « saison », du nombre d'intervalles positifs pour *Microtus sp.*, « mapos » et pour *A. terrestris* « atpos » ont été ajustés. Ils ont été comparés afin de déterminer quels étaient les facteurs qui expliquaient au mieux la distribution des fèces. L'effet de la saison ayant été mis en évidence précédemment dans les milieux prairiaux et les jardins, l'interaction entre le type de milieu et la saison « milieu\*saison » a été intégrée dans l'analyse. Le tableau 10 montre que le nombre d'intervalles positifs en *Microtus sp.* et en *A. terrestris* sont présentés comme les variables les plus explicatives des densités de fèces de l'ensemble de la zone d'étude.

*Tableau 10:* Comparaison des modèles expliquant l'influence de la saison, du milieu et des densités de *Microtus sp.* et d'*A. terrestris* sur les densités de fèces. LL : log-vraisemblance maximisée ; K : nombre de paramètres estimés ; n/K : nombre d'observations/K ; AICc : Critère d'information d'Akaike de second ordre ;  $\Delta_i$  : différence entre l'AICc et la plus faible valeur d'AICc de l'analyse ;  $w_i$  : poids d'Akaike ; ninter : nombre d'intervalles parcourus ; mapos = nombre d'intervalles positifs pour la présence de *Microtus sp.* ; atpos = nombre d'intervalles positifs pour la présence d'*A. terrestris*.

modèles	LL	K	n/K	AICc	$\Delta_i$	$w_i$
ninter + atpos + mapos	-73,9	5	38,6	158,1	0,0	0,80
ninter + atpos + mapos + saison	-73,7	7	27,6	162,0	3,9	0,12
ninter + atpos	-77,7	4	48,3	163,7	5,6	0,05
ninter + mapos	-79,0	4	48,3	166,1	8,0	0,01
ninter + saison + milieu + mapos + atpos	-72,0	11	17,5	167,4	9,2	0,01
ninter + atpos + mapos + saison*milieu	-62,9	19	10,2	168,1	10,0	0,01
ninter	-82,0	3	64,3	170,0	11,9	0,00
ninter + saison*milieu	-66,7	17	11,4	170,9	12,8	0,00
ninter + saison	-80,3	7	27,6	171,1	13,0	0,00
ninter + milieu	-79,8	5	38,6	173,8	15,7	0,00
ninter + saison + milieu	-78,3	9	21,4	175,5	17,4	0,00

Le tableau 11 présente les intervalles de confiance et les coefficients du modèle sélectionné. Il montre que les densités de fèces sont positivement corrélées aux densités de *Microtus sp.* (Coef= 0,05 ; IC[0,01-0,08]) et aux densités d'*A. terrestris* (Coef= 0,08 ; IC=[0,04-0,13]). Les parcelles à plus forte densité de fèces présentent donc les plus fortes densités de *Microtus sp.* et/ou d'*A. terrestris*.

Tableau 11: Coefficients des modèles et intervalles de confiance des paramètres du modèle expliquant la distribution des fèces.

n fèces	Coefficient	2,5%	97,5%
(Intercept)	-2,53	-3,48	-1,49
<b>ninter</b>	<b>0,03</b>	<b>0,01</b>	<b>0,05</b>
<b>mapos</b>	<b>0,05</b>	<b>0,01</b>	<b>0,08</b>
<b>atpos</b>	<b>0,08</b>	<b>0,04</b>	<b>0,13</b>

## E.2.2. Statut infectieux des populations fécales

Sur les 248 fèces analysées, 27 échantillons (9,45%) dont la réponse non spécifique était supérieure à 50% de la réponse spécifique ont été exclus de l'analyse (Tableau 12).

Les valeurs de densités optiques à 405 nm (corrigées) s'échelonnent de 0 à 1,644. La valeur médiane de DO est de 0,144.

Tableau 12: Densités optiques des fèces collectées en fonction des variables environnementales étudiées.  $DO_{spé}$  : DO spécifique d'*E.m.*;  $DO_{nonspé}$ : DO non spécifique d'*E.m.* (Do de contrôle – Do spécifique).

