

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Eco-épidémiologie

Présentée et soutenue publiquement par

MATTHIEU BASTIEN

Le 2 mai 2017

**Contamination des terrains potagers par *Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii*
et *Toxocara* spp., parasites responsables de zoonoses transmises par l'alimentation.**

Thèse dirigée par **MARIE-LAZARINE POULLE**

JURY

Mme Laurence MILLON,
Mme Marie-Lazarine POULLE,
M. Peter DEPLAZES,
M. Francis RAOUL,
Mme Isabelle VILLENA,
M. Benoît COMBES,

Professeur,
Ingénieure de recherche,
Professeur,
Maître de Conférences HDR,
Professeur,
Directeur,

Université de Bourgogne-Franche Comté,
CERFE, Université Reims-Champagne-Ardenne,
Université de Zurich,
Université de Bourgogne-Franche Comté,
Université Reims-Champagne-Ardenne,
Entente de Lutte contre les Zoonoses,

Présidente
Directrice de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Invité



THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Eco-épidémiologie

Présentée et soutenue publiquement par

MATTHIEU BASTIEN

Le 2 mai 2017

Contamination des terrains potagers par *Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii* et *Toxocara* spp., parasites responsables de zoonoses transmises par l'alimentation.

Thèse dirigée par **MARIE-LAZARINE POULLE**

JURY

Mme Laurence MILLON,	Professeur,	Université de Bourgogne-Franche Comté,	Présidente
Mme Marie-Lazarine POULLE,	Ingénieure de recherche,	CERFE, Université Reims-Champagne-Ardenne,	Directrice de thèse
M. Peter DEPLAZES,	Professeur,	Université de Zurich,	Rapporteur
M. Francis RAOUL,	Maître de Conférences HDR,	Université de Bourgogne-Franche Comté,	Rapporteur
Mme Isabelle VILLENA,	Professeur,	Université Reims-Champagne-Ardenne,	Examinatrice
M. Benoît COMBES,	Directeur,	Entente de Lutte contre les Zoonoses, Invité	



« Donne à ton corps la nourriture et la boisson qui conviennent »

(Pythagore, VI^{ème} siècle avant J-C)

Remerciements

Ce travail de thèse n'aurait pas pu être réalisé sans la participation et l'implication d'organismes, de laboratoires et de nombreuses personnes que je tiens à remercier.

Je remercie le Conseil Général des Ardennes, le conseil Général de Moselle et l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) pour leur soutien financier.

Mes plus sincères remerciements au Pr Peter DEPLAZES et au Dr Francis RAOUL qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail et au Pr Isabelle VILLENA et au Pr Laurence MILLON pour avoir accepté d'examiner ce manuscrit.

Ma plus profonde et respectueuse gratitude va au Dr Marie-Lazarine POULLE qui a dirigé ce travail et m'a permis de bénéficier de son expérience et de son encadrement. C'est notamment grâce à de nombreux « brain storming » que nous avons pu construire et réaliser ce travail. Jamais à court de conseils et toujours disponible pour répondre à mes questions ou corriger un petit (ou gros) texte, ce fût un réel plaisir de travailler ensemble. Qu'elle soit donc assurée de ma plus sincère et amicale considération pour m'avoir fait confiance tout au long de cette thèse. Je tiens à souligner particulièrement ton soutien tant personnel que professionnel qui a été fort précieux tout au long de cette thèse. Merci !

Toute ma reconnaissance s'adresse également à Mr Benoît COMBES, directeur de l'Entente Interdépartementale de Lutte contre les Zoonoses (ELIZ) qui m'a fait confiance pour mener à bien ce projet, et m'a permis de faire partie de cette structure au service de la population. Je tiens également à lui adresser mes remerciements pour les discussions constructives et les conseils que nous avons pu échanger. Merci également à Mr Jean-Paul BOLMONT, président de l'ELIZ à mes débuts de thèse, sans qui ce projet n'aurait pas vu le jour et à Mr Franck DAVID, actuel président qui continue à me faire confiance.

Je remercie sincèrement le Pr. Isabelle VILLENA et le Dr Dominique AUBERT pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire Protozooses Transmises par l'ALimentation (PROTAL-EA3800) de l'Université de Reims Champagne-Ardenne et d'avoir engagé des moyens humains, matériels et financiers pour le bon déroulement de ce travail. Je les remercie également pour leurs conseils avisés et pour leurs relectures constructives.

Je remercie l'unité de Surveillance Eco-Epidémiologique des Animaux Sauvages (SEEpIAS) de l'ANSES de Nancy d'avoir pris en charge, tant financièrement que matériellement la majorité des analyses moléculaires effectuées au cours de cette étude. Je tiens à adresser tout particulièrement mes plus sincères remerciements au Dr Franck BOUE et à Gérald UMHANG pour les (très) nombreuses heures passées à trouver des solutions pour isoler ces petits œufs. Merci Franck de m'avoir appris à « aspirer » un à un les œufs d'Echino et pour le temps que tu y as passé. Merci Gérald pour tous nos échanges constructifs et cette super collaboration qui j'espère va continuer un petit peu ! Je tiens également à remercier ici tous les techniciens de l'unité qui ont tous mis la main à la ... pâte, que ce soit sur le terrain ou au labo : Jean-Michel DEMERSON, Christophe

CAILLOT, Jean-Marc BOUCHER, Vanessa HORMAZ et Camille RENAULT. Un grand merci également à Céline RICHOME pour ses nombreux conseils avisés lors de mes visites à Nancy !

Je tiens à remercier sincèrement Estelle GERMAIN, Julian PICHENOT et toute l'équipe du CROC pour leur aide précieuse quant à la collecte d'échantillons à Faxe et aux conseils avisés de tous ! Merci beaucoup Estelle de ton implication dans mon travail et tes nombreux conseils toujours très pertinents.

Une mention spéciale pour le Dr Amélie VANISCOTTE sans qui les analyses statistiques présentées dans ce travail n'auraient jamais été aussi poussées. Merci beaucoup du temps que tu as investi avec moi, même dans l'extrême urgence de la fin de rédaction. Merci de m'avoir initié au monde vaste et complexe de la modélisation statistique et merci pour tous tes autres conseils !

Un grand merci à mes « nouveaux » collègues de bureau Vincent RATON et Stéphanie FAVIER, (enfin pas si nouveaux que ça) qui n'ont pas hésité à braver la pluie, le vent, et les crottes de chats dans les potagers ! Merci beaucoup pour votre bonne humeur au quotidien.

Ce travail n'aurait sans doute pas été aussi fourni également sans l'aide des stagiaires qui ont bien voulu participer à mon aventure. Un grand merci donc à :

- Frédérique GOLIOT qui a permis d'avancer un peu les analyses moléculaires.
- Valentin GOULEY sans qui les travaux sur les rongeurs n'auraient pas été possibles. Merci de ton efficacité, de ton autonomie et de ton travail soigné.
- Alice PIERELET qui a permis de compléter le travail sur les rongeurs et grâce à qui nous avons la preuve en image de la visite des renards dans les potagers.
- Marine FAISSE qui a engagé un travail de longue haleine avec cette « maudite » terre. Un immense merci Marine pour ta bonne humeur, ta ténacité et ton super travail qui nous a permis, même si ton stage n'a pas suffi, à mettre au point cette technique de détection des œufs d'Em dans le sol.

Etudier la contamination des jardins potagers implique de travailler en étroite collaboration avec les propriétaires des parcelles. Pour cela, je remercie l'ensemble des personnes ayant accepté que l'on parcourt leur potager à la recherche de crottes ! Merci également à toutes nos personnes contact dans les différents villages pour nous avoir permis d'obtenir un échantillon suffisant de potagers. Bien entendu, je tiens à remercier tout particulièrement certaines personnes qui ont permis de rendre plaisant la collecte de crottes de carnivores :

- Mr et Mme HELDER, c'était un réel plaisir de vous avoir rencontré et d'avoir pu profiter des merveilleux repas chauds et des discussions intéressantes que vous nous avez proposées ! Sans oublier les pots de confitures, les gâteaux ou les restes pour repartir ! Un immense merci à vous deux !
- Mr et Mme SIMONETTA, un grand merci également pour votre super bonne humeur, vos repas délicieux et le temps que vous m'avez accordé. Sans oublier non plus le ré-approvisionnement à chaque fois pour repartir : confiture, œufs... Un immense merci pour tout !

- Roseline et Edouard BERRY, sans oublier les filles de m'avoir nourri, logé et d'avoir rameuté une bonne partie du village à la cause de la prévention de l'échinococcose alvéolaire ! Un immense merci !

Je tiens à remercier également tous ceux qui ont partagé mon quotidien au CERFE : Clara, Julie, Carole, Rémi, Pauline, Phiphi, sans oublier la maison de la nature ! Merci à vous pour votre bonne humeur et les petits moments de détente !

Je souhaite remercier tout particulièrement mon encadrant de stage de M2 mais surtout devenu ami Camille LEBARBENCHON qui, malgré les 11 000kms de distance, ne m'a jamais lâché et était toujours là pour me donner des petits conseils sur le déroulement d'une thèse ! Merci pour tout Camille.

Un grand merci à tous mes amis hors-labo et recherche, pour qui, même si la thèse ne leur parle pas, compatissent et me soutiennent. Un merci spécial pour ma Lisette qui a toujours le mot qui fait rire ! Sans oublié bien entendu l'étoile bleue Vouziers ! Merci de m'avoir permis de m'évader un peu de cette thèse, sur les terrains de basket ardennais.

Enfin, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à ma famille et belle-famille sans qui ce travail n'aurait pas pu se faire. Merci particulièrement à mes parents qui ont su me faire confiance dans tous mes choix et ce, depuis ce jour où je suis parti quelques mois en Allemagne, loin de la maison... Merci de me soutenir dans mon parcours ! Merci à mon frère et Caro de me soutenir également malgré la distance ! Un grand merci à ma Nono de comprendre que son parrain n'a pas toujours le temps d'être présent pour elle mais ne t'inquiète pas, je vais me rattraper ! Merci à mes beaux-parents, belles-sœurs et beau-frère, de m'avoir soutenu et de vous être autant intéressés à mon travail. Enfin, toi qui partage ma vie, Fanny, merci de m'avoir supporté, épaulé, rassuré, fais confiance et assisté à de maintes reprises, je ne te remercierais jamais assez ! Une petite mention particulière pour ce petit être en devenir qui m'a permis de beaux moments d'évasion en cette fin de thèse !

Résumé

Les canidés et félidés peuvent être hôtes définitifs d'*Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii* ou *Toxocara* spp., parasites responsables de zoonoses transmissibles par l'alimentation. La consommation crue de fruits et légumes porteurs de leurs œufs ou oocystes peut être source de contamination humaine. Cette étude visait à évaluer et caractériser le risque d'exposition humaine lié au dépôt de fèces de chat, chien et renard dans les terrains potagers localisés en régions d'endémie. Ce dépôt s'est avéré important dans certains potagers des Ardennes. De plus, l'ADN d'*E. multilocularis* et *Toxocara* spp. a été détecté dans 1/3 des fèces collectées et 23% des rongeurs piégés autour des potagers ont été trouvés infectés par au moins un des parasites d'intérêt, confirmant le risque d'exposition des hôtes intermédiaires. Parallèlement, l'identification précise des facteurs responsables du dépôt de fèces de carnivores a été conduite sur 192 potagers familiaux ou professionnels des Ardennes et de la Moselle. Au total, 1016 fèces de carnivores (59% de chat, 31% de renard et 10% de chien) ont été collectées au cours de huit sessions de prospection. Par modélisation, nous avons montré que la présence d'une clôture limite très efficacement le dépôt de fèces de renard, tandis que la présence de rongeurs ou d'arbres fruitiers à proximité le favorise. Enfin, la mise au point d'une méthode sensible a permis la détection de l'ADN d'*E. multilocularis* et *Toxocara* spp. dans 42% et 12% des terrains potagers. Au final, l'exposition humaine aux parasites étudiés semble élevée dans certains potagers. Des mesures de prévention basées sur les résultats de l'étude sont proposées.

Mots clés : parasites transmis par l'alimentation, fèces de carnivore, zoonoses, prévention, risque d'exposition, contamination environnementale.

Abstract

Canids and Felids can be definitive hosts of *Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii* and *Toxocara* spp., which are food-borne parasites responsible of zoonoses. The consumption of raw fruit or vegetables carrying their eggs or oocysts can be source of human contamination. This study aimed to assess and characterize the risk of human exposure linked to the faecal deposition by cats, red foxes and dogs in kitchen gardens located in endemic areas. This deposit was found to be important in some kitchen gardens located in the Ardennes region. Furthermore, DNA of *E. multilocularis* and *Toxocara* spp were detected in 1/3 of the collected faeces and 23% of the rodents trapped in kitchen gardens proximity were found infected with at least one of the canids or felids parasites, confirming the risk of intermediate host exposure. Concurrently, the accurate identification of factors responsible for carnivore faeces deposit was conducted from eight prospection sessions of 192 kitchen gardens, family or professional ones, located in the Ardennes and Moselle regions. A total of 1016 carnivore faeces (59% from cats, 31% from foxes and 10% from dogs) were collected. By using models to test the effect of various variables on faeces deposit, we showed that fencing efficiently limits fox faeces deposit whereas presence of rodents or fruit trees in the vicinity increases it. Finally, thanks to the development of a sensitive method, *E. multilocularis* and *Toxocara* spp. DNA was detected in 42% and 12% of the kitchen gardens. In conclusion, the human exposure to canids and felids foodborne parasites seems high in certain kitchen gardens. Prevention methods are proposed based on our results.

Key words : food-borne parasites, carnivore faeces, zoonoses, prevention, exposure risk, environmental contamination.

