

PRÉVALENCE DE L'INFESTATION PAR *DIPHYLLOBOOTHRIUM LATUM*, L., 1758 CHEZ LES PERCHES (*PERCA FLUVIATILIS*) DU LAC LÉMAN

NICOULAUD J.*, YÉRA H.* & DUPOUY-CAMET J.*

Summary: PREVALENCE OF *DIPHYLLOBOOTHRIUM LATUM*, L., 1758 INFESTATION IN *PERCA FLUVIATILIS* FROM THE LAKE LEMAN

Diphyllobothriasis is contracted by consuming raw or undercooked freshwater fish and is still present on the shores of lake Lemman. The aim of this study was to evaluate the prevalence of *Diphyllobothrium latum* plerocercoid larvae in *Perca fluviatilis* from this lake. Four to 10 % of perch filets examined in November 2003, February 2004, April 2004 and January 2005, were infested with *D. latum* larvae. The identification of the larvae was confirmed by PCR and sequencing of the 18S rDNA.

KEY WORDS: *Diphyllobothrium latum*, plerocercoid larva, *Perca fluviatilis*, PCR, 18S rDNA.

Résumé :

La bothriocéphalose se contracte en consommant des poissons d'eau douce crus ou peu cuits et est encore présente sur les rivages du lac Léman. Le but de cette étude était d'évaluer la prévalence des larves plérocercoides de *Diphyllobothrium latum* dans les perches (*Perca fluviatilis*) de ce lac. Des larves de *D. latum* ont été retrouvées dans 4 à 10 % des filets de perche examinés en novembre 2003, février 2004, avril 2004 et janvier 2005. L'identification des larves a été confirmée par PCR et séquençage de l'ADNr 18S.

MOTS CLÉS: *Diphyllobothrium latum*, larve plérocercoides, *Perca fluviatilis*, PCR, ADNr 18S.

La bothriocéphalose est une parasitose intestinale provoquée par l'ingestion de poisson cru, principalement d'eau douce, contenant des larves infestantes d'un cestode pseudophyllidé *Diphyllobothrium latum* (*D. latum*). Le cycle du parasite est complexe et fait intervenir plusieurs hôtes (Von Bonsdorff, 1977; Dick *et al.*, 2001; Bylund, 2003). Les œufs, émis dans l'eau, éclosent en huit à 12 jours dans de l'eau à 16-20° C, et libèrent une larve ciliée qui est ingérée par un crustacé copépode microscopique. Cette larve se transforme alors en une larve procercoïde dans la cavité générale du copépode. Lorsqu'un poisson carnivore ingère ce crustacé planctonique, cette larve se transforme en une larve plérocercoides longue de quelques millimètres. Celle-ci s'enkyste dans la musculature ou les viscères du poisson où elle peut demeurer quiescente plusieurs années, mais est capable de se ré-enkyster à plusieurs reprises chez d'autres poissons prédateurs. En Europe, les poissons susceptibles d'héberger ces larves sont la perche (*Perca fluviatilis*), le brochet (*Esox lucius*), l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*) et la lotte (*Lota lota*). Les corégonidés (féras) et probablement, les salmonidés européens du genre *Salmo* (à la différence des salmonidés canadiens du genre *Onchorynchus*) n'hébergent pas de larves de *D. latum*. L'homme et d'autres mammifères

piscivores se contaminent en ingérant la chair mal cuite de ces poissons contenant des larves plérocercoides. La parasitose est toujours présente voire en ré-émergence autour des lacs alpins de France, de Suisse et d'Italie (Dupouy-Camet & Peduzzi, 2004). Golay & Mariaux (1995) identifiaient, rétrospectivement entre 1980 et 1994, 73 cas autour des lacs de Genève, de Bièvre et de Morat. Sur la rive française du lac Léman, Gregory *et al.* (1998) diagnostiquaient deux cas à Saint-Julien en Genevois. En 2001, nous publions, après une enquête réalisée auprès des 50 laboratoires de Haute-Savoie, 22 cas diagnostiqués entre 1993 et 2000 (Desvois *et al.*, 2001) et nous avons pu identifier en 2001 et 2002, 48 cas de contamination sur les bassins versants suisses et français (Dupouy-Camet & Peduzzi, 2004). Nous avons complété cette enquête sur les cas humains par la recherche de larves plérocercoides dans des filets de perches pêchées dans le lac Léman.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons pu examiner au total 200 filets de *Perca fluviatilis*, pesant de 7,5 g à 15 g, achetés sur le port de pêche de Thonon-les-Bains entre novembre 2003 et janvier 2005. Chaque filet était examiné et coupé en fines tranches de 2-3 mm d'épaisseur et les larves recueillies ont été conservées dans de l'alcool à 70° à - 20° C jusqu'au moment de leur analyse. La morphologie des larves a été observée à la loupe binoculaire (X 25). La confirmation de l'espèce

* Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Cochin/Université René Descartes, 27, Faubourg Saint-Jacques, 75014, Paris, France. Correspondant : Pr Jean Dupouy-Camet. Tél.: 33 (0)1 58 41 22 51 - Fax : 33 (0)1 58 41 22 45. Email : jean.dupouy-camet@cch.ap-hop-paris.fr

a été faite par analyse génétique après amplification par PCR et séquençage de la région 18S sur le gène de l'ARN ribosomal.

L'ADN a été extrait selon le protocole tissu du kit QIAamp DNA Mini kit® (Qiagen). En raison de sa longueur, l'amplification de la région 18S s'est faite en amplifiant deux fragments chevauchants. Le premier fragment de 1000 paires de base (pb) a été obtenu en utilisant l'amorce 81 (5'-TTC ACC TAC GGA AAC CTT GTT ACG-3') et l'amorce 83 (5'-GAT ACC GTC CTA GTT CTG ACC A-3'). Le second fragment de 1300 pb a été amplifié en utilisant l'amorce 82 (5'-CAG TAG TCA TAT GCT TGT CTC AG-3') et l'amorce 84 (5'-TCC TTT AAG TTT CAG CTT TGC-3'). Toutes ces amorces ont été précédemment décrites (Mariaux, 1998). La composition du mélange réactionnel, sous un volume final de 50 µl était la suivante. Pour la PCR 81-83, 200 µM de chaque dNTP, 1,5 mM de MgSO₄, 1 U de Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Eragny, Val d'Oise) et 0,2 µM de chaque amorce étaient utilisés. Pour la PCR 82-84, 400 µM de chaque dNTP, 1,5 mM de MgSO₄, 2 U de Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) et 0,4 µM de chaque amorce étaient utilisés. La réaction d'amplification a comporté les étapes suivantes : dénaturation de cinq minutes à 94°C suivie de 38 cycles comprenant 30 s à 94°C, 40 s à 55°C (45°C pour la PCR 82-84), 1 min. 30 s à 68°C, avec une élongation finale de 10 min. à 68°C.

Les séquences obtenues ont été comparées à celles disponibles dans la base de données d'acides nucléiques GenBank et à celle obtenue à partir d'un *D. latum* adulte expulsé par un patient vivant sur les bords du lac Léman.

RÉSULTATS

Quatorze larves plérocercoides ont pu être retrouvées dans les 200 filets de *Perca fluviatilis*. Les filets parasités ne l'étaient que par une seule larve (figure 1). Les taux d'infestation variaient entre 4 et 10 % et les taux les plus bas ont été retrouvés en Avril (tableau I). L'identification moléculaire a confirmé l'identification microscopique. L'amplification suivie d'un séquençage double brin nous a permis d'obtenir la séquence quasi-complète de la région 18S (2101 pb) sur le gène de l'ARNr. Les séquences obtenues à partir de l'ADN des larves étudiées sont identiques aux séquences partielles référencées dans GenBank par Mariaux (numéros d'accession Z98416, Z98417 et Z98418). D'autre part, les séquences issues des larves étudiées (numéro d'accession DQ181941) se révèlent identiques à celle du ver adulte (numéro d'accession DQ181942). Aucune variation intra spécifique au sein des séquences étudiées n'a été décelée entre les différents isolats recueillis. D'autres vers ont



Fig. 1. - Larve de *Diphyllobotrium latum* encapsulée dans un filet de perche.