Variables environnementales	Nombre de fèces collectées	Nombre de fèces $DO_{spé} > 50\% DO_{nonspé}$	Densité optique des fèces			
			Minimum	Maximum	Médiane	
Zone	Rural	48	44	0,014	1,644	0,150
	Péri-urbain	119	103	0,009	1,417	0,126
	Urbain	81	74	0,044	1,503	0,155
Saison	Hiver	90	79	0,009	1,503	0,105
	Printemps	36	29	0,033	1,056	0,116
	Ete	58	54	0,047	0,993	0,156
	Automne	64	59	0,031	1,644	0,180
Milieu	Friche	27	25	0,044	0,993	0,121
	Jardin	85	74	0,047	0,468	0,148
	Parc	14	6	0,117	1,503	0,153
	Pâtûre	59	57	0,014	1,644	0,132
	Prairie	63	54	0,009	1,417	0,138
Année	2005	105	86	0,031	1,644	0,162
	2006	143	135	0,009	1,417	0,130

### E.2.2.1. Influence de l'urbanisation sur le statut infectieux des fèces

La comparaison des valeurs de DO moyennes des parcelles, indépendamment de la saison, du milieu et de la zone, n'indique pas un effet significatif de la parcelle sur les données des prairies et pâtures et des jardins (Prairies et pâtures :  $p(\chi^2) = 0,75$  ; Jardins :  $p(\chi^2) \ll 0,97$ ). Le modèle mixte n'a donc pas été utilisé. Le tableau 13 présente la comparaison des modèles linéaires utilisés pour tester l'effet du gradient péri-urbain/rural sur les densités optiques des fèces collectées dans les prairies et les pâtures. Les modèles incluant la variable zone, la variable saison et la variable saison et zone sont équivalents au modèle nul. Par conséquent, l'influence du niveau d'urbanisation et

de la saison et du milieu sur les densités optiques des fèces récoltées dans les prairies et pâtures n'a pu être mis en évidence. Pour les fèces collectées dans les jardins, le modèle sélectionné n'intègre pas le niveau d'urbanisation comme variable explicative des variations de densités optiques des fèces mais la variable saison avec des densités optiques plus faibles en hiver par rapport à l'automne (Coef=-0,90; p=0,0001).

Tableau 13: Comparaison des modèles expliquant l'influence du niveau d'urbanisation sur les densités optiques des fèces. LL : log-vraisemblance maximisée ; K : nombre de paramètres estimés ; n/K : nombre d'observations/K ; AICc : Critère d'information d'Akaike;  $\Delta_i$ :différence entre l'AICc et la plus faible valeur d'AICc de l'analyse;  $w_i$ : poids d'Akaike ;ninter : nombre d'intervalles parcourus ;mapos= nombre d'intervalles positifs pour la présence de *Microtus sp.* ; atpos= nombre d'intervalles positifs pour la présence d' *A. terrestris*.

Prairies et patûres (péri-urbain/rural)	LL	K	N/K	AICc	$\Delta_i$	$w_i$
<b>modèle nul</b>	<b>-140,8</b>	<b>2</b>	<b>52,5</b>	<b>285,8</b>	<b>0,0</b>	<b>0,25</b>
zone	-140,0	3	35,0	286,3	0,5	0,19
saison + zone	-136,9	6	17,5	286,7	0,9	0,16
saison	-138,0	5	21,0	286,7	0,9	0,16
milieu	-140,7	3	35,0	287,7	2,0	0,09
milieu + zone	-140,0	4	26,3	288,4	2,7	0,07
saison + milieu + zone	-136,9	7	15,0	288,9	3,2	0,05
saison + milieu + zone + milieu:zone	-136,0	8	13,1	289,5	3,7	0,04
Jardins (urbain/péri-urbain)	LL	K	N/K	AICc	$\Delta_i$	$w_i$
<b>saison</b>	<b>-57,4</b>	<b>5</b>	<b>13,2</b>	<b>125,9</b>	<b>0,0</b>	<b>0,62</b>
saison + zone	-57,4	6	11,0	128,2	2,4	0,19
saison + annee + zone	-56,2	7	9,4	128,3	2,5	0,18
modèle nul	-67,4	2	33,0	139,0	13,1	0
annee	-67,3	3	22,0	141,0	15,1	0
zone	-67,3	3	22,0	141,1	15,2	0