Liste des Figures

Figure I.1. Exemple d'un cycle parasitaire complexe et d'un cycle parasitaire simple.....	9
Figure I.2. Cycle du parasite <i>Echinococcus multilocularis</i>	14
Figure I.3. Cycle de développement des parasites <i>Toxocara</i> spp.....	15
Figure I.4. Cycle de développement du parasite <i>Toxoplasma gondii</i>	17
Figure I.5. Distribution géographique estimée de l'échinococcose alvéolaire	18
Figure II.B.1 The number of carnivore faeces collected in the 55 (out of 94) sampled kitchen gardens in which at least one stool was collected; a) the number of cat, fox, dog and unidentified faeces; b) the number of faeces that yielded positive results for the detection of <i>Toxocara</i> spp., <i>Echinococcus multilocularis</i> or <i>Toxoplasma gondii</i> , as well as the number of faeces with DNA inhibitors.	55
Figure II.C.1. Mean number of fox faeces collected per m ² surveyed.....	76
Figure II.C.2. Mean number of red foxes hunted per winter.	77
Figure III.B.1. Localization of the two study areas in France. Distribution of the prospected villages. Distribution of the kitchen gardens sampled in one village.	105
Figure III.B.2. Correlation circle of the Principal Components Analysis (PCA) and village cluster dendrogram.	106
Figure III.B.3. Mean number of fox faeces, cat faeces and dog faeces found per hectare prospected in enclosed, half-open and open kitchen gardens.	107
Figure III.B.4. Variable effects for the full model for (a) fox faeces deposit model and (b) and cat faeces deposit model.	109
Figure III.B.5. Spatial distribution of the kitchen gardens and kitchen garden with positive <i>E. multilocularis</i> faeces.	112
Figure III.B.6. Semi-variogram for each 160 m distance classes estimated for the residuals of the null GLMMs fitted to <i>Echinococcus multilocularis</i> and <i>Toxocara</i> spp. prevalence in fox faeces.	113
Figure III.B.7. Estimation of the amount of total faeces and parasitized faeces turnover deposited by fox, cat or dog every 6 weeks.....	113
Figure IV.C.1. Proportions de fèces positives dans les potagers dans lesquels les 5 échantillons de sol étaient négatifs et dans les potagers dans lesquels au moins un des 5 échantillons de sol était positif.	154
Figure IV.C.2. Information diffusée en avril 2015 dans le bulletin de la Communauté de communes de l'Argonne Ardennaises.	155
Figure V.1. Représentation schématique des différentes options de contrôle et de prévention de l'échinococcose alvéolaire.....	168

Liste des Tableaux

Tableau II.B.1. Primers and hydrolysis probes used to detect <i>Echinococcus multilocularis</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> and <i>Toxocara</i> spp. parasites, and carnivore host identification of copro-samples.	53
Tableau II.B.2. Concordance matrix between faeces identification based on morphological assessment and on molecular analysis.	54
Tableau II.B.3. Occurrence of cat, fox, dog and unidentified faeces collected in kitchen gardens that yielded positive qPCR results for the detection of <i>Echinococcus multilocularis</i> , <i>Toxocara</i> spp. or <i>Toxoplasma gondii</i> DNA as compared to the total number of faeces that yielded qPCR results for the given emitters and parasites.	54
Tableau II.C.1. Information about the dataset used to assess fox faeces and cat faeces densities inside and outside kitchen gardens.	78
Tableau II.C.2. Occurrence of rodent species according to their exposure to kitchen gardens, and infectious status.	79
Tableau III.A.1. Matrice de concordance entre l'identification de l'hôte des fèces réalisée sur le terrain sur la base de la morphologie de la crotte et l'identification réalisée par biologie moléculaire.	85
Tableau III.B.1. Model comparison for fox faeces deposits.	108
Tableau III.B.2. Variables backward selection in GLMM for the fox faeces deposit and the cat faeces deposit.	108
Tableau III.B.3. Model comparison for cat faeces deposit.	110
Tableau III.B.4. Occurrence of fox faeces, cat faeces and dog faeces collected in kitchen gardens that yielded positive qPCR results for the detection of <i>Echinococcus multilocularis</i> , <i>Toxocara</i> spp and <i>Toxoplasma gondii</i> DNA.	110
Tableau III.B.5. Number of kitchen gardens according to the number of host species identified as emitter of the collected stools and according to the detected parasitic species DNA.	111
Tableau IV.B.1. Sensitivites (in %) of the flotation/sieving method combined with DNA extraction and detection by real-time PCR for <i>E. multilocularis</i> and <i>Toxocara</i> spp. in soil samples (10 or 20g).	136
Tableau IV.B.2. <i>E. multilocularis</i> and <i>Toxocara</i> spp. Infection level of collected feces in kitchen gardens according to the carnivores identified.	136
Tableau IV.B.3. Parasitological status of fecal and soil samples according to their position depending on the feces	136
Tableau IV.C.1. Distribution des 50 potagers échantillonnés en fonction de la présence/absence de fèces, de l'espèce (ou des espèces) émettrice(s) des fèces présentes et des résultats de la détection de l'ADN d' <i>E. multilocularis</i> et <i>Toxocara</i> spp. dans les cinq échantillons de terre prélevés par potager.	154

Principales publications et communications sur le sujet

Publications

Poulle, M.-L., **Bastien, M.**, Richard, Y., Dupuis E., Aubert D., Villena I., Knapp J. Detection of *Echinococcus multilocularis* and other foodborne parasites in fox, cat and dog feces collected in kitchen gardens from an alveolar echinococcosis endemic area. Soumis à Veterinary Parasitology.

Bastien M., Vaniscotte A., Combes B., Umhang G., Germain E., Gouley V., Pierlet A., Quintaine T., Forin-Wiart M-A., Villena I., Aubert D., Boué F. and M-L. Poulle. High density of fox and cat faeces in kitchen

gardens and resulting rodent exposure to *Echinococcus multilocularis* and *Toxoplasma gondii*. Soumis à *Folia Parasitologica*.

Bastien M., Vaniscotte A., Combes B., Umhang G., Raton V., Germain E., Villena I., Aubert D., Boué F. and M-L. Poulle. Fox, cat and dog faeces deposit in kitchen gardens: drivers and patterns of contamination in some rural hot spots of food borne zoonosis transmission. En préparation.

Umhang G., **Bastien M.**, Renault C., Faisse M., Caillot C., Boucher J-M., Hormaz V., Poulle M-L and F. Boué. Development of a flotation/sieving method to detect *Echinococcus multilocularis* eggs by real-time PCR in soil samples. Soumis à *Parasites*.

Bastien M., Umhang G., Combes B., Raton V., Faisse M., Germain E., Villena I., Aubert D., Vaniscotte A., Boué F. and M-L. Poulle. Contamination du sol par *Echinococcus multilocularis* and *Toxocara* spp. dans des potagers familiaux fréquentés par des renards, chats et chiens. En préparation.

Communications orales

Bastien M., Combes B., Umhang G., Comte S., Raton V., Germain E., Boué F. and M-L. Poulle (2014). Contamination of kitchen gardens by *Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii* and *Toxocara* spp. in northeastern France. European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (ESCCAP), Vilnius, Lithuania.

Bastien M., Vaniscotte A., Combes B., Umhang G., Raton V., Germain E., Villena I., Aubert D., Boué F. and M-L. Poulle (2016). Risk factors for kitchen gardens contamination by *Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii* and *Toxocara* spp. in northeastern France. 12th European Multicollloquium of Parasitology, Turku, Finland.

Bastien M., Combes B., Umhang G., Gouley V., Guislain M-H., Quintaine T., Forin-Wiart M-A., Geers R., Villena I., Raton V., Boué F. et M-L. Poulle (2016). Les terrains maraichers, lieux à risque de contamination par *Echinococcus multilocularis* et *Toxoplasma gondii*. Congrès de la Société Française de Parasitologie, Grenoble, France.

Bastien M., Combes B., Umhang G., Vaniscotte A., Gouley V., Guislain M-H., Quintaine T., Forin-Wiart M-A., Raton V., Villena I., Germain E., Boué F. et M-L. Poulle (2016). Prévention de la contamination parasitaire des terrains maraichers par *Echinococcus multilocularis*, *Toxocara* spp. et *Toxoplasma gondii* dans le Nord-Est de la France. Journée Parasites et aliments de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL), Paris, France.

Communications affichées

Bastien M., Combes B., Umhang G., Conte S., Raton V., Boué F. et M-L. Poulle (2014). Caractérisation du risque de contamination parasitaire des terrains maraichers par *Echinococcus multilocularis*, *Toxocara* spp. et *Toxoplasma gondii*. Congrès de la Société Française de Parasitologie, Reims, France.

Bastien M., Combes B., Umhang G., Germain E., Raton V., Boué F., Villena I. et M-L. Poulle (2015). Prévention de la contamination parasitaire des potagers par *Echinococcus multilocularis*, *Toxocara* spp. et *Toxoplasma gondii* dans le Nord-Est de la France. Rencontre Scientifique CIFRE, Agence Nationale pour la Recherche et Technologie (ANRT), Paris, France.

Table des matières

I. INTRODUCTION GENERALE	1
A. Risque zoonotique lié à l'alimentation	3
1. Prévenir les zoonoses : un enjeu à l'échelle mondiale.....	3
B. Parasitoses transmises par l'alimentation	6
1. Des zoonoses difficiles à étudier et au risque souvent négligé	6
2. Parasites à l'origine de ces zoonoses	7
3. Modes de contamination humaine.....	10
4. Contamination parasitaire des fruits et légumes.....	11
C. Echinococcose alvéolaire, toxocarose et toxoplasmose	13
1. Cycles de vie des parasites responsables de ces zoonoses	13
2. Distribution géographique, symptômes et gravité	18
3. La consommation crue de fruits et légumes comme facteur de risque	19
4. Besoin de disposer de données pour informer les producteurs	20
D. Objectifs de l'étude.	23
II. Première Partie : Estimation du risque de parasitoses lié au dépôt de fèces de chat, chien et renard dans les potagers.....	27
A. Préambule.....	29
B. Article 1: Detection of <i>Echinococcus multilocularis</i> and other foodborne parasites in fox, cat and dog feces collected in kitchen gardens from an alveolar echinococcosis endemic area. 33	
C. Article 2: High density of fox and cat faeces in kitchen gardens and resulting rodent exposure to <i>Echinococcus multilocularis</i> and <i>Toxoplasma gondii</i>	57
III. PARTIE II : Caractérisation des potagers à risque de parasitoses lié au dépôt de fèces de chat, chien et renard.....	81
A. Préambule.....	83
B. Article 3: Fox, cat and dog faeces deposit in kitchen gardens: drivers and patterns of contamination in some rural hot spots of food borne zoonosis transmission.	87
IV. PARTIE III : Contamination du sol des jardins potagers par <i>Echinococcus multilocularis</i> et <i>Toxocara</i> spp.....	115
A. Préambule.....	117
B. Article 4: Development of a flotation/sieving method to detect <i>Echinococcus multilocularis</i> and <i>Toxocara</i> spp. eggs by real-time PCR in soil samples and use for the study of their transfer from feces to soil.	123

C. Article 5: Contamination du sol par *Echinococcus multilocularis* et *Toxocara* spp. dans des potagers familiaux fréquentés par des renards, chats et chiens. 139

V. DISCUSSION GENERALE	157
A. Estimation du risque d'exposition lié à la contamination parasitaire des potagers	159
B. Hétérogénéité du risque d'exposition	162
C. Facteurs expliquant la présence de fèces de carnivores dans les terrains potagers.	162
D. Contamination du sol en lien avec la collecte de fèces.	164
E. Prévention de la contamination parasitaire des potagers.....	166
VI. Conclusion et perspectives de l'étude	171
VII. Références bibliographiques	176

I. INTRODUCTION GENERALE

A. Risque zoonotique lié à l'alimentation

1. Prévenir les zoonoses : un enjeu à l'échelle mondiale

Une zoonose est une maladie ou infection causée par un agent pathogène, quel que soit son type (bactéries, parasites, champignons, virus, etc...), transmissible des animaux vertébrés aux humains et inversement (Organisation Mondiale de la Santé, <http://www.who.int/zoonoses/en/>). Bien que certains pathogènes zoonotiques, circulant initialement chez un animal réservoir, puissent se répandre efficacement entre humains engendrant des épidémies locales (comme c'est le cas pour le virus Ebola) ou des propagations plus étendues (comme le font les virus de l'influenza), la majorité des zoonoses n'entraînent généralement que peu, ou pas, de transmission entre humains. Ce type de transmission est ainsi inexistant dans le cas de la rage ou de la trypanosomiase.

Par ailleurs, une zoonose peut être endémique ou épidémique. Une zoonose endémique est définie par la présence à un niveau constant, dans une aire géographique ou une population donnée, d'une maladie ou d'un agent infectieux transmis d'un animal à l'homme (Centre américain pour le contrôle et la prévention des maladies ; <http://www.cdc.gov>). Les zoonoses endémiques sont un problème mondial en termes de santé publique puisqu'elles représentent environ un milliard de malades et des millions de morts chaque année et, de plus, elles ont un lourd impact sur la santé humaine (Karesh *et al.* 2012). La plupart de ces infections sont enzootiques, c'est à dire bien établies dans les populations animales. Cependant, de nombreuses maladies infectieuses d'origine animale et endémiques peuvent induire des foyers épidémiques souvent imprévisibles, pour lesquels le nombre de malades dépasse le niveau constant attendu. C'est notamment le cas pour la leptospirose, la brucellose ou la rage (Shaw 2005). Au cours des dernières décennies, le risque sanitaire induit par les zoonoses a été principalement associé aux épidémies provoquées par de nouveaux agents infectieux émergeant de réservoirs animaux sauvages, tels les virus d'Ebola, West Nile, Nipah ou encore la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Plus récemment, le syndrome respiratoire aigu sévère et les virus de l'influenza aviaire, tous deux hautement pathogènes (King 2004), ont montré que les agents biologiques liés aux activités d'élevage d'animaux peuvent également entraîner un impact significatif en termes de santé publique.

Enfin, certaines zoonoses peuvent être considérées comme « émergentes », ce qui signifie que leur « incidence réelle augmente de manière significative dans une population donnée,

d'une région donnée et durant une période donnée, par rapport à la situation épidémiologique habituelle de cette maladie ». (Thoma et Thiry 2003). Comme l'affirment Rabozzi *et al.* (2012), le risque de zoonoses a probablement été sous-estimé au cours des précédentes années faute de suffisamment prendre en compte le risque d'émergence zoonotique. Cependant, depuis la publication, en 1992, du rapport « *Emerging Infections – Microbial Threats to Health in the United States* » de l'institut américain de médecine, et sa mise à jour en 2003 (« *Microbial Threats to Health – Emergence, Detection and Response* »), le concept de maladies nouvelles et émergentes n'a cessé de susciter l'intérêt du grand public et a dynamisé la recherche sur les maladies infectieuses (Lederberg *et al.* 1992 ; Smolinski *et al.* 2003). En effet, plus de 60% des maladies infectieuses qui affectent les humains ont une origine zoonotique (Taylor *et al.* 2001). Même si la transmission des pathogènes zoonotiques aux populations humaines est un résultat naturel de notre relation avec les animaux et l'environnement, l'émergence d'une zoonose est souvent provoquée par une accélération de la dynamique de transmission des pathogènes liée à des modifications rapides de l'environnement sous l'effet de facteurs climatiques, de changements dans l'utilisation du paysage, de la croissance des populations humaines, de changements de comportement ou de structure sociale ou encore suite à un accroissement des échanges internationaux (Smolinski *et al.* 2003). Pour rappel, au cours du 20^{ème} siècle, la population humaine est passée d'un milliard d'individus à plus de six milliards, tandis que le temps nécessaire pour parcourir le globe, qui était d'environ un an dans le milieu du 19^{ème} siècle, est passé à moins de 24 heures. Accroître sa mobilité est l'un des nombreux défis auxquels font face les populations humaines puisque près de 700 millions de personnes par an ont effectué un voyage international au cours des années 2000 (Chomel 2003). De même, des millions de personnes se sont expatriées en tant que travailleurs ou réfugiés. Parmi elles, certaines transportent des agents infectieux qu'elles peuvent disséminer et les personnes en déplacement peuvent également être exposées à de nouveaux agents pathogènes.