Date	Nombre de filets	Poids moyen des filets	Nombre de larves plérocercoides (%)
Novembre 2003	50	15 g	3 (6 %)
Février 2004	50	10 g	5 (10 %)
Avril 2004	50	7,5 g	2 (4 %)
Janvier 2005	50	14,5 g	4 (8 %)

Tableau I. – Résultat de l'examen de 200 filets de perche prélevés en 2003, 2004 et 2005 dans le lac Léman.

également été mis en évidence à la surface de ces filets. L'aspect microscopique différent de ceux des larves plérocercoides de *D. latum* et l'analyse des séquences a permis d'identifier *Proteocephalus* sp. probablement *P. percae* (numéro d'accession DQ181940) et *Acanthocephalus* sp. probablement *A. lucii* (numéro d'accession DQ147605) (Hanzelova *et al.*, 1999).

DISCUSSION

Les données vétérinaires sur l'infestation des poissons dans le lac Léman sont rares et anciennes. Ainsi, jusqu'à aujourd'hui, à part une très ancienne thèse de médecine (Ketchekian, 1909, cité par Bouvier *et al.*, 1963) où l'on apprend que 58 % des perches du Léman étaient porteuses de larves plérocercoides, on ne savait rien ou presque sur le degré d'infestation de ces poissons. En revanche, on dispose d'une littérature plus abondante et plus récente sur l'infestation des perches d'autres lacs, suisses ou italiens. On apprend ainsi que la prévalence est nulle dans les lacs de Lugano, Varèse et Neuchâtel. En revanche, les taux d'infestation sont de 7,8 % dans le lac Majeur (Peduzzi & Boucher-Rondoni, 2001), de 5,2 % dans le lac Morat, de 3,7 % dans le lac de Bièvre (Golay & Mariaux, 1995), et de 3 % dans le

lac de Brienz (Nicoulaud & De Bruyne, données non publiées, examen de 32 filets de perche en janvier 2005). Les prévalences d'infestation peuvent être parfois très élevées : dans le lac d'Orta, 33,3 % des perches étaient parasitées (Peduzzi & Boucher-Rondoni, 2001). Il existe autour et sur le lac Léman une pêche professionnelle et de loisir. Sur ce lac, environ 150 pêcheurs professionnels et 5000 amateurs ont capturé en 2002, environ 800 tonnes de poisson dont 37,6 % de perches et 6,3 % d'ombles chevalier (Service des forêts, de la faune et de la nature. État de Vaud, 2003). Cette pêche est consommée directement par les pêcheurs ou vendue en poissonnerie ou aux nombreux restaurants situés sur les bords du lac, qui proposent parfois des recettes à base de poissons crus. Ces habitudes et la prévalence élevée de l'infestation des *Perca fluviatilis* expliquent la présence des cas de bothriocéphalose. De plus, notre étude n'a pas permis de mettre en évidence de variabilité entre les séquences obtenues à partir des différentes larves comme pouvait le laisser supposer le faible taux de mutation de l'ADNr 18S (Hillis & Dixon, 1991). Les larves issues des filets de perches et le ver adulte retrouvé chez un patient vivant sur les bords du lac Léman possèdent d'ailleurs les mêmes séquences d'ADNr 18S. Il serait alors intéressant d'utiliser d'autres cibles génomiques pour apprécier la biodiversité génétique de la population larvaire de *D. latum* au sein du lac Léman. Le maintien du cycle du bothriocéphale est un indicateur de pollution fécale du milieu lacustre. De gros progrès ont été faits pour éliminer le rejet des eaux usées dans les lacs, mais l'efficacité probablement imparfaite des stations d'épuration ainsi que les nombreux plaisanciers volontiers pêcheurs, expliquent le maintien du cycle parasitaire. Ce cycle complexe est compensé par la prolificité du parasite : un seul ver est capable d'émettre un à plusieurs millions d'œufs par jour. La construction de stations d'épuration contribue à lutter contre la parasitose (Von Bonsdorf, 1977; Bylund, 2003) mais il subsiste toujours quelques habitations non raccordées. Autour du lac Léman, 89 à 98,6 % (selon les sources) de la population du bassin versant sont raccordés aux 159 stations d'épuration (CIPEL, 2000). Il est donc nécessaire d'informer les consommateurs des risques liés à la consommation de poissons crus ou mal cuits de certains lacs. La cuisson à 55°C tue les larves plérocercoides en cinq minutes, la congélation à -10°C tue la larve en huit à 72 heures selon l'épaisseur du poisson (Feachem *et al.*, 1983). La fumaison ne tue pas le parasite (Beldsoe & Oria, 2001). La bothriocéphalose est toujours présente sur les berges du lac Léman. La mode du carpaccio, du sushi et la multiplication des restaurants servants ce genre de plats risquent d'en augmenter l'incidence. Il semble important de surveiller régulièrement les taux d'infestation des perches du Léman pour apprécier l'évolution de la parasitose.