#### E.2.2.2. Influence du milieu, de la saison et des densités de *Microtus sp.* et d'*A. terrestris* sur le statut infectieux des fèces

La comparaison des DO moyennes des parcelles, indépendamment de la saison, du milieu et de la zone, n'indique pas un effet significatif de la parcelle sur les données ( $p(\chi^2)= 0,66$ ). Le modèle mixte n'a donc pas été utilisé. Le tableau 14 montre que la sélection des modèles linéaires par AICc intègre les densités d' *A. terrestris* et la saison comme variable explicative des variations de densité optique des fèces. Les coefficients

du modèle montrent que les densités optiques des fèces augmentent là où les densités d'*A. terrestris* sont les plus faibles (Coef= -0,48 ; IC= -1,82 ; -1,38). Les densités optiques sont également plus faibles en hiver (Coef= -0,39 ; IC= -0,68 ; -0,09) et au printemps (Coef= -0,39 ; IC= -0,76 ; -0,02) par rapport à l'automne.

Tableau 14: Comparaison des modèles expliquant l'influence de la saison, du milieu et des densités de *Microtus sp.* et d'*A. terrestris* sur les densités optiques des fèces. LL : log-vraisemblance maximisée ; K : nombre de paramètres estimés ; n/K : nombre d'observations/K ; AICc : Critère d'information d'Akaike de second ordre;  $\Delta_i$  : différence entre l'AICc et la plus faible valeur d'AICc de l'analyse;  $w_i$  : poids d'Akaike ; ninter : nombre d'intervalles parcourus ; mapos= nombre d'intervalles positifs pour la présence de *Microtus sp.* ; atpos= nombre d'intervalles positifs pour la présence d'*A. terrestris*. En gras : Modèle sélectionné.

modèles	LL	K	N2K	AICc	i	wi
atindex + maindex + saison	-250,1	7	29,7	514,8	0,0	0,52
<b>atindex + saison</b>	<b>-252,1</b>	<b>6</b>	<b>34,7</b>	<b>516,6</b>	<b>1,8</b>	<b>0,22</b>
saison	-254,1	5	41,6	518,5	3,6	0,09
atindex	-256,3	3	69,3	518,7	3,9	0,07
atindex + maindex	-255,4	4	52,0	519,1	4,2	0,06
atindex + maindex + saison + milieu	-249,1	11	18,9	521,6	6,8	0,02
atindex + zone	-256,1	5	41,6	522,4	7,6	0,01
1	-260,5	2	104,0	525,1	10,3	0
saison + milieu	-253,2	9	23,1	525,3	10,4	0
maindex	-260,4	3	69,3	526,9	12,1	0
zone	-259,7	4	52,0	527,7	12,8	0
milieu	-259,9	6	34,7	532,1	17,3	0

### E.2.2.3. Répartition spatiale des densités optiques

Les densités optiques obtenues à partir des fèces collectées ont été analysées afin de vérifier si une structure spatiale n'était pas plus informative que le modèle intégrant les densités d'*A. terrestris*. La sélection du modèle par AICc à partir du modèle spatial saturé indique que les coordonnées x expliquent au mieux la répartition des densités optiques (LL= -276,0; AICc= 558,1). Les valeurs prédites à partir de ce modèle montrent un gradient décroissant est/ouest des valeurs de densités optiques (Figure 21). Cependant, la comparaison du modèle spatial au modèle « densités d'*A. terrestris* » (LL= -229,5 ; AICc= 527,0) montre que les coordonnées x sont bien moins informatives que les densités d'*A. terrestris*.