Le risque d'apparition de zoonoses émergentes potentiellement épidémiques est actuellement bien plus élevé que par le passé. Aussi, de nombreux dispositifs sont mis en place à l'échelle mondiale comme nationale pour prévenir et enrayer de telles épidémies. En France, onze zoonoses ont été identifiées comme nécessitant la mise en place d'un réseau de surveillance à l'échelle nationale (Capek *et al.* 2006) : la brucellose, la leptospirose, la maladie de Lyme, la psittacose et la mycobatériose, qui sont d'origine bactérienne ; la grippe, la rage et la fièvre West Nile, d'origine virale ; l'échinococcose alvéolaire, l'hydatidose et la

toxoplasmose, qui sont des parasitoses, c'est-à-dire des affections dues à un parasite. Ces trois zoonoses sont transmissibles par l'alimentation.

Les zoonoses transmises par l'alimentation fournissent d'ailleurs une bonne illustration des conséquences épidémiologiques des modifications profondes et rapides de l'environnement liées à notre technologie, nos industries ou la multiplication de nos échanges commerciaux. En effet, la demande croissante de nourriture du fait de l'expansion globale de la population a engendré une susceptibilité accrue aux zoonoses transmises par l'alimentation. Ainsi, Mead *et al.* (1999) ont estimé qu'aux Etats-Unis les maladies d'origine alimentaire atteignent actuellement environ 76 millions de personnes chaque année et provoquent 325 000 hospitalisations et 5 000 décès par an. Leurs estimations font ainsi état d'un nombre de patients souffrant de ces maladies, plus élevé que par le passé.

2. *Sécurité sanitaire des aliments : une exigence des consommateurs*

Au cours des 20 dernières années, les maladies d'origine alimentaire causées par des bactéries, parasites ou virus constituent un important sujet de préoccupation pour les autorités de santé publique au plan international. Dans les pays en voie de développement, elles sont très fréquentes et constituent une importante source de mortalité humaine comme par exemple les bactéries *Salmonella enterica* de sérotype Typhimurium dont les prévalences sont estimées à 505 cas pour 100 000 enfants de moins de 5 ans au Kenya et 425 cas pour 100 000 enfants de moins de 15 ans au Mozambique avec une mortalité due à cette bactérie pour 4.4% à 27% des patients en Afrique (Morpeth *et al.* 2009). Dans les pays industrialisés, elles sont de plus en plus perçues comme inacceptables, la sécurité sanitaire des aliments étant devenue une exigence majeure des consommateurs. De plus, la prise en charge de ces maladies est très coûteuse. Ainsi, aux Etats-Unis, le coût actuel des maladies parasitaires transmissibles par l'alimentation est respectivement estimé à 35, 45 et 398 millions de dollars par an pour *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. et *Toxoplasma gondii* (Collier *et al.* 2012, Karanis *et al.* 2007).

Parallèlement, les connaissances de l'écologie des pathogènes à l'origine de ces maladies restent encore limitées. En effet, lorsqu'une épidémie a lieu dans une population, la source animale est souvent difficile à identifier, ce qui restreint la portée des études épidémiologiques et freine la compréhension des facteurs écologiques à l'origine de la zoonose. C'est notamment le cas pour la cryptosporidiose, maladie parfois épidémique, transmise par le parasite

protozoaire *Cryptosporidium* spp dont les stades infectants, des oocystes, sont libérés dans l'environnement par les fèces de l'hôte et peuvent survivre pendant de longues périodes en conditions froide et humide. Les épidémies de cryptosporidiose, associées à la consommation de produits frais, ont été rapportées à ce jour, principalement en Amérique du Nord et dans le Nord de l'Europe (Dixon *et al.* 2009, Robertson et Chalmers 2013).

Les efforts de prévention, en termes de santé publique, ont été principalement portés sur les maladies les plus connues et les pathogènes présents dans les chaînes de productions animales (viandes, œufs, lait et fromage). Ainsi, afin de protéger les consommateurs contre les zoonoses d'origine alimentaire, l'Union Européenne a adopté une approche intégrée en matière de sécurité des aliments, de la « ferme à l'assiette ». Cette approche implique à la fois des mesures d'évaluation des risques (collecte et analyse de données, recommandation, formation sur les normes d'hygiène et sécurité) et des mesures de gestion des risques faisant intervenir de nombreux acteurs, comme la Commission européenne, le Centre européen de prévention et de contrôle des maladies ou l'agence européenne de sécurité alimentaire (« European Food Safety Authority »). Suite à ces mesures, et notamment dans le cadre de la prévention des zoonoses d'origine alimentaire, de nombreuses recherches ont été effectuées, aboutissant au développement et à l'amélioration de méthodes pour le diagnostic de maladies intestinales et la détection de pathogènes transmissibles par l'alimentation. Ainsi, une approche coordonnée par les Etats membres de l'Union Européenne a contribué à diminuer de presque la moitié les cas de salmonelloses chez l'homme, réduisant leur nombre de 196 000 cas en 2004 à 108 000 cas en 2009 (<https://www.efsa.europa.eu>).

B. Parasitoses transmises par l'alimentation

1. *Des zoonoses difficiles à étudier et au risque souvent négligé*

Selon le comité composé d'experts de l'Organisation des Etats-Unis pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et de l'Organisation mondiale de la santé (WHO) qui se sont réunis en 2012, les maladies infectieuses causées par les parasites transmis par l'alimentation ont été trop longtemps négligées et n'ont pas suscité à ce jour le même degré d'intérêt que les autres risques d'infection via l'alimentation, qu'ils soient biologiques ou chimiques (« Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites » FAO/WHO 2012). Depuis quelques

années, elles commencent cependant à susciter un réel intérêt de la part des autorités sanitaires (Robertson *et al.* 2013).

Alors que la majorité des infections bactériennes ou virales dues à l'alimentation provoque des gastro-entérites aiguës, la plupart des parasites transmis par la voie alimentaire induisent plutôt une infection chronique (Newell *et al.* 2010). En effet, elles sont dues à des macroparasites, caractérisés par des temps de génération long, qui n'induisent pas une immunité durable chez leur hôte, contrairement aux microparasites, qui sont de plus petite taille et qui ont un taux de reproduction élevé entraînant un temps de génération court, avec un accroissement rapide de la population à l'intérieur de l'hôte, ce qui peut générer le développement d'une immunité ou même la mort (Hudson *et al.* 2002). Ainsi, contrairement aux microparasites qui sont généralement responsables de maladies épidémiques, les macroparasites sont responsables de maladies généralement endémiques.

De façon générale, si la mondialisation des chaînes de production alimentaire et la nette augmentation des maladies d'origine alimentaire associées à la nourriture importée ont alerté les consommateurs sur le risque de parasitoses, ces maladies restent difficiles à étudier d'un point de vue épidémiologique (Robertson et Chalmers 2013). Pour de nombreuses parasitoses transmises par l'alimentation, la longueur de la période d'incubation entre l'infection et les premiers symptômes pose problème pour identifier l'aliment ou la source de l'exposition. Ainsi, dans le cas des maladies dues à des protozoaires et transmissibles par l'alimentation, Hohweyer *et al.* (2016) soulignent que trois raisons expliquent pourquoi ces protozooses sont souvent négligées : i) comme elles ne font pas l'objet d'une notification obligatoire auprès des autorités sanitaires, les rapports officiels reflètent mal leur occurrence et incidence réelles ; ii) la période d'incubation est longue ce qui ne permet pas toujours d'associer l'apparition des symptômes à la consommation d'un aliment précis ; iii) les méthodes de détection ne sont pas faciles à mettre en œuvre et nécessitent généralement le recours à un laboratoire spécialisé.

2. Parasites à l'origine de ces zoonoses

Les parasitoses transmises par l'alimentation sont causées par l'ingestion accidentelle d'un des stades infectants d'un parasite à transmission trophique. Comme tous les parasites, ceux à transmission trophique vivent au détriment d'un organisme vivant, qui est leur hôte involontaire au dépend duquel ils vivent, détournant les nutriments au profit de leur propre croissance et

reproduction (Bush *et al.* 2001). A de très rares exceptions, le cycle de développement d'un parasite nécessite deux milieux de vie distincts : celui qu'il occupe dans, ou sur, son hôte et celui qui sert de transition entre deux individus-hôtes successifs (Combes 2001). Pour les parasites à transmission trophique, qui sont des endoparasites vivant à l'intérieur de l'organisme de leur hôte (contrairement aux ectoparasites qui vivent à sa surface), c'est le milieu extérieur qui permet le passage d'un hôte à l'autre. Le cycle de vie de ces parasites s'insère dans une chaîne alimentaire qui les conduit à leur hôte, le parasite infestant les consommateurs primaires avant les prédateurs. Ces parasites sont ainsi associés étroitement à la nourriture, végétaux ou proies, de l'hôte dans lequel ils doivent aboutir (Combes 2001).

Les parasites fréquentent de façon transitoire ou définitive, plusieurs types d'hôtes : l'hôte définitif est celui qui héberge les formes adultes, propres à la reproduction et les hôtes intermédiaires sont ceux dans lesquels le parasite doit obligatoirement séjourner avant de devenir infestant pour l'hôte définitif. Certains de ces parasites ne nécessitent qu'une seule espèce hôte pour se développer et/ou se multiplier, on parle alors de parasites « à cycle de vie simple » ou « monoxène », tandis que d'autres sont dits à « cycle de vie complexe » ou « hétéroxène » car nécessitant plusieurs hôtes (Figure I.1 ; Bussieras et Chermette 1992). La trichinellose, par exemple, est une maladie provoquée par un parasite à cycle monoxène, *Trichinella spiralis*, un nématode parasite intracellulaire des muscles striés des mammifères et plus spécifiquement du porc. La contamination chez l'animal comme chez l'homme se fait par l'ingestion des larves infestantes contenues dans les muscles d'un hôte parasité. Le parasite n'a alors aucune vie en dehors des hôtes parasités. L'Homme est dans ce cas un hôte accidentel « de circonstance », le cycle parasitaire ne pouvant se poursuivre que si l'homme est lui-même consommé par un hôte définitif, ce qui est hautement improbable. *Taenia solium* est, quant à lui, un exemple de parasite à cycle de développement complexe, impliquant un hôte définitif, l'homme, une phase libre dans l'environnement, les œufs et un hôte intermédiaire, le porc.

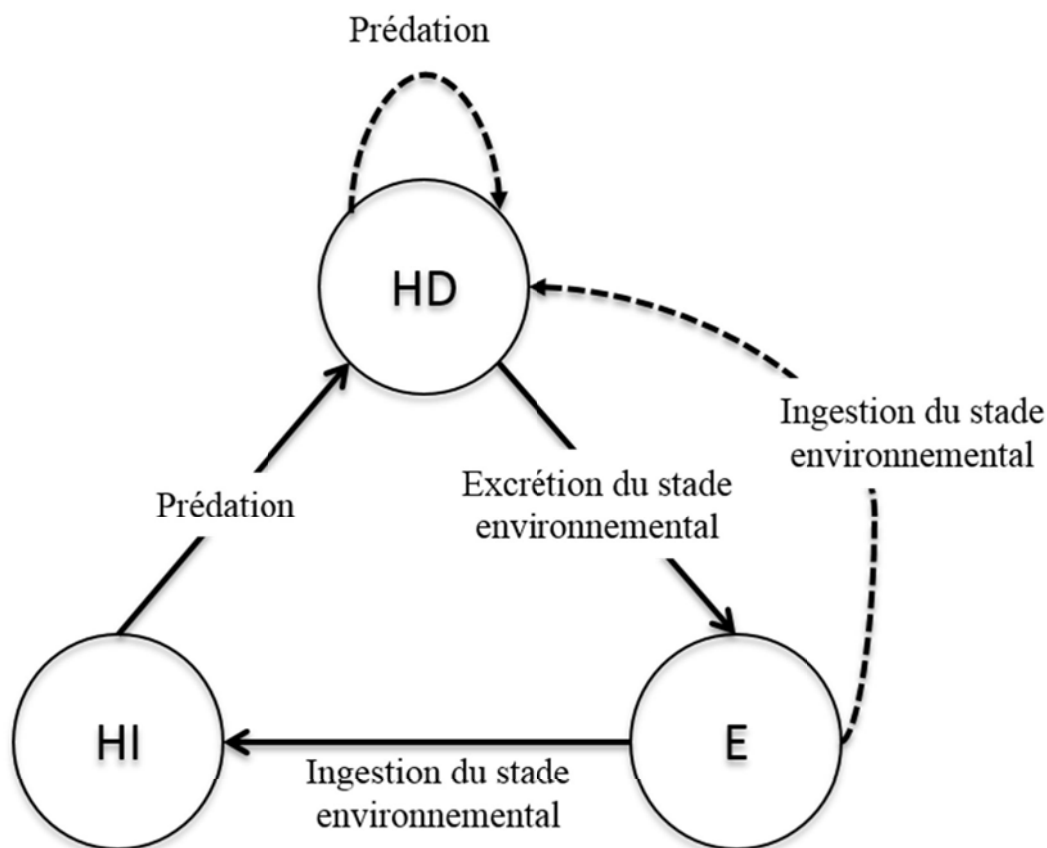


Figure I.1 modifiée d'après Lélou (2010) : Exemple d'un cycle parasitaire complexe mettant en jeu un hôte définitif (HD), un hôte intermédiaire (HI) et une phase environnementale (E) (flèches pleines) et d'un cycle parasitaire simple mettant en jeu un seul type d'hôte et l'environnement (flèches pointillées).

Les parasites dont le cycle de développement comprend une phase environnementale n'ont pu se maintenir au cours de l'évolution qu'en développant des capacités de survie de leur stade libre (œufs ou oocystes) face aux agressions du milieu extérieur. Ainsi, les protozoaires du genre *Giardia* et *Cryptosporidium* produisent des kystes dans l'intestin de leur hôte, ces kystes sont entraînés par les fèces de l'hôte dans le milieu extérieur où leur paroi épaisse leur permet de résister à des conditions environnementales défavorables (dessiccation, gel). La capacité de ces protozoaires à entrer en dormance et ainsi à rester infectieux sur une longue période de temps leur permet d'accroître leur capacité de dispersion (Dorny *et al.* 2009). Ainsi, de fortes concentrations de ces deux parasites ont été montrées dans les eaux usées domestiques, qu'elles soient traitées ou non, ainsi que dans les eaux de surface (Medema et Schijven 2001). Une dispersion mécanique des oocystes de protozoaires a également été souvent observée, avec un transport principalement par des insectes (Graczyk *et al.* 2005).