RÉFÉRENCES

- BELDSOE G.E. & ORIA M.P. Potential hazards in cold-smoked fish: parasites. *Journal of Food Science*, 2001, 66 (Suppl.), 1100-1103.
- BONSDORFF VON B. Diphyllbothriasis in man. Academic Press, Londres, 1977, 189 p.
- BOUVIER G., HORNING B. & MATTHEY G. La diphyllbothriose en Suisse, plus spécialement en Suisse romande. *Bulletin de l'Académie Suisse de Sciences Médicales*, 1963, 19, 364-374.
- BYLUND G. *Diphyllbothrium latum*, in: Parasites of the colder climates. Akuffo H., Linder E., Ljungström I. & Wahlgren M. (eds). Taylor & Francis, London & New York, 2003, 169-176, 359 pages.
- CIPEL (COMMISSION INTERNATIONALE POUR LA PROTECTION DES EAUX DU LÉMAN). Plan d'action 2001-2010 en faveur du Léman, du Rhône et de leurs affluents, 2000. Consulté le 30-08-2005. <http://www.cipel.org/sp/IMG/pdf/PAC-oct2000-FR.pdf>
- DESVOIS L., GREGORY A., ANCELLE T. & DUPOUY-CAMET J. La bothriocéphalose humaine est toujours présente en France. Enquête effectuée en Haute-Savoie entre 1993 et 2000. *Parasite*, 2002, 9, 89-90.
- DICK T.A., NELSON P.A. & CHOUDHURY A. Diphyllbothriasis: update on human cases, foci, patterns and sources of human infections and future considerations. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 200, 32 (suppl. 2), 59-76.
- DUPOUY-CAMET J. & PEDUZZI R. Current situation of human diphyllbothriasis in Europe. *Eurosurveillance*, 200, 9, 31-35.
- FEACHEM R., BRADLEY D., GARELICK H. & MARA D. *Diphyllbothrium* and diphyllbothriasis in Sanitation and disease: Health aspects of excreta and wastewater management. World Bank report, 1983; N° 11616: 407-411. Consulté le 30-08-2005. <http://www.leeds.ac.uk/civil/cei/water/tphe/publicat/watsan/sandis/sandis.html>
- GOLAY M. & MARIAUX J. Situation de *Diphyllbothrium latum* L., 1758, dans quatre lacs du plateau suisse. *Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles*, 1995, 118, 79-86.
- GREGORY A., GARDIEN E. & FASSIER N.P. Bothriocéphalose (parasitose à *D. latum*). Étude de deux cas. *Feuillets de Biologie*, 1998, 39, 65-67.
- HANZELOVA V., SCHOLZ T., GERDEAUX D. & DE CHAMBRIER A. Endoparasitic helminths of the fishes in three alpine lakes in France and Switzerland. *Revue Suisse de Zoologie*, 1999, 106, 581-590.
- HILLIS D. & DIXON M. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, 199, 66, 411-453.
- MARIAUX J. A molecular phylogeny of the eucestoda. *Journal of Parasitology*, 1998, 84 (1), 114-124.
- PEDUZZI R. & BOUCHER-RODONI R. Resurgence of human bothriocéphalosis (*Diphyllbothrium latum*) in the subalpine lake region. *Journal of Limnology*, 2001, 60, 41-44.
- SERVICE DES FORÊTS, DE LA FAUNE ET DE LA NATURE. État de Vaud. Inspection de la pêche, Statistiques 2003. Consulté le 30-08-2005. http://www.dse.vd.ch/forets/peche/stats/pdf/tableau_leman.pdf

Reçu le 4 juin 2005
 Accepté le 8 septembre 2005