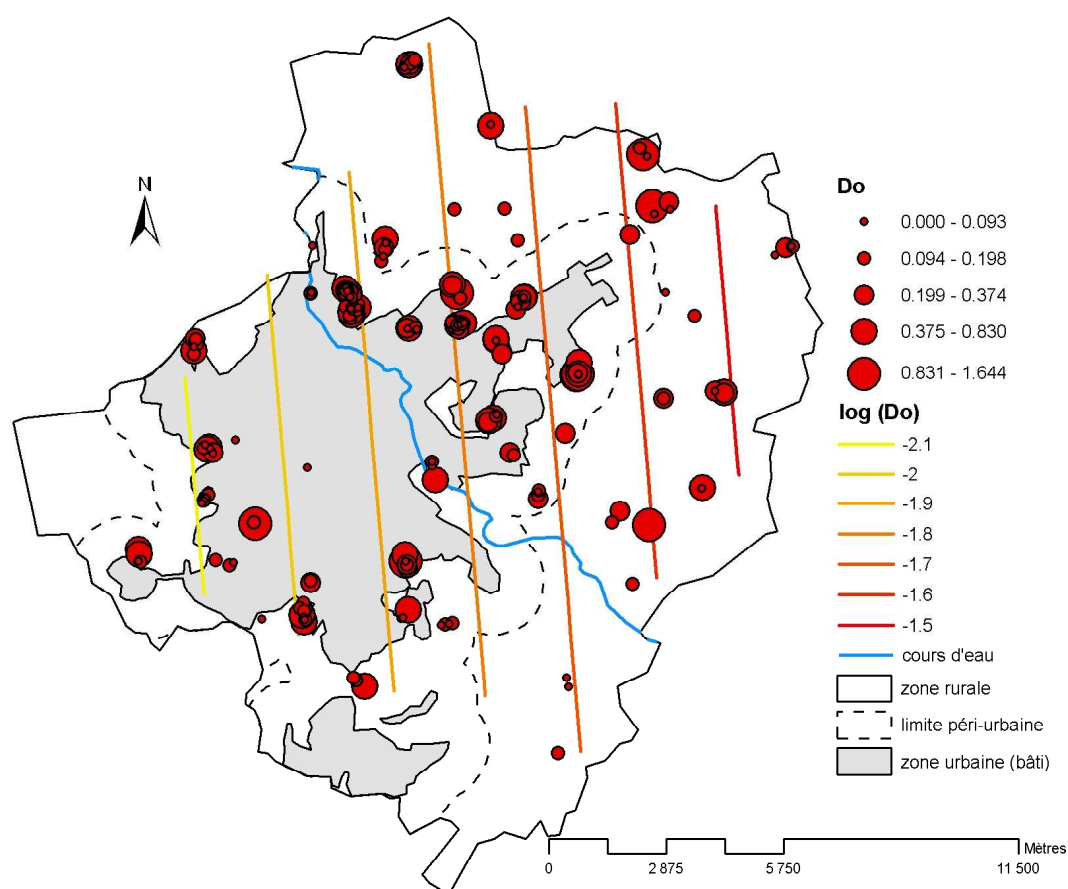


Figure 21: Distribution spatiale des densités optiques de fèces et courbes de tendance des densités optiques prédites à partir du modèle. Un cercle correspond à la mesure de DO effectuée sur une crotte découverte à l'endroit repéré.

### E.3. Discussion

L'étude de l'écologie de la transmission d'*E. multilocularis* à niveau de perception locale a montré une forte variabilité dans l'infection des hôtes intermédiaires. Mondialement, plus de 40 espèces peuvent être hôtes intermédiaires du parasite. Cependant, les différentes espèces présentent une sensibilité à l'infection très variable (développement du parasite et fertilité des kystes plus ou moins efficace selon l'espèce) (Ohbayashi et al. 1971, Rausch 1995) et évoluent dans des conditions biotiques et abiotiques différentes ce qui conduit à des probabilités de contamination différentes. En effet, l'infection d'un hôte intermédiaire ne peut être réalisée que si celui-ci évolue dans



un environnement contaminé, c'est à dire dans des lieux où un hôte définitif infecté a déféqué. Ainsi, la distribution des fèces de renards roux, dans des conditions favorables à la survie des œufs est un élément clef dans la dynamique de transmission du parasite (Giraudoux 2002). Jusqu'à maintenant, seules deux études abordent cette problématique de transmission à échelle locale et aucune ne traite de la problématique des environnements urbanisés (Guislain 2006, Giraudoux et al. 2002).