Si tous les parasites responsables de zoonoses à transmission alimentaire se caractérisent par un mode de transmission trophique, certains disposent également d'autres modes de transmission comme l'ingestion directe d'œufs ou d'oocystes par l'hôte définitif ou la transmission « verticale » de la mère à ses petits via le placenta ou le lait maternel (Boyer *et al.* 2011).

3. Modes de contamination humaine

La place de l'homme dans les cycles parasitaires peut être obligatoire ou accidentelle, entraînant une impasse parasitaire (l'évolution du parasite ou son cycle étant stoppés).

Deux grands modes de contamination humaine par les parasites responsables de parasitoses transmissibles par l'alimentation sont identifiés, le second étant décliné en plusieurs voies possibles de contamination :

- a) Contamination par consommation de poisson ou de viande pas ou peu cuits contenant le stade enkysté et infectant du parasite dans leurs tissus. C'est le cas notamment de la diphyllobotriose, une maladie transmise par la consommation crue ou peu cuite de poissons infestés par des cestodes du genre *Diphyllobothrium*. Dorny *et al.* (2009) estiment que dans environ 20% des cas seulement une manifestation clinique a lieu, ce qui tend à sous-estimer largement l'incidence de ce parasite dans les populations humaines.
- b) Contamination par ingestion accidentelle du stade libre et infectant du parasite (spores, cystes, oocystes, œufs, larves),
 - en buvant de l'eau de boisson contaminée (Dorny *et al.* 2009, Aubert et Villena 2009),
 - en portant à la bouche des doigts ou objets souillés par de la terre contaminée ou par contact avec le pelage d'un animal porteur de ces stades libres (chat ou chien parasité qui se lèche l'anus puis le pelage, chien qui se roule dans les fèces) (Deplazes *et al.* 2011),
 - en ingérant directement de la terre, comme c'est le cas de certaines toxocaroses contractées par les jeunes enfants (Overgaauw et van Knapen 2013).
 - en consommant des aliments frais (légumes, fruits, champignons) contaminés (Dorny *et al.* 2009).

4. Contamination parasitaire des fruits et légumes

Les fruits et légumes constituent une grande part de l'alimentation humaine dans la grande majorité des régions du monde. Dans les pays industrialisés, la consommation régulière de fruits et légumes est vivement préconisée pour répondre à la demande des consommateurs d'accéder à des aliments qui soient non seulement sains et nutritifs, mais qui puissent également contribuer à la prévention des maladies chroniques (maladies cardiaques, cancer), à améliorer la qualité de vie et à réduire les effets du vieillissement. Elle est d'autant plus conseillée, qu'elle est également identifiée comme la solution partielle au problème actuel de la forte augmentation de l'obésité constatée au niveau international. De plus, consommés crus, les fruits et légumes constituent une importante source de vitamines. Ce mode de consommation n'est cependant pas exempt de risque sanitaire si les fruits et légumes consommés sont cultivés en zones d'endémie de zoonoses parasitaires. La contamination parasitaire des fruits et légumes destinés à la consommation humaine peut avoir lieu avant et/ou après récolte, aux différentes étapes qui vont du producteur au consommateur. Le risque d'exposition de ces derniers dépend des pratiques de maraichage, de manutention, de transport, de stockage et de commercialisation de ces aliments. Les circonstances de ces contaminations ont surtout été étudiées dans les pays en voie de développement, car elles y sont responsables de fréquentes épidémies, ou car ces pays sont exportateurs de fruits et légumes : des framboises importées du Guatemala ont ainsi été associées à une épidémie de cyclospore provoquée par le parasite *Cyclospora cayetanensis* (Harris *et al.* 2003). Elles auraient été contaminées par l'eau utilisée pour l'application de pesticides (Harris *et al.* 2003).

Dans les pays en développement on recense deux voies de contamination principales des fruits et légumes destinés à être mangés crus :

- i) La contamination avant la cueillette par l'utilisation d'eau contaminée pour l'irrigation des cultures ou par l'utilisation de fumiers et composts contaminés par les fèces d'animaux ou humains parasités (Abougrain *et al.* 2010, Beuchat 2002). Au Ghana, il a ainsi été montré que la contamination de laitues vendues sur les marchés de grandes villes par des œufs d'helminthes, serait principalement causée par les conditions de culture plutôt que par la manipulation après cueillette. En effet, l'eau utilisée pour arroser les salades, le compost utilisé comme engrais ou encore le sol sur lequel sont cultivés ces légumes ont été identifiés comme étant la source la plus probable de contamination (Amoah *et al.* 2007).

- ii) Le fait que les lieux de culture des végétaux soient visités régulièrement par des animaux sauvages ou domestiques porteurs de parasites (Beuchat 2002). Ainsi, Kłapeć et Borecka (2012) montrent que dans des fermes traditionnelles de Pologne, 88.5% des échantillons de sol, fruits ou légumes étaient contaminés par des œufs de parasites d'animaux domestiques ou sauvages et responsables de zoonoses.

Dans les pays industrialisés, si les problèmes de santé occasionnés par les produits chimiques, contaminants et pesticides sont de mieux en mieux identifiés par certains consommateurs occidentaux (alors enclins à consommer des aliments issus de l'agriculture biologique), en revanche, ceux liés à la contamination des fruits et légumes souillés par des parasites sont très peu connus des consommateurs et producteurs. En Europe de l'Ouest, des dispositifs de sécurisation sanitaire des conditions d'irrigation, de transport, de stockage et de commercialisation des fruits et légumes ont été mis en place, ce qui n'exclut pas le risque d'épidémie de parasitoses lié à l'alimentation, comme l'a montré l'épidémie liée à la consommation de salade frisée contaminée par *Cryptosporidium* sp. en Finlande en 2012 (Åberg *et al.* 2015). De plus, le risque de contamination du sol des terrains maraichers est encore très peu évalué, à l'exception de quelques travaux (Błaszowska *et al.* 2011 ; Szostakowska *et al.* 2014). Les maraichers et les particuliers qui entretiennent un potager familial ne sont pas du tout informés du risque de contamination parasitaire des fruits et légumes qu'ils cultivent.

Cette contamination peut se produire suite au dépôt de fèces de chat, chien et renard parasités. Ces carnivores peuvent en effet être porteurs de parasites responsables de zoonoses transmissibles par l'alimentation : l'échinococcose alvéolaire, la toxoplasmose et la toxocarose, actuellement jugées parmi les plus préoccupantes en Europe (Comité d'experts conjoints du FAO/WHO, 2012). L'échinococcose alvéolaire est endémique dans le nord et l'est de la France, la toxoplasmose est endémique dans toute la France et, bien que la toxocarose soit rarement reportée en France, elle l'est relativement fréquemment dans d'autres pays Européens.

La contamination parasitaire des terrains destinés à la culture de fruits et légumes par les parasites responsables de ces trois zoonoses fait l'objet de cette thèse, qui est surtout concentrée sur le parasite responsable de l'échinococcose alvéolaire, vu la gravité de la maladie, mais qui s'est intéressée également aux parasites responsables des deux autres car ces trois zoonoses ont en commun de pouvoir être transmises par l'intermédiaire de la consommation de végétaux souillés par les déjections de carnivores parasités.

C. Echinococcose alvéolaire, toxocarose et toxoplasmose

1. Cycles de vie des parasites responsables de ces zoonoses

L'échinococcose alvéolaire est due à *Echinococcus multilocularis*, cestode de la famille des Taeniidae décrit en 1954, un siècle après la détection du premier cas humain (Tappe *et al.* 2010). C'est un parasite à cycle complexe principalement sylvatique mettant en jeu des carnivores comme hôtes définitifs et des micromammifères comme hôtes intermédiaires (Figure I.2 ; Eckert *et al.* 2011). Le ver adulte occupe l'intestin grêle de ses hôtes définitifs, principalement les renards (genres *Vulpes* et *Alopex*), mais également les chiens domestiques (*Canis familiaris*), d'autres canidés tels que les chiens viverrins (*Nyctereutes procyonoides*), les coyotes (*Canis latrans*) ou les loups (*Canis lupus*) et, enfin, plus rarement des félidés, principalement les chats domestiques (*Felis s. catus*).

Les vers sexuellement matures produisent des œufs, qui sont libérés dans l'environnement, soit encore enfermés dans un segment terminal soit libres, via les fèces de l'hôte définitif. Le délai entre la contamination de l'hôte définitif et la première libération d'œufs dans les fèces est relativement court, de l'ordre d'un mois (Kapel *et al.* 2006). A partir de l'instant où ils sont libérés par l'hôte définitif, les œufs contiennent un stade larvaire complètement développé, qui est alors directement infectant. Pour poursuivre son cycle de vie, le stade larvaire du parasite doit être ingéré par un hôte intermédiaire, principalement des micro-rongeurs appartenant aux genres *Arvicola* et *Microtus* en Europe (Vuitton *et al.* 2003). Chez l'hôte intermédiaire, les œufs éclosent dans le système digestif (estomac et intestin grêle) pour ensuite migrer vers le foie qui est l'organe où le parasite va effectuer sa reproduction asexuée et produire des protoscolex. Le cycle est bouclé si l'hôte intermédiaire, contenant les protoscolex mûres, est ingéré par un hôte définitif. En plus des hôtes intermédiaires connus du parasite, l'Homme ainsi que d'autres espèces de mammifères ne jouant aucun rôle dans la transmission du parasite peuvent développer une infection accidentelle (hôte accidentel) (Figure I.2).

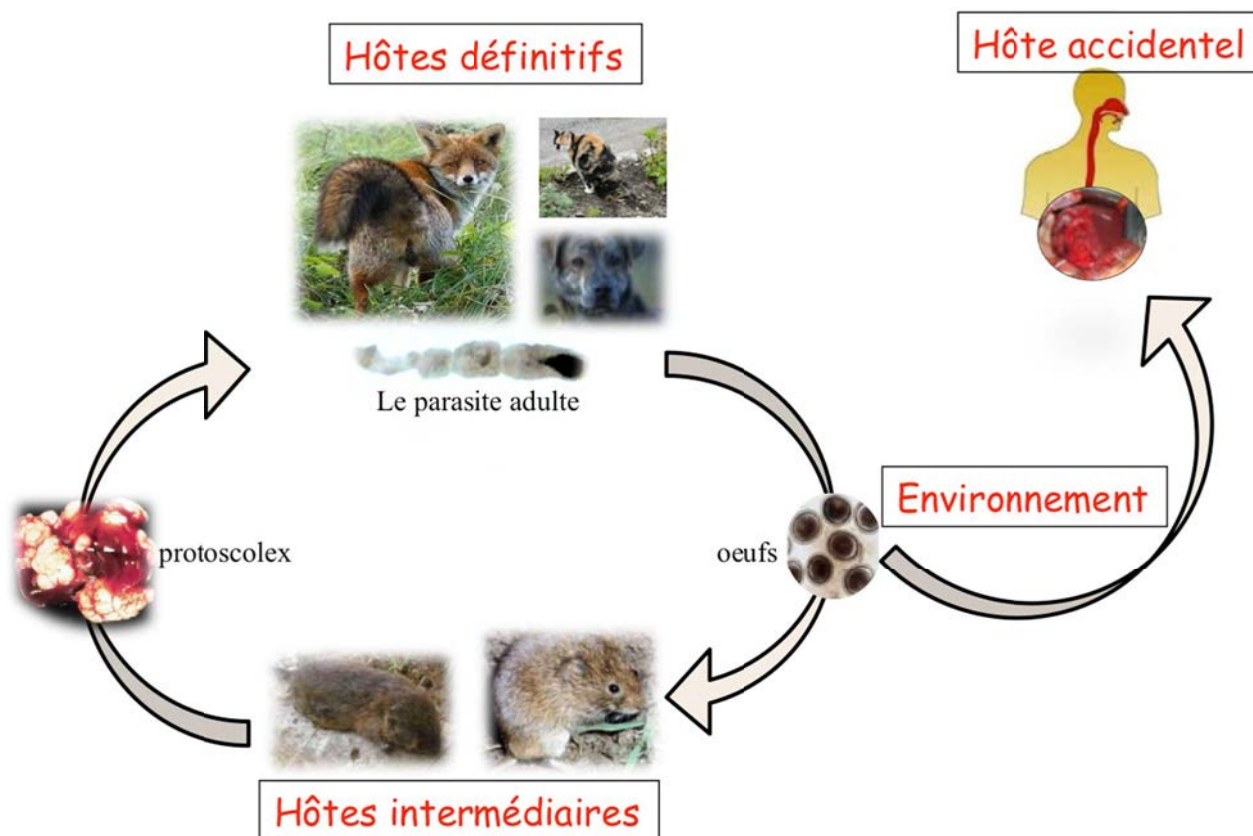


Figure I.2 : Cycle du parasite *Echinococcus multilocularis*. (Figure adaptée de la fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : « *Echinococcus multilocularis* », ANSES, Septembre 2011)

La toxocarose est l'infection due à la présence, dans l'organisme humain, d'un stade infectant des parasites *Toxocara canis* ou *Toxocara cati*. Ces parasites, nématodes de l'ordre des *Ascaridida*, appartiennent à la famille des *Toxocaridae*. Les larves mesurent environ 300µm et les vers adultes mesurent de 4 à 10cm. Les adultes produisent des œufs, pratiquement sphériques, qui mesurent de 75 à 85µm de diamètre. Le cycle de développement de ces parasites fait intervenir un hôte définitif (chien ou chat), un hôte paraténique (nombreuses espèces) et l'environnement (Figure I.3).

L'hôte définitif libère des œufs non-embryonnés dans ces fèces, qui deviennent infectieux dans l'environnement trois à six semaines après le dépôt de l'excrément (Deplazes *et al.* 2011). L'infection de l'hôte définitif par *Toxocara* spp. peut se faire par trois modes de contamination : transmission de larves de la mère à ses petits par la barrière transplacentaire (chez le chien) ou par le lait maternel (chez le chat et le chien) ; ingestion d'œufs embryonnés présents dans l'environnement ; ingestion de larves par consommation d'un hôte paraténique (Overgaauw et

van Knapen 2013). Chez les chiots, la voie de contamination la plus importante est la transmission de larves somatiques réactivées de leur mère via le placenta au jour 42 de gestation. Les chiots excrètent ensuite les œufs du parasite 16 jours après leur naissance. Les chiens ou chats adultes, comme les jeunes individus, peuvent se contaminer par l'ingestion d'œufs embryonnés présents dans l'environnement. Il en résulte alors une excrétion d'œufs dans les fèces quatre à cinq semaines après l'ingestion. On a longtemps cru que les hôtes définitifs adultes acquerraient une immunité au fil du temps qui limitait ainsi les ré-excrétions mais les résultats expérimentaux de différentes études contredisent cette théorie en montrant des ré-excrétions chez des chiens adultes précédemment contaminés, soit par l'ingestion d'œufs, soit par transmission trans-placentaire (Deplazes *et al.* 2011). De nombreuses espèces peuvent servir d'hôte paraténique pour *Toxocara* spp., transportant les œufs dans leur tractus digestif sans en modifier la viabilité ni l'infectiosité. Ainsi, des vers de terre, des micro-rongeurs, des oiseaux, ou des écureuils peuvent permettre la dispersion des œufs du parasite (Despommier 2003). Les hôtes définitifs, que ce soit les chats ou les chiens, peuvent également servir d'hôte paraténique. Deux voies de contamination sont à l'origine de toxocarose chez l'homme. Celui-ci peut se contaminer soit par l'ingestion de larves par l'intermédiaire d'un hôte paraténique infesté, soit par l'ingestion d'œufs embryonnés présents dans l'environnement.

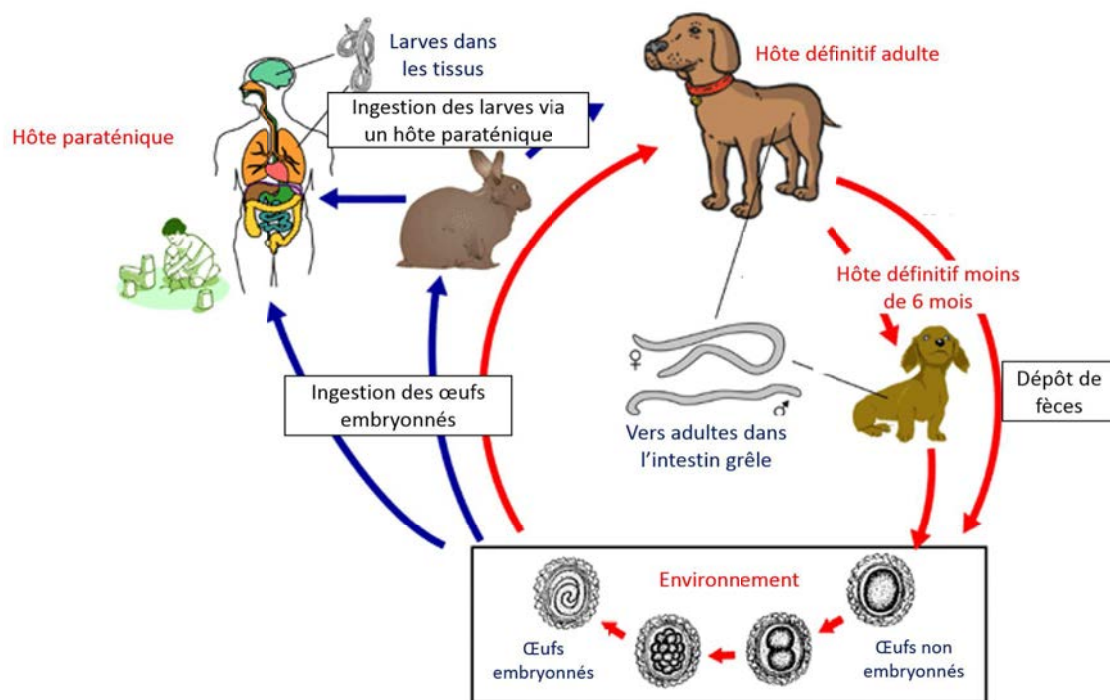


Figure I.3 : Cycle de développement des parasites *Toxocara* spp.

(Figure adaptée du site internet du Centre américain pour le contrôle et la prévention des maladies : www.cdc.gov)

La toxoplasmose est une infection provoquée par le protozoaire ***Toxoplasma gondii*** (*T. gondii*), endoparasite de la classe des Coccidea et de la famille des Toxoplasmatidés. Son cycle de vie, hétéroxène facultatif, fait intervenir un hôte définitif félin, un hôte intermédiaire (tous les animaux à sang chaud peuvent être hôte intermédiaire) et l'environnement (Figure I.4). L'hôte définitif se contamine lorsqu'il ingère un hôte intermédiaire porteur de kystes dans ses tissus (contenant la forme infectante, le bradyzoïte). Les bradyzoïtes initient alors une phase de prolifération asexuée et de dissémination dans l'organisme sous forme de tachyzoïtes. Ceux-ci ont ensuite une phase de développement sexué dans les cellules épithéliales de l'intestin de l'hôte définitif. C'est au cours de cette phase que se forment les oocystes non sporulés. Après une période prépatente de 3 à 49 jours, l'hôte définitif libère des dizaines de millions d'oocystes non sporulés dans l'environnement avec ses fèces (Dabritz et Conrad 2010). C'est seulement dans le milieu extérieur que les oocystes non sporulés acquièrent leur pouvoir infectieux au cours de la phase de sporogonie. Cette phase conduit au développement d'oocystes sporulés, de 11 à 13µm de diamètre, constitués de deux sporocystes contenant chacun quatre sporozoïtes infectieux. L'ingestion de ces sporozoïtes entraîne une contamination aussi bien des hôtes intermédiaires (cycle complexe du parasite) que de l'hôte définitif (cycle simple). Chez l'hôte intermédiaire, le parasite subit uniquement la phase de reproduction asexuée qui entraîne la formation de kystes tissulaires qui peuvent persister tout au long de la vie de l'hôte et constituer une source de contamination pour de nouveaux hôtes définitifs (Tenter *et al.* 2000). L'homme peut être contaminé par *T. gondii* de trois façons : par transmission congénitale lors de primo-infection chez la femme enceinte ; par ingestion de bradyzoïtes ou tachyzoïtes contenus dans les kystes tissulaires des produits carnés peu ou mal cuits ; ou, enfin, par ingestion de sporozoïtes contenus dans les oocystes présents dans l'eau ou les aliments contaminés (Cook *et al.* 2000 ; Tenter *et al.* 2000 ; Jones *et al.* 2009 ; Aubert et Villena 2009).

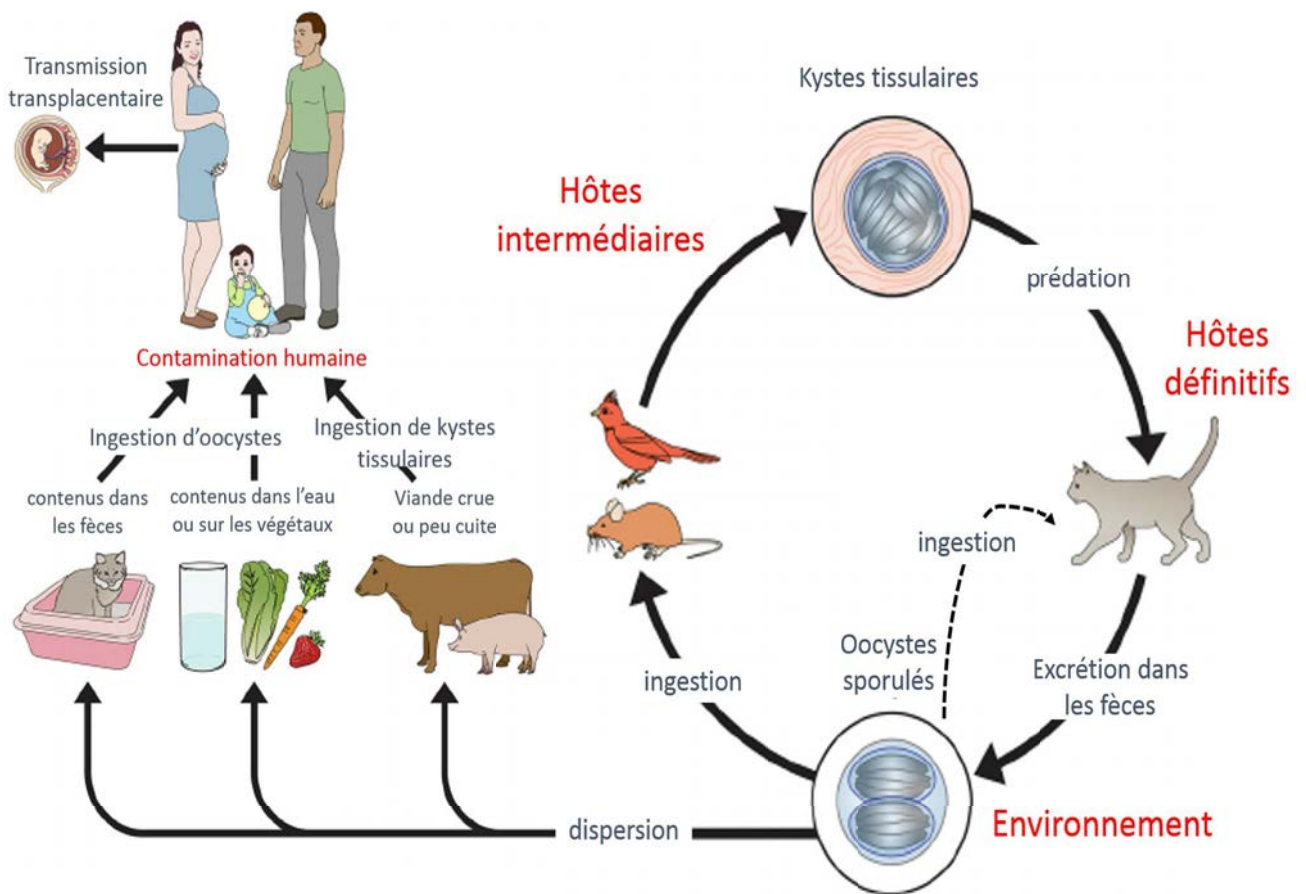


Figure I.4 : Cycle de développement du parasite *Toxoplasma gondii* (Figure adaptée de Esch et Petersen 2013).

2. Distribution géographique, symptômes et gravité

L'échinococcose alvéolaire est largement présente dans l'hémisphère nord, des régions arctiques aux régions tempérées. La zone endémique actuellement connue inclut des zones de l'Europe, d'Asie et d'Amérique du Nord (Figure I.5).



Figure I.5 : Distribution géographique estimée de l'échinococcose alvéolaire
(Figure extraite d'Eckert *et al.* 2001)

En Europe, c'est une maladie rare touchant peu de personnes dans quelques régions endémiques bien individualisées, mais c'est une pathologie grave pouvant engager le pronostic vital du patient (Vuitton *et al.* 2003). L'absence de guérison certaine dans la plupart des cas, la prise indispensable d'un traitement à vie, et le suivi médical régulier obligatoire, sont autant de facteurs contraignants pour les malades, avec le risque d'échec thérapeutique pouvant conduire à recourir à une greffe hépatique. De plus, la prise en charge d'un patient atteint d'échinococcose alvéolaire est extrêmement coûteuse : les dépenses annuelles pour les médicaments peuvent atteindre 5 à 15 000 euros par patient et le coût médical total d'un patient a été estimé à 250 000 euros (source : Organisation Mondiale pour la Santé). L'échinococcose alvéolaire est actuellement considérée comme l'une des zoonoses les plus préoccupantes en Europe (Eckert *et al.* 2000). Bien que cette zoonose chez l'homme soit assez peu fréquente, plusieurs études montrent une augmentation de l'incidence, en Suisse (Schweiger *et al.* 2007), en Lituanie (Bruzinskaite *et al.* 2007) et en Autriche (Schneider *et al.* 2013). Le nombre de nouveaux cas

est estimé entre 170 et 200 chaque année en Europe de l'Ouest et Centrale et les plus grands nombres de nouveaux cas par an sont enregistrés en France, en Allemagne, en Suisse, en Lituanie et en Pologne (Conraths et Deplazes 2015).

La toxocarose est l'helminthiase la plus commune à l'heure actuelle, aussi bien dans les pays industrialisés que dans ceux en voie de développement. De répartition mondiale, elle est cependant bénigne dans la plupart des cas. Touchant principalement les enfants qui sont le plus en contact avec le sol (Deplazes *et al.* 2011), elle peut provoquer des douleurs, fièvres, fatigues et lésions oculaires (Fischer 2003). Elle représente un problème de santé publique dans les pays industrialisés. Si la majorité des infections humaines par les larves de *Toxocara* spp. demeure asymptomatiques, certaines se manifestent par un large spectre de symptômes (manifestations cutanées, douleurs abdominales, musculaires et articulaires, fièvre, fatigue...) et une des formes de la maladie, la toxocarose oculaire (complication survenant à distance de la contamination) est rare mais grave (Lee *et al.* 2010).

La toxoplasmose est une des infections parasitaires les plus répandues au monde, puisqu'environ la moitié de la population adulte mondiale a des anticorps contre *T. gondii*, révélant une infection passée (Tenter *et al.* 2000). Il s'agit d'une zoonose habituellement asymptomatique, donc qui passe inaperçue, ou bénigne, mais pouvant être redoutable chez les sujets fragiles dont la réponse immunitaire ne peut pas endiguer la dissémination des parasites. La gravité de cette infection est liée d'une part, au risque de transmission fœtale du parasite en cas de contamination maternelle survenant en cours de grossesse et, d'autre part, au risque différé de réactivation d'une infection antérieurement acquise, sous l'effet d'une immunodépression (Dubey et Beattie 1988). Le manque de vaccins ou de traitement éradiquant l'infection en fait l'une des priorités des programmes de veille sanitaire (InVS 2004).

3. *La consommation crue de fruits et légumes comme facteur de risque*

La présence d'une longue phase asymptomatique dans l'évolution de l'échinococcose alvéolaire chez les patients complique les études épidémiologiques sur les sources de contamination, puisque le lieu et le moment de l'infection sont difficilement connus. Cependant, sur 210 cas répertoriés en Europe, 61,4% des patients étaient issus du milieu agricole (professionnels et amateurs) et 70,5% détenaient un chien ou un chat (Kern *et al.* 2003).

Le risque de contamination lorsque l'on possède un chien est accentué lorsque ce dernier a un accès à un jardin ou s'il chasse (Guillot et Bourée 2007). Enfin, Piarroux *et al.* (2013) ont réalisé une étude de facteurs de risque de contamination par l'échinococcose alvéolaire, en France, en comparant les données de 180 patients à celles de 517 personnes contrôles. Ils ont montré que le fait de vivre en milieu rural ou d'entretenir un jardin potager augmentait les risques de contracter cette zoonose. La culture et/ou la consommation de fruits et légumes cultivés dans un potager familial semblent donc pouvoir être un facteur de risque d'échinococcose alvéolaire, notamment s'il est associé à la possession de chats ou de chiens. L'ADN d'*E. multilocularis* a d'ailleurs été récemment détecté sur des fruits et légumes provenant de jardins potagers (Lass *et al.* 2015).