### **E.3.1. Distribution des fèces de renards roux**

Sur la zone d'étude de l'agglomération de Nancy, aucun effet de l'urbanisation sur les densités de fèces n'a pu être mis en évidence. Tous les auteurs s'accordent sur le fait que les populations vulpines sont plus denses en milieu urbanisé qu'en milieu rural (Trehwella et al. 1988, Baker et al. 2000, Gloor et al. 2001). Cependant, le milieu urbain présente une forte disparité de la distribution des renards roux. Alors que certains secteurs présentent des densités supérieures à 6 adultes/km<sup>2</sup>, d'autres peuvent être exempts de cette espèce (Harris and Rayner 1986). Ceci pourrait expliquer que, au niveau de perception de notre zone d'étude, la densité des fèces ne diffère pas selon le niveau d'urbanisation (urbain, périurbain et rural).

L'étude des densités de fèces sur l'agglomération Nancéienne a mis en évidence que celles des milieux prairiaux étaient sept fois plus importantes en hiver et cinq fois plus importantes au printemps qu'en automne, alors que dans les jardins, elles étaient 4 fois plus faibles au printemps qu'en automne. La variabilité saisonnière des densités de fèces n'est donc pas toujours liée à la dynamique de population du renard roux (minima au printemps et maxima en été). Alors que les densités de fèces des jardins suivent la dynamique des populations vulpines, les prairies présentent une situation inverse. De telles observations de non concordance des densités de fèces aux variations de populations ont déjà été observées par différents auteurs (Cavallini 1994, Giraudoux et al. 2001, Guislain 2006). En effet, l'extrapolation des variations de densités de fèces aux variations de densités de populations ne semble applicable que pour la comparaison de secteurs géographiques à large échelle (Webbon et al. 2004). Cavallini (1994) suggère que la variabilité saisonnière des densités de fèces est plutôt influencée par la vitesse de dégradation des excréments imposée par les conditions climatiques. Mais cette vitesse de dégradation pourrait également être dépendante du type d'habitat, comme cela a été démontré pour les déjections de cervidés (Hemami et Dolman 2005). Notre étude a été

réalisée sur une même période dans divers milieux, et les variations saisonnières observées dans les milieux prairiaux et les jardins pourraient également suggérer une utilisation différentielle de ces habitats par le renard roux.

Le comportement de défécation du renard roux a été étudié par Giraudoux et al. (2002) qui ont mis en évidence des densités de fèces plus importantes dans les bordures de labours et bords de chemins par rapport à d'autres habitats (principalement les prairies). Or, les prévalences d'*E. multilocularis* chez les rongeurs étaient plus importantes dans les bordures de labours, sous entendant des conditions plus favorables de survie des œufs dans ce type de milieu. Guislain (2006) par échantillonnage de différents milieux dont des milieux annexes (bordures de parcelles) a mis en évidence des densités de fèces plus importantes dans les prairies, sur les berges et dans les bordures de parcelles à végétation moyenne et haute. Dans notre étude, les densités de fèces intra-parcellaires sont corrélées aux densités de campagnols *Microtus sp.* et d'*A. terrestris*. Les parcelles à forte densité de campagnols prairiaux sont donc celles où de fortes densités de fèces ont également été relevées. Les populations de *Microtus sp.* sont conditionnées par l'habitat (Partie II). Le type de milieu favorable à ce rongeur, identifié comme les friches sur notre zone d'étude, présente donc les plus fortes densités de fèces. Ainsi, la densité de fèces de renards apparaît plus liée aux densités de rongeurs qu'au type d'habitat. Il reste difficile d'expliquer si cette corrélation est le reflet d'une recherche active de nourriture avec marquage et/ou le reflet d'un dépôt aléatoire des fèces dont les abondances seraient expliquées par une occupation plus fréquente de ce type de milieu. Dans notre étude, les milieux lisières n'ont pas été échantillonnés, or les limites des territoires suivent souvent les lisières, bords de parcelles et cours d'eaux (Artois 1989), il pourrait donc être envisageable que la relation entre les densités de rongeurs et les densités de fèces ne soit pas la même dans les bordures des parcelles et à l'intérieur des parcelles.