La toxocarose n'est pas répertoriée comme maladie infectieuse d'origine alimentaire mais peut, elle aussi, être contractée suite à la consommation crue de fruits et légumes (Holland *et al.* 1991, Vasquez Tsuji *et al.* 1997, Uga *et al.* 2009). En effet, des œufs de *Toxocara* spp. ont été détectés sur des végétaux destinés à la consommation humaine, qu'ils soient vendus sur les marchés en Iran (Fallah *et al.* 2012, 2016), au Nigeria (Maikai *et al.* 2012), en Lybie (Abougrain *et al.* 2010) ou en Arabie Saoudite (Ammar et Omar 2013) ou prélevés directement dans des fermes en Pologne (Kłapeć et Borecka 2012).

Par ailleurs, si la plupart des toxoplasmoses chez l'humain étaient, il y a encore quelques années, attribuables à l'ingestion de kystes présents dans la viande peu ou pas cuite (Cook *et al.* 2000), la voie de contamination par ingestion accidentelle d'oocystes est actuellement en augmentation (Boyer *et al.* 2011, Munoz-Zanzi *et al.* 2010). L'ingestion accidentelle d'oocystes par consommation crue de fruits et légumes non lavés est ainsi identifiée comme un facteur de risque de toxoplasmose (Liu *et al.* 2009, Alvarado-Esquivel *et al.* 2011, Hohweyer *et al.* 2016). L'ADN de *T. gondii* a notamment été détecté sur des fruits et légumes, provenant directement de jardins de particuliers (Lass *et al.* 2012).

4. *Besoin de disposer de données pour informer les producteurs*

Le risque de contracter une zoonose d'origine parasitaire en consommant cru des fruits et légumes et la façon de le prévenir sont généralement très méconnus des populations situées en zone d'endémie, comme l'attestent notamment les résultats de l'enquête réalisée par Hegglin *et al.* (2008) en France, Allemagne, Suisse et république Tchèque et celle réalisée par

Overgaauw (1996) aux Pays-Bas. Les campagnes d'information tout public semblent avoir une efficacité très limitée pour accroître le niveau d'information de ces populations sur le sujet (Overgaauw 1996). De plus, elles ne traitent pas, jusqu'à présent, de la prévention de la contamination des terrains maraichers situés en zone d'endémie. Les jardins potagers sont généralement considérés comme permettant de cultiver de la nourriture reconnue comme saine et sécuritaire pour l'ensemble du foyer (Finerman and Sackett 2003, Litt *et al.* 2011, Marsh 1998, Reyes-García *et al.* 2012). Cependant, dans de nombreuses régions françaises, les fruits et légumes destinés à être consommés crus sont cultivés sur des terrains maraichers ou des potagers familiaux qui sont souvent accessibles aux carnivores. Ces derniers peuvent y déféquer sans que ni les producteurs, ni les consommateurs, ne soient conscients du risque de contracter une zoonose que cela entraîne. La phase libre du stade environnemental des parasites étant invisible à l'œil, il est difficile pour le consommateur de prévenir l'ingestion accidentelle des œufs ou oocystes. Le stockage des aliments à 4°C ne permet pas de supprimer le caractère infectieux du parasite (Veit *et al.* 1995, O'Lorcain 1995, Hohweyer *et al.* 2016). C'est donc au producteur de veiller à ce que son terrain soit indemne de dépôt parasitaire pour assurer une alimentation sans parasite.

Pour ce faire, il faut qu'il dispose d'une information sur le risque zoonotique et la façon de le prévenir, information qui lui serait transmise par l'intermédiaire de plans de communication très ciblés dans lesquels seraient identifiés la catégorie de personnes concernées, le type de message à transmettre et les médias de communication les plus adaptés, comme recommandé par Macpherson (2005) et Hegglin *et al.* (2008). Ce type de campagne d'information et de prévention nécessite cependant de disposer de données, jusqu'à présent non disponibles, sur l'importance, les circonstances et les conséquences du dépôts de fèces parasitées sur les terrains maraichers. La collecte de ce type de données fait l'objet de la présente thèse.

D. Objectifs de l'étude.

La consommation de fruits et légumes est primordiale sur le plan nutritionnel et sanitaire. La production de ces denrées peut, de plus, assurer une part non négligeable de l'alimentation des familles, tout en assurant une source de revenus pour les productions maraichères dont l'activité contribue au maintien du dynamisme des territoires ruraux. Il est donc particulièrement important d'assurer la sécurité sanitaire des fruits et légumes, y compris ceux produits en zone d'endémie de zoonoses parasitaires. L'objectif de cette thèse est d'évaluer et de caractériser les circonstances de la contamination parasitaire des jardins potagers pour proposer des mesures de prévention du risque zoonotique. Cet objectif général se subdivise en trois sous-objectifs autour desquels sont articulées les trois parties qui constituent ce manuscrit :

- **La première partie** a pour objectif d'évaluer autant que faire se peut l'importance du risque zoonotique lié au dépôt de fèces de chat, chien et renard dans des potagers familiaux et terrains maraichers du nord-est de la France, qui est une région d'endémie d'*E. multilocularis*.

Aucune information n'étant disponible sur le sujet, nous avons conduit une étude exploratoire pour évaluer la fréquence du dépôt de fèces de ces carnivores dans les potagers de la région d'étude, située dans les Ardennes Françaises, et la fréquence de détection d'*E. multilocularis*, *Toxocara* spp. et *T. gondii* dans ces fèces. Cette étude fait l'objet d'une publication incluse dans le manuscrit :

Poulle, M.-L., **Bastien, M.**, Richard, Y., Dupuis E., Aubert D., Villena I., Knapp J. Detection of *Echinococcus multilocularis* and other foodborne parasites in fox, cat and dog feces collected in kitchen gardens from an alveolar echinococcosis endemic area. Soumis à Veterinary Parasitology.

Les résultats de cette étude préliminaire, nous ont amené à penser que les terrains potagers pouvaient être des lieux privilégiés de dépôt de fèces pour les chats et les renards. Nous avons alors testé cette hypothèse en comparant la densité de fèces de ces deux carnivores dans et hors potagers dans les Ardennes. Nous avons également testé l'hypothèse qui en découle, à savoir que les rongeurs hôtes intermédiaires qui fréquentent les potagers ont une probabilité plus forte

d'être infectés par les parasites de chat et de renard que ceux qui vivent à distance des potagers. Cette étude fait l'objet d'une publication incluse dans le manuscrit :

Bastien M., Vaniscotte A., Combes B., Umhang G., Germain E., Gouley V., Pierlet A., Quintaine T., Forin-Wiart M-A., Villena I., Aubert D., Boué F. and M-L. Poulle. High density of fox and cat faeces in kitchen gardens and resulting rodent exposure to *Echinococcus multilocularis* and *Toxoplasma gondii*. Soumis à *Folia Parasitologica*.

- **La seconde partie** de l'étude a pour objectif d'identifier les facteurs responsables du dépôt de fèces de carnivore dans certains potagers et de caractériser la distribution des fèces porteuses de parasites.

Cette analyse a été conduite dans deux départements du nord-est de la France : les Ardennes et la Moselle. Nous nous sommes intéressés à la distribution des fèces et celle des fèces parasitées dans les terrains potagers. Les facteurs environnementaux liés à l'accessibilité et/ou l'attractivité des terrains maraichers pour les carnivores, qui expliquent le dépôt de fèces de chat, chien et renard dans ces potagers et, la présence de parasites dans ces fèces ont été identifiés. Cette partie fait l'objet d'une publication en préparation incluse dans le manuscrit :

Bastien M., Vaniscotte A., Combes B., Umhang G., Raton V., Germain E., Villena I., Aubert D., Boué F. and M-L. Poulle. Fox, cat and dog faeces deposit in kitchen gardens: drivers and patterns of contamination in some rural hot spots of food borne zoonosis transmission.

- **La troisième partie** de l'étude est axée sur l'évaluation de la distribution d'*Echinococcus multilocularis* et *Toxocara* spp. dans le sol des terrains maraichers. Elle a nécessité, en premier lieu, la mise au point et la validation d'une nouvelle méthode de détection d'*E. multilocularis* et *Toxocara* spp. dans le sol, qui a fait l'objet d'une publication, incluse dans le manuscrit :

Umhang G., **Bastien M.**, Renault C., Faisse M., Caillot C., Boucher J-M., Hormaz V., Poulle M-L and F. Boué. Development of a flotation/sieving method to detect *Echinococcus multilocularis* eggs by real-time PCR in soil samples. Soumis à *Parasites*.

Cette méthode nous a permis de tester l'hypothèse selon laquelle les œufs de ces parasites passeraient immédiatement dans le sol suite au dépôt de la selle par le carnivore. Dans un

second temps, elle nous a permis d'étudier le lien entre la distribution des fèces parasitées et celle des sols contaminés. Cette analyse fait l'objet d'une publication en cours de préparation :

Bastien M., Umhang G., Combes B., Raton V., Faisse M., Germain E., Villena I., Aubert D., Vaniscotte A., Boué F. and M-L. Poulle. Contamination du sol par *Echinococcus multilocularis* et *Toxocara* spp. dans des potagers familiaux fréquentés par des renards, chats et chiens. En préparation.

II. Première Partie : Estimation du risque de parasitoses lié au dépôt de fèces de chat, chien et renard dans les potagers

A. Préambule

La contamination des sols et végétaux par les œufs d'helminthes ou les oocystes de protozoaires, déposés au sol par les fèces des hôtes définitifs parasités, constitue une importante source d'infection pour les animaux et les humains (Torgerson et MacPherson 2011). L'importance de cette contamination et la capacité des œufs ou oocystes à survivre pendant de longues périodes dans l'environnement sont considérées comme des facteurs de risque non négligeables en termes de santé publique et vétérinaire (Slifko *et al.* 2000; Alum *et al.* 2010). Morgan *et al.* (2013) soulignent cependant que le nombre total d'œufs ou oocystes répandus dans l'environnement n'est pas le seul déterminant du risque zoonotique, car ce dernier est largement modulé par le lieu de dépôt des fèces contaminées.

Ainsi, si les œufs de *Toxocara* spp. semblent être largement répandus dans les sols des villes et banlieues du fait des fortes densités des populations urbaines de chiens et de chats (Dubna *et al.* 2007, Rubel et Wienivesky 2005, Traversa *et al.* 2014), c'est lorsqu'ils sont présents dans des bacs à sable où jouent des jeunes enfants qui souvent mangent de la terre ou portent à la bouche des objets ou leurs doigts souillés de terre (Macpherson 2013) ou sur des trottoirs enherbés utilisés comme terrain de jeux pour les enfants (Rubel et Wienivesky 2005) que le risque de toxocarose est le plus élevé. De même, des fèces de renard contenant une forte charge parasitaire d'*E. multilocularis* mais déposées en pleine forêt seront associées à un risque de transmission à l'humain bien moindre que des fèces avec de faibles charges parasitaires déposées dans une prairie où des personnes ramassent des pissenlits (*Taraxacum* sp.) destinés à être consommés crus, ou encore dans un jardin potager où sont cultivées des fraises (*Fragaria* spp.) qui seront consommées crues et souvent sans avoir été au préalable lavées. Comme le dit la chanson de Boris Vian, « ce qui compte n'est pas la portée de la bombe mais l'endroit où elle tombe ». Pour prévenir le risque de zoonoses transmissibles par l'alimentation lié au dépôt de fèces de chat, chien et renard parasitées, il fallait donc s'intéresser au lieu de dépôt de ces fèces en relation avec le lieu de collecte de végétaux destinés à être consommés crus. C'est ce que nous avons fait en analysant la distribution des fèces de chat, chien et renard dans des potagers familiaux situés dans les Ardennes françaises, en zone d'endémie de zoonoses transmissibles par l'alimentation et, notamment, d'Echinococcose alvéolaire.

Dans les Ardennes françaises, le taux d'incidence de l'échinococcose alvéolaire dépasse 0,1 pour 100 000 habitants/an (source : Réseau FrancEchino) et peut donc être considérée comme

un problème de santé publique (Craig 2003). Le premier cas humain a été détecté en 1984 (Depaquit *et al.* 1998). Comme la maladie n'apparaît qu'après une ingestion répétée d'œufs, il est probable que les malades se contaminent dans le cadre de la pratique régulière d'une activité « à risque de contamination » comme toucher sans gants, le pelage de renards (s'il s'agit de piégeurs ou chasseurs), ou consommer cru des pissenlits (*Taraxacum sp.*) ou des fruits et légumes qui ont pu être souillés par des déjections de carnivores parasités. Les jardins potagers familiaux et les exploitations maraichères de la Région Champagne Ardenne, et notamment ceux situés dans les Ardennes, sont donc potentiellement à risque. Dans ce contexte, une étude préliminaire a été conduite sur 94 terrains potagers entre 2011 et 2013 afin d'évaluer l'importance du dépôt de fèces de canidés et félidés dans les potagers familiaux du terrain d'étude et l'importance de la présence de parasites transmissibles par l'alimentation dans ces fèces.

Cette première question est traitée dans l'**article 1** intitulé :

Poulle, M.-L., **Bastien, M.**, Richard, Y., Dupuis E., Aubert D., Villena I., Knapp J. Detection of *Echinococcus multilocularis* and other foodborne parasites in fox, cat and dog feces collected in kitchen gardens from an alveolar echinococcosis endemic area. Soumis à Veterinary Parasitology.

Les potagers échantillonnés ont été parcourus à pied 2 à 6 fois au cours des hivers 2011-2012 et 2012-2013 à la recherche de fèces de canidés et félidés. Toutes les fèces trouvées ont été collectées et conservées à -20°C avant d'être décontaminées à -80°C. Elles ont ensuite été soumises à des analyses en biologie moléculaire (extraction d'ADN et qPCR) pour identifier l'émetteur (chat, chien, renard ou autre) et détecter la présence de parasite. Cette étude a permis de mettre en évidence le dépôt non négligeable de fèces de chat (58% des fèces identifiées), chien (10%) et renard (32%) dans les potagers des Ardennes. La présence de parasites a également été détectée dans ces fèces : *E. multilocularis* a été détecté respectivement dans 35%, 11% et 7% des fèces de renard, chien et chat testées, *Toxocara* spp. a été détecté dans 33%, 12% et 5,5% des fèces de chat, renard et chien et *T. gondii* a été détecté dans 2 fèces de chat sur 125 testées et 2 fèces de chien sur 21 testées. Les fèces collectées se sont avérées être distribuées de façon hétérogène : 25% des potagers échantillonnés concentraient plus de 75% des fèces collectées. Ce résultat laisse à penser que certains potagers sont plus à risque de contamination spatiale que d'autres.

Cette hétérogénéité de la distribution des fèces de chat, chien et renard est documentée dans plusieurs contextes (MacDonald 1980, Guislain *et al.* 2007, Afonso *et al.* 2008, Milkovic *et al.* 2009, Raoul *et al.* 2015) et elle influe sur la dynamique de transmission des parasites que ces fèces peuvent transporter. En effet, à la plus fine échelle (micro-locale), la transmission des œufs du parasite aux hôtes intermédiaires (ou accidentels) est dépendante à la fois de la distribution spatiale des fèces des hôtes définitifs contaminés dans l'environnement ainsi que des conditions micro-climatiques qui influencent la survie des œufs (Giraudoux 2002). Les conditions de survie et de dispersion des formes libres du parasite dans l'environnement sont des facteurs qui influencent également grandement la dynamique de transmission de ces parasites entre leurs hôtes « naturels » (définitifs ou intermédiaires) mais également le risque de transmission aux humains, souvent hôtes accidentels dans le cycle de développement des parasites à transmission trophique.

En milieu rural, dans les Ardennes françaises, Guislain *et al.* (2007) ont montré que les densités de fèces de renard étaient plus élevées au printemps qu'à l'automne et que les lisières et les talus en bord de route étaient les milieux où ces densités étaient les plus élevées. Ces habitats, constitués de végétation de hauteur moyenne, sont également ceux où sont retrouvées les plus fortes densités d'*Arvicola scherman* et de *Microtus arvalis* (proies privilégiées du renard roux dans cette région). Ainsi, sous l'hypothèse que le nombre de fèces infectées par le parasite est indépendant de l'habitat et que les conditions micro-climatiques sont favorables à la survie des œufs, la transmission du cestode aux hôtes intermédiaires, qui ne dépend alors plus que des densités de fèces de l'hôte définitif, serait plus élevée dans ces deux micro-habitats.

Dans ce contexte et au vu des résultats de la première étude, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle les potagers sont un lieu privilégié de défécation pour les carnivores et l'hypothèse selon laquelle, en conséquence, ils constituent des micro foyers où le risque de contamination des hôtes intermédiaires est plus élevé qu'ailleurs. Ces deux hypothèses ont été traitées dans l'**article 2** intitulé :

Bastien M., Vaniscotte A., Combes B., Umhang G., Germain E., Gouley V., Pierlet A., Quintaine T., Forin-Wiart M-A., Villena I., Aubert D., Boué F. and M-L. Poulle. High density of fox and cat faeces in kitchen gardens and resulting rodent exposure to *Echinococcus multilocularis* and *Toxoplasma gondii*. Soumis à *Folia Parasitologica*.

L'étude a été, là aussi, conduite dans les Ardennes. Dans le but de comparer les densités de fèces de renard et chat dans les potagers à celles en dehors, nous avons collecté les fèces de ces carnivores dans 43 potagers des Ardennes lors de quatre sessions de prospection, en octobre et mars 2014 et 2015. De la même manière que pour l'étude précédente, toutes les fèces trouvées ont été collectées et conservées à -20°C avant d'être décontaminées à -80°C. Elles ont ensuite été soumises à des analyses en biologie moléculaire (extraction d'ADN et qPCR) pour identifier l'émetteur (chat, chien, renard ou autre) et détecter la présence de parasite. Cette collecte a été comparée à celles d'études antérieures, conduites dans la même zone d'étude, au niveau des prairies, cultures, lisières et bordures pour les renards (Guislain *et al.* 2007, Quintaine 2010) et dans deux villages de la zone d'étude et leur environnement pour les chats (Forin-Wiart 2014). De plus, nous avons conduit deux sessions de capture de rongeurs en avril 2015 et mai 2016 à proximité de 40 potagers de la zone d'étude et dans 35 sites situés à plus de 200m des potagers. Sur la base de la distance moyenne connue des déplacements des espèces de rongeurs capturés, nous les avons classés comme étant exposés à un potager ou non. Chaque rongeur capturé a été autopsié et testé pour la présence d'anticorps dirigés contre *T. gondii*. Lorsque le foie du rongeur autopsié présentait au moins une lésion parasitaire, une analyse moléculaire a été conduite pour définir si cette lésion était causée par *E. multilocularis* ou *Taenia* sp.

Il s'est avéré que dans les potagers étudiés, nous avons trouvé des densités de fèces de renard équivalentes à celles trouvées au niveau des lisières et bordures, zones connues pour être privilégiées par ce carnivore pour déféquer. De la même manière, nous y avons trouvé des densités de fèces de chat environ 20 fois plus élevées dans les potagers qu'en dehors. Sur les 88 fèces de renard collectées dans les potagers, 21 (24%) contenaient de l'ADN d'*E. multilocularis* et sur les 141 fèces de chat collectées, 6 (4%) contenaient de l'ADN de *T. gondii*. Sur les 130 rongeurs piégés, 14% étaient positifs pour au moins un parasite testé et les rongeurs exposés aux potagers l'étaient significativement plus que ceux non exposés. Ces résultats suggèrent que le cycle de ces deux parasites est effectif dans les potagers et que des mesures de prévention devraient être appliquées pour réduire le risque d'exposition de l'homme à ces parasites.

B. Article 1: Detection of *Echinococcus multilocularis* and other foodborne parasites in fox, cat and dog feces collected in kitchen gardens from an alveolar echinococcosis endemic area.

Marie-Lazarine Poulle^{1,2,a}, Matthieu Bastien^{1,2,3,a}, Yolane Richard², Emilie Dupuis^{1,4}, Dominique Aubert^{1,4}, Isabelle Villena^{1,4}, Jenny Knapp^{5,6}

¹University of Reims Champagne-Ardenne, SFR Cap Santé, EA 3800 PROTAL, 51092 Reims cedex, France

²University of Reims Champagne-Ardenne, CERFE, 08240 Boult-aux-Bois, France

³French Institute for Fighting Zoonoses (ELIZ), Domaine de Pixéricourt, 54220 Malzéville, France

⁴University Hospital of Reims, Department of Parasitology-Myology, 51092 Reims cedex, France

⁵University of Bourgogne Franche-Comté, Laboratory of Chrono-environnement, UMR UFC/CNRS 6249 affi. INRA, 25030 Besançon, France

⁶University Hospital of Besançon, Department of Parasitology-Myology, 25030 Besançon, France

^a: Equal contribution of these two authors

Corresponding author: M-L Poulle, marie-lazarine.poulle@univ-reims.fr

Soumis dans Veterinary Parasitology

Abstract

Foodborne parasites are increasingly recognized as a serious health issue. Of these, *Echinococcus multilocularis* is the parasite of most concern in Europe. Its infective eggs are spread into the environment by the faeces of foxes or dogs. Foxes, dogs and cats can also spread the eggs of *Toxocara* spp. into the environment via their faeces, and cat faeces can contain *Toxoplasma gondii* oocysts. All these foodborne parasites can be responsible for infecting humans following the consumption of raw fruit or vegetables contaminated by faeces. This study investigates the occurrence of foodborne parasites in fox, dog and cat faeces deposited in 94 kitchen gardens in northeastern France, which is a high endemic area for alveolar echinococcosis. These gardens were sampled between two and six times from October 2011 to April 2013. A total of 254 faeces were collected and analysed by qPCR to identify the species of the emitter as well as to detect parasite DNA. The faeces were not uniformly distributed: less than 25% of the sampled kitchen gardens contained more than 75% of the faeces found. Of the 219 faeces that could be attributed to an emitter, cats accounted for 58%, foxes for 32% and dogs for 10%. Of the 193 faeces from which we could obtain usable parasite DNA, *E. multilocularis* was detected in 34.8% [23.5–47.6], 11.1% [1.4–31.7] and 7% [2.6–14.6] of fox, dog and cat faeces respectively, and *Toxocara* spp. in 33.3% [27.0–48.6], 11.6% [5.1–21.6] and 5.5% [0.1–27.3] of cat, fox and dog faeces respectively. *Toxoplasma gondii* was detected in 2 out of 125 cat faeces and in 2 out of 21 dog faeces. Of the 94 sampled kitchen gardens, 19 (20.2%) and 28 (29.8%) contained the 34 and 40 faeces that tested positive for *E. multilocularis* and *Toxocara* spp. respectively. Our findings show that faecal deposition by cats, foxes and dogs is substantial in certain kitchen gardens in our study area, and also demonstrate the occurrence of foodborne zoonotic agents in some of these faeces. In particular, some kitchen gardens could be at risk of transmitting alveolar echinococcosis to humans. These results serve as a preliminary step in the study of this issue, underlining the need to make kitchen garden owners aware of the zoonotic threat and to encourage them to prevent faeces deposition by carnivores.

Keywords: foodborne parasites, carnivore faeces, kitchen gardens, *Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii*, *Toxocara* spp.

1. Introduction

In recent years, the impact that foodborne parasites exert on food safety, food security, quality of life and livelihoods has begun to receive well-deserved global attention (Robertson *et al.*, 2013). Humans can become infected through the ingestion of food, water or soil that has been contaminated with the infectious stage of a parasite, which is often released into the environment in animal faeces (Slifko *et al.*, 2000, Dorny *et al.*, 2009;). Fresh produce such as fruit and vegetables has been identified as a vehicle of transmission for half of the 24 foodborne parasites that rank at the top of the multi-criteria ranking for risk management of foodborne parasites (Robertson *et al.*, 2013). In this ranking, *Echinococcus multilocularis* (*E. multilocularis*), *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) and *Toxocara* spp. rank third, fourth and twentieth, making them especially worthy of concern.

Echinococcus multilocularis is a helminth parasite that is responsible for human alveolar echinococcosis (AE), a rare but severe disease that is considered one of the most serious zoonoses in the northern hemisphere (Torgerson *et al.*, 2008). *Echinococcus multilocularis* eggs are excreted in the faeces of a definitive host, which in Europe is mainly the red fox (*Vulpes vulpes*) (Eckert *et al.*, 2011), although free-roaming domestic dogs (*Canis lupus familiaris*) and domestic cats (*Felis silvestris catus*) can also carry this parasite (Dyachenko *et al.*, 2008; Deplazes *et al.*, 2011; Umhang *et al.*, 2014, 2015). *Toxoplasma gondii* is responsible for toxoplasmosis, a disease that is usually subclinical, but which can be fatal in immunosuppressed patients. Furthermore, transplacental transmission of *T. gondii* may lead to severe congenital infections (Robert-Gangneux *et al.*, 2015). Human toxoplasmosis infection can result from the accidental ingestion of oocysts spread into the environment by the faeces of the domestic cat, which is the main definitive host of this parasite (Dubey, 2010). Lastly, *Toxocara* spp. are responsible for toxocariasis, a zoonosis that is rarely diagnosed because it is generally asymptomatic, but can occasionally lead to two main clinical syndromes in humans: ocular larva migrans and visceral larva migrans (Overgaauw and van Knapen, 2013). The main contributors to environmental contamination by *Toxocara* spp. eggs in urban areas are considered to be stray cats, in suburban areas to be dogs, and in rural areas to be foxes (Nijssen *et al.*, 2015).

Echinococcus multilocularis eggs, embryonated *Toxocara* spp. eggs or sporulated *T. gondii* oocysts can end up in fruit and vegetables intended for human consumption; *Toxocara* spp. eggs have been detected in produce harvested from the soil in organic farms (Kłapeć and Borecka, 2012), and *T. gondii* and *E. multilocularis* DNA have been detected in fruit and vegetable samples taken from the environment (Lass *et al.*, 2012, 2015). *Echinococcus*

multilocularis and *Toxocara* spp. eggs, as well as *T. gondii* oocysts, are very resistant to adverse environmental conditions and can remain viable in the environment for years under optimal conditions of low temperatures and high humidity (Veit *et al.*, 1995; Azam *et al.*, 2012; Lélou *et al.*, 2012). The inadvertent ingestion of eggs or oocysts from unwashed raw fruit and vegetables has been identified as a transmission risk for AE (Kern *et al.*, 2004; Piarroux *et al.*, 2013), toxoplasmosis (Liu *et al.*, 2009; Alvarado-Esquivel *et al.*, 2011) and toxocariasis (Gyang *et al.*, 2015; Fallah *et al.*, 2016) in humans. Faecal deposition by infected carnivore hosts in cultivated plots devoted to growing produce could thus be a crucial amplifier of the risk of zoonotic diseases. To prevent pre-harvest contamination of raw fruit and vegetables, data about such deposition is necessary.

The aim of this study was to provide information on the deposition of fox, dog and cat faeces potentially contaminated with *E. multilocularis*, *T. gondii* or *Toxocara* spp. in privately owned kitchen gardens used to grow food for household consumption. The occurrence of foodborne parasites in these faeces was investigated by using molecular analysis to screen for parasitic DNA. The study was conducted in northeastern France, which is a high-risk area for human AE (Piarroux *et al.*, 2015).

2. Materials and methods

2.1. Study area

This study was carried out in a rural area of the Ardennes region (49°25' N, 4°50' E) in northeastern France. This area was chosen because its cumulative incidence rate for human infection with AE during the 1982–2007 period was between 2.74 and 6.10, one of the highest reported in France (Piarroux *et al.*, 2013). The 1200 km² study area was located in the southern part of the Ardennes region, where data about both the population dynamics of foxes and cats and the transmission dynamics of *E. multilocularis* and *T. gondii* in these populations were available (Guislain *et al.*, 2007, 2008; Afonso *et al.*, 2013; Forin-Wiart *et al.*, 2014). The study area was defined to encompass 19 villages in which a contact on site (mayors and/or other contacts) was in a position to introduce us to local gardeners, given that ‘having confidence in the field researcher’ was a prerequisite in obtaining the authorization to sample privately owned kitchen gardens. Depending on the size of the ‘trust network’ of each contact, between 1 and 16 kitchen gardens were sampled per village.

The study area was characterized by small villages (most with less than 200 inhabitants) scattered in a landscape of cultivated fields, pastureland and woodland (consisting of oak

Quercus spp., beech *Fagus sylvatica*, hornbeam *Carpinus betulus* and spruce *Picea abies*). Red fox density was about 3–4 foxes/km² during the 2003–2006 period (Guislain *et al.*, 2008); this did not significantly vary from 2004 to 2015 (Bastien *et al.*, unpublished data). The cat population was censused in a 460-ha area that encompassed two villages of the study area (Boult-aux-Bois and Briquenay); it reached 142 individuals (~30 cats/km²) during the 2008–2010 period (Forin-Wiart *et al.*, 2014), around ten times the size of the red fox population. The dog population did not exceed 30 individuals in these two villages (Pouille, pers. obs), so was at least four times smaller than the cat population. The prevalence of *E. multilocularis* in the vulpine population in the study area was 53% during the 2001–2005 period (Guislain *et al.*, 2008), and 36% between 2005 and 2010 in the whole Ardennes region (Combes *et al.*, 2012). More than 60% of both the domestic and wild cat (*Felis silvestris silvestris*) populations in the study area have been found to have antibodies against *T. gondii* (Afonso *et al.*, 2013).