Nos résultats montrent que, quel que soit le niveau d'urbanisation, le renard roux défèque préférentiellement dans les lieux à forte densité de *Microtus sp.* et d'*A. terrestris*. De même que pour la distribution des densités de *Microtus sp.* et d'*A. terrestris*, la répartition spatiale des fèces devrait donc être beaucoup plus hétérogène en milieu urbain qu'en milieu rural. Ce comportement de défécation qui favorise la coexistence des fèces d'hôtes définitifs dans les lieux à forte population d'hôtes intermédiaires pourrait donc renforcer la capacité de réalisation du cycle parasitaire en milieu urbain.

### **E.3.2. Avantages et inconvénients de l'approche épidémiologique par technique ELISA**

Nos premiers résultats mettent en évidence l'intérêt de l'utilisation du matériel fécal dans l'étude de l'écologie de la transmission du parasite. En effet, ce type d'approche a l'avantage d'être réalisable à toute échelle spatio-temporelle et permet donc une très grande flexibilité dans l'élaboration des plans d'échantillonnage. De plus, il est aisé d'obtenir des échantillons larges en peu de temps. Dans le cadre de l'évaluation de la contamination environnementale, l'analyse et la collecte des fèces paraît donc plus pertinente que les prévalences déterminées à partir de cadavres de renard roux. En effet, la majorité de la biomasse parasitaire n'est représentée que par quelques individus (cf Partie I), le statut positif ou négatif des hôtes définitifs ne permet donc pas d'évaluer leur rôle dans la contamination de l'environnement. L'analyse des charges parasitaires qui paraît plus adapté, ne donne cependant pas de renseignement sur la distribution des fèces contaminées dans l'environnement. Néanmoins, la situation épidémiologique révélée à travers les tests ELISA fournit une image altérée de la réalité due aux problèmes de sensibilité et de spécificité du test. Les coprotests ELISA détectent moins bien les antigènes de fèces issus d'un individu dont la charge parasitaire est inférieure à 1000 que ceux de fèces d'un individu présentant plus de 1000 vers (Raoul 2001) et il existe des réactions faussement positives dues à des réactions croisées avec d'autres helminthes intestinaux (Malgor et al. 1997, Deplazes et al. 1999, Raoul 2001). La proportion de faux positifs et de faux négatifs est difficile à estimer puisqu'elle dépend du statut de la population étudiée. Ainsi, pour les échantillons issus d'individus à faible charge parasitaire, le niveau d'infection de la population sera sous-estimé. A l'inverse, si une des populations étudiées est parasitée par un helminthe à l'origine de réactions croisées, le niveau d'infection de cette population sera surestimé par rapport aux autres. D'autres types de biais non contrôlés sur le terrain sont également envisageables. En milieu urbain, les possibilités de confusion avec les fèces de chien existent or les chiens domestiques sont susceptibles d'être moins parasités que les renards roux. L'amélioration des techniques d'identification des fèces de renard roux doit être considérée, particulièrement dans les milieux urbains présentant de fortes populations canines. Des techniques moléculaires d'identification de fèces de divers carnivores ont été développées par analyse chromatographique des acides biliaires (Capurro et al.

1997) et plus récemment par analyses et comparaisons d'ADN (PCR de séquences connues ou utilisation de marqueurs microsatellites) (Piggott 2004, Kurose et al. 2005).

L'utilisation de chiens dressés pour la détection et l'identification des fèces d'une espèce particulière a également montré son efficacité (Smith et al. 2003, Smith et al. 2005, Smith et al. 2006). L'utilisation de telles techniques permettrait donc d'améliorer la précision des mesures du niveau d'infection des populations d'hôtes définitifs.

L'analyse des densités optiques des fèces permet d'évaluer les caractéristiques environnementales des fèces déposées par un individu positif mais ne donne cependant pas d'information quant à la présence des œufs dans l'échantillon. En effet, l'excrétion des œufs par un renard parasité débute environ un mois après l'infection (période prépatente) et est ensuite discontinuée (Nonaka et al. 1996, Kapel et al. 2006). Une crotte qui contient des antigènes du taenia *E. multilocularis* ne contient donc pas forcément le stade œuf du parasite. L'identification de ce stade est réalisée par PCR mais la réaction ne permet pas de définir le statut infectieux de l'œuf (Bretagne et al. 1993, Monnier et al. 1996, Dinkel et al. 1998, Mathis et Deplazes 2006). Le test ELISA est donc adapté à l'estimation du niveau d'infection à échelle populationnelle (Raoul et al. 2001), alors que la PCR est utilisée pour l'étude de la contamination environnementale ou pour diagnostiquer l'émission d'œufs par un individu (Zarlenga et Higgins 2001). L'étude de l'effet du microclimat sur la survie des œufs dans l'environnement urbain permettrait de mieux évaluer le risque de transmission. En effet, l'environnement urbain est caractérisé par des conditions climatiques plus chaudes qu'en campagne (effet d'îlot thermique urbain) (Oke et Maxwell 1975). Ces conditions locales additionnées à des conditions microclimatiques variables, pourraient affecter la survie des œufs dans l'environnement et donc la transmission du parasite. Même si la différence de température entre l'air urbain et l'air rural n'est que de quelques degrés, à échelle micro-locale, cet écart de températures peut devenir conséquent (par exemple, si les fèces sont déposées sur une surface bétonnée).

### **E.3.3. Distribution de l'infection des populations fécales**

Stieger et al (2004), à Zürich, mirent en évidence par coprotests ELISA un niveau d'infection plus faible en milieu urbain qu'en milieu péri-urbain. A Sapporo, au Japon, la périphérie urbaine semble également plus contaminée que le centre urbain (Tsukada et al. 2000). La collecte de fèces aux abords des terriers et leur analyse par coprotests

ELISA ont révélé que sur 11 terriers comportant des fèces positives, 10 se situaient en périphérie urbaine, contre un seul terrier en centre urbain. Dans notre étude, la sélection des variables explicatives des densités optiques des fèces récoltées dans les prairies et pâtures a montré que le modèle « zone », le modèle « saison » et le modèle « milieu » étaient équivalents au modèle nul. Aucun effet du niveau d'urbanisation sur les densités de fèces des prairies et pâtures n'a pu être mis en évidence sur notre zone d'étude. Aucun effet de l'urbanisation n'a également été mis en évidence dans les milieux jardins. Les résultats montrent que les densités optiques des fèces sont 2,5 fois plus faibles en hiver qu'en automne. Il apparaît donc que les facteurs associés aux densités de fèces diffèrent en fonction du milieu considéré.

Spatialement et à niveau de perception de la zone d'étude, la distribution des densités optiques montre un gradient décroissant est/ouest comparable à celui observé lors de l'analyse parasitaire des cadavres de renards roux (Partie I). La comparaison du modèle spatial au modèle global utilisant les variables environnementales a montré que ce dernier était plus explicatif. L'analyse globale de l'effet de la saison, du milieu, des densités de *Microtus sp.* et d'*A. terrestris* sur l'ensemble des fèces collectées en 2006 a montré un lien entre densité optique et densité d'*Arvicola terrestris*. Les résultats montrent que les densités optiques des fèces sont négativement corrélées aux densités d'*A. terrestris*. Ainsi, dans notre étude, les fèces les moins contaminées sont plus fréquemment présentes dans les secteurs à forte densité d'*A. terrestris*. Pour *A. terrestris*, les parcelles à forte densité de rongeurs présentent de forte densité de fèces mais de faibles valeurs de densité optique alors que pour *Microtus sp.*, les parcelles à forte densité de campagnols correspondent à de fortes densités de fèces sans qu'un lien avec les densités optiques n'ai pu être démontré. Considérant ces résultats, *A. terrestris* devrait avoir une probabilité de rencontre avec le parasite plus faible que *Microtus sp.* Un piégeage intensif sur les parcelles étudiées, avec comparaison des prévalences, permettrait de vérifier si *A. terrestris* est moins fréquemment infecté que *Microtus sp.* Les résultats présentent également un effet de la saison sur les densités optiques de fèces avec des densités optiques 2,5 fois plus faibles en hiver et au printemps par rapport à l'automne. Ce résultat est en désaccord avec la saisonnalité de l'infection présentant généralement une proportion de coproantigènes positifs plus importante en hiver (Stieger et al. 2002).