2.2. Sampling

From October 2011 to January 2012, 34 privately owned kitchen gardens in six villages in the study area were surveyed once a month to search for fox, dog and cat faeces. From February to April 2013, the sampling area was enlarged, including 16 out of the previously sampled 34 kitchen gardens (from 4 out of the 6 previous villages), plus 60 others from 13 different villages, making a total of 77 kitchen gardens for this period, and 94 privately owned kitchen gardens from 19 villages over the whole study period. These 94 kitchen gardens were used only for growing food (not for ornamental plants), providing vegetables and fruit such as lettuce, potatoes, carrots, leeks, cabbages, aromatic herbs, strawberries, etc. for one household. The size of the kitchen gardens – calculated by walking their perimeter with a Global Positioning System (GPS) device – was highly variable, ranging from 7 m² to 2862 m² for a mean of 360.5 ± 424.3 m². The distance from a sampled kitchen garden to the closest dwelling or barn – also estimated by walking with a GPS device – ranged from 3 m to 202 m and averaged 24.7 ± 2.7 m. Of the 94 sampled kitchen gardens, 32 (34%) were enclosed with a fence and were thus *a priori* not accessible to foxes, while the 62 others (66%) had open access to foxes, dogs and cats due to the absence of continuous fencing.

Sampling was conducted from October to April, i.e. outside the gardening period to avoid damaging seedlings. In that period, kitchen gardens are deserted, which increases the probability of carnivores visiting them, and plant cover is sparse, which makes faeces detection easier. It should be noted that parasite eggs or oocysts shed in kitchen gardens between October and April stand a good chance of still being present and viable during the following gardening

period (May–September) due to the optimal conditions (low temperatures and high humidity) for these parasite stages during winter in the Ardennes.

We sampled 16 kitchen gardens six times (autumn–winter 2011–2012 and winter 2013), 75 three times (17 during autumn–winter 2011–2012, 58 during winter 2013), 1 five times, and 2 just twice. Each survey consisted of a walked transect that allowed for a visual scan of the whole kitchen garden surface area. The size of the sampled area was calculated per kitchen garden by multiplying its surface area with the number of times it was sampled. It ranged from 147 m² to 17 172 m², averaging 1409.4 ± 2125.5 m² per kitchen garden, for a total sampled area of 13.39 ha. Due to the very uneven sampling regarding villages, periods and sampling size, our dataset did not allow a reliable analysis of environmental factors that could explain the presence of cat, fox and dog faeces in kitchen gardens. However, this analysis was conducted in a joint study based on a more suitable dataset of 1000 carnivore faeces collected within 196 kitchen gardens sampled at the same times (Bastien *et al.*, unpublished data).

In our study, fox, dog, cat or unidentified faeces were first discriminated visually in the field on the basis of shape and size, and then more accurately categorized by identifying the host species through a faecal polymerase chain reaction (PCR) test (Knapp *et al.*, 2016a) (described below). The field researcher's accuracy in discriminating cat, dog and fox faeces was verified by comparing the identification from morphological criteria to the identification of host species from molecular analysis. All collected faeces were decontaminated for 5 days at -80 °C and then stored at -20 °C before analysis.

2.3. Molecular analyses

2.3.1. Copro-DNA extraction

DNA from copro-samples was purified using the QIAamp Fast DNA Stool Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). We used 0.5 g of each copro-sample and DNA purification was carried out as described in the manufacturer's protocol.

2.3.2. PCR inhibitor control

The presence of PCR inhibitors was checked using a solution of 10⁵ spores/ml of *Geotrichum candidum* (strain no. 6560, from the Belgian Coordinated Collections of Micro-organisms (BCCM, <http://bccm.belspo.be/about/ihE.multilocularis.php>) as an internal control added to the copro-sample in the first step of the extraction protocol. Then a qPCR was performed, with an expected cycle threshold (Cq) value under 34 cycles as previously described by Knapp *et al.*

(2014). When inhibitors were detected, qPCR was performed a second time on copro-DNA diluted 1:10 and 1:100 respectively.

2.3.3. *E. multilocularis* and *Toxocara* spp. qPCR diagnosis

In order to detect the presence of *E. multilocularis* and *Toxocara* spp. parasites in the copro-samples, qPCRs were performed on copro-DNA extracts as previously described by Knapp *et al.* (2014) for *E. multilocularis*, and Knapp *et al.* (2016a) for *Toxocara* spp. Briefly, a duplex qPCR was performed using TaqMan technology, with hydrolysis probes and TaqMan Gene Expression Master Mix 2X (Life Technologies, Foster City, CA) to simultaneously detect the parasite and the PCR inhibitors (rrn-*E. multilocularis* primers and probe were associated to Geo primers and probe, and Tox primers and probe were associated to Geo primers and probe, Table I). The qPCRs were performed with 45 cycles for the two parasites as previously described, in a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA). Results were analysed using the software 7500 2.0.5. A qPCR with a Cq \leq 45 cycles allowed us to determine the presence of parasites. Molecular analyses were performed at the Chrono-environment Laboratory, UMR 6249, UBFC, Besançon, France.

2.3.4. *Toxoplasma* diagnosis

DNA extracts were subjected to real-time quantitative PCR (qPCR) targeting a specific repeated element of 529 bp (Reischl *et al.*, 2003). A qPCR was performed using an iQ5 instrument (Biorad, Hercules, CA) as follows. A *Toxoplasma gondii*-specific target region (GenBank access no. AF487550) was amplified with a labelled TaqMan probe (5'6FAM-ACGCTTTCCTCGTGGTGATGGCG-3'TAMRA) and DNA oligonucleotide primers (5'-AGAGACACCGGAATGCGATCT-3' and 5'-CCCTCTTCTCCACTCTTCAATTCT-3') (Lélu *et al.*, 2011). The amplification mixture was composed of 12.5 μ l of 2 x reaction mixture (Platinum Quantitative PCR Supermix UDG, Invitrogen, Carlsbad, CA), 3.5 mM MgCl₂, 0.5 μ M of each oligonucleotide primer, 0.2 μ M TaqMan probe, 1 μ l of 1% bovine serum albumin to increase the PCR performance, and 5 μ l of template DNA, for a final volume of 25 μ l. The reaction mixture was initially incubated for 3 min at 50 °C to allow for uracil-N-glycosylase (UNG) activity. This first incubation was followed by a second incubation of 3 min 30 s at 95 °C to denature the DNA template, inactivate the UNG enzyme, and activate the Platinum Taq DNA Polymerase. Samples were amplified as follows: 45 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, and annealing/extension at 60 °C for 1 min. Each sample was tested in duplicate. Negative controls were included from DNA extraction to PCR amplification steps, and each PCR run

contained both negative and positive controls. No amplification results were systematically obtained for the negative control. A qPCR with a $Cq \leq 45$ cycles allowed us to determine the presence of parasites. Molecular analyses were performed at the Laboratory of Parasitology and Mycology, EA3800 PROTAL, Reims University, France.

2.3.5. *Host faecal test*

The field researchers' morphological identification of carnivore faeces was confirmed by a molecular host faecal test developed by Knapp *et al.*, using TaqMan probes and based on qPCR technology (Knapp *et al.*, 2016a). Briefly, duplex qPCRs were performed to identify a stool as that of a red fox, dog or cat (Table II.B.1) in the expected ranges of Cq values, as previously described.

2.3.6. *Statistical analysis*

Correlations between the number of faeces found and the sample sizes and between the number of faeces testing positive for parasites and the total number of faeces found were tested by the Spearman correlation test. The frequencies of faeces with positive qPCR results were given with their 95% confidence intervals and were compared using chi-square tests. When there were not enough samples, a Fischer's exact test was carried out. All statistical analyses were performed with R version 3.1.3.

3. Results

A total of 85 faeces was collected from October 2011 to January 2012, and 169 faeces from February to March 2013, resulting in 254 faeces collected over the 2011–2013 period. Of the 254 faeces analysed, 194 (76.4%) were visually identified in the field from morphological criteria (size and shape), 191 (75.2%) provided usable DNA, and 143 (56.3%) allowed the identification of the species of the emitter using PCR analysis. Of the 104 faeces with a specific identification based both on morphological criteria and PCR analysis, 19 out of 23 faeces (82.6%) and 54 out of 62 faeces (87.1%) respectively attributed to foxes and cats in the field were confirmed by PCR analysis (Table II.B.2). Thus morphological criteria alone were considered reliable for the identification of cat and fox faeces. Consequently, the 50 faeces attributed to cats in the field but that did not permit qPCR identification of the emitter were considered as cat faeces, and the 26 faeces attributed to foxes based on their morphological identification without molecular confirmation were considered as fox faeces. In contrast, as only 12 out of 19 (63.2%) faeces attributed to dogs in the field were confirmed as dog stools by

PCR analysis (Table II.B.2), morphological identification alone was not considered reliable enough to attribute faeces to dogs. For that reason, only the 22 faeces identified as dog faeces by molecular analysis (among them some that were unidentified or misidentified in the field) were considered for further analysis. Of the 60 unidentified faeces in the field, 39 were identified by qPCR. In the 62 stools in which the *Geotricum* qPCR was inhibited, 40 could be identified by morphological and/or molecular analysis; of these, 37 were attributed to cats, one to a dog and two to foxes. Cat faeces therefore accounted for almost all the identified faeces that had inhibitors. To sum up, 219 out of 254 (86.2%) of the collected faeces could be attributed to a species based on qPCR analysis and/or visual identification. Of these, 127 (58%) were cat faeces, 70 (32%) were fox faeces, and 22 (10%) were dog faeces.

No stools were found in 39 of the 94 sampled gardens (41.5%), whereas 1–21 stools were collected in the 55 others (Figure I.B.1a). The kitchen garden where the highest number of faeces were collected (21 faeces: 16 fox stools, 3 cat stools, 1 dog stool and 1 undetermined stool) was the farthest from buildings or barns (by a distance of 234 m). The 23 out of 94 kitchen gardens (24.5%) where at least 4 stools were found were the source of 191 out of 254 (75.2%) of all the faeces. As might be expected, the number of faeces found per kitchen garden was significantly correlated with the total sampled size ($r=0.54$, $p<0.0001$). Of the 52 kitchen gardens where at least one identified carnivore stool was found, 35 (67%) had only cat, fox or dog faeces, 10 (19%) had both cat and fox faeces, 1 (2%) had both dog and fox faeces, and 6 (12%) had cat, dog and fox faeces (Figure II.B.1a). Of the 23 kitchen gardens that had only cat faeces, 8 (33%) were enclosed. There were four kitchen gardens with more than 10 cat faeces: these were characterized by the close proximity of a site where cats were fed (by the kitchen garden owners or their neighbours).

Of the 74 faeces that yielded positive qPCR results for the detection of parasite DNA, 3 tested positive for both *Toxocara* spp. and *E. multilocularis* (2 fox stools and 1 cat stool) and 2 others tested positive for both *Toxocara* spp. and *T. gondii* (1 cat stool and 1 dog stool), resulting in a total of 79 parasite DNA detections (Table II.B.3). The occurrence of *Toxocara* spp. and *E. multilocularis* DNA did not significantly differ within the total sampling, with 20.7% and 18.3% of stools testing positive respectively (Table II.B.3, χ^2 test = 0.22, $p=0.64$). However, the occurrence of *Toxocara* spp. and *E. multilocularis* significantly differed ($p<0.001$) between cat, fox and dog faeces that yielded qPCR results (Table II.B.3). *Toxocara* spp. was the most frequently detected parasite in cat faeces (33.3%), while its occurrence was significantly lower in fox faeces (11.6%) and dog faeces (5.5%) ($p<0.001$). In contrast, *E. multilocularis* was significantly more frequent in fox faeces (34.8%) than in cat faeces (7%) or dog faeces (11.1%)

($p < 0.0001$). *Toxoplasma gondii* was detected in 2 out of 125 cat faeces and 2 out of 21 dog faeces and was not detected in fox faeces (Table II.B.3). The two dog faeces that tested positive for *T. gondii* qPCR were collected within a one-month interval in the same enclosed kitchen garden. They originated from the same privately owned dog. Of the total 8 faeces collected from this dog, one was contaminated with both *T. gondii* and *Toxocara* spp, one was contaminated with *T. gondii* and one was contaminated with *E. multilocularis*.

In 7 of the 55 kitchen gardens where at least one stool was found, all the stools had inhibitors, resulting in an absence of qPCR results (Figure II.B.1b). The 79 detections of parasite DNA originated from 36 of the 94 sampled kitchen gardens (38.3%) The number of parasite detections was correlated to the number of faeces collected per kitchen garden ($r = 0.55$, $p < 0.0001$). The 34 faeces that tested positive for *E. multilocularis* were collected in 19 of the 94 sampled kitchen gardens (20.2%), while 28 of the 94 sampled kitchen gardens (29.8%) contained the 40 faeces that tested positive for *Toxocara* spp.

4. Discussion

To our knowledge, this study is the first to provide information about the occurrence of *E. multilocularis* and other foodborne parasites in cat, dog and fox faeces deposited in privately owned kitchen gardens located in a highly endemic area for AE. As an exploratory study, it was based on a more or less opportunistic sampling design, leading to uneven sampling regarding villages, sampling periods and sample size per garden. However, despite this and other methodological concerns, this study gives an initial insight into the key role kitchen gardens may play in the transmission of foodborne parasites from carnivores to humans in endemic areas.

The use of molecular screening (PCR and qPCR) allowed the identification of the emitter species of faecal samples as well as the detection of parasite DNA the sample contained. The proportion of samples usable for molecular analysis (75.2%) was lower than previously described in Knapp *et al.* (2014), where less than 2% of the samples contained PCR inhibitors. However, in Knapp *et al.* (2014), only fox stools were investigated, while in this study we also investigated dog and cat faeces, with cat stools accounting for a very large percentage of the faecal samples with inhibitors. As a high level of calcium is known to alter DNA quality (Opel *et al.*, 2010), one might assume that cat and dog copro-samples had a higher level of calcium than fox copro-samples due to the high proportion of pet food in these animals' diet. The correct morphological identification of carnivore stools was highest for cat stools (87% of faeces were correctly identified in the field) and fox stools (83% were correctly identified), but was lower

for dog stools (63% were correctly identified). These results indicate that identifying copro-material remains difficult, even for specialists, and that confirmation by a second technique is often advisable.

In the majority of previous studies dealing with the detection of foodborne parasites in copro-samples from cat, fox or dog populations, only one faecal sample was collected per individual. In this study, faeces were collected in the field, which meant we could not establish whether multiple samples from the same individual were collected. For that reason, our results have the disadvantage that they cannot be compared to those from studies on the prevalence of *E. multilocularis* in fox and dog populations (e.g. Dyachenko *et al.*, 2008; Umhang *et al.*, 2014) or the prevalence of *Toxocara* spp. in dog, cat and fox populations (e.g. Brochier *et al.*, 2007; Villeneuve *et al.*, 2015). However, they do serve to provide a general view of the contamination risk in kitchen gardens. Indeed, as discussed by Lass *et al.* (2016), the detection of parasite DNA in faeces is evidence of their presence in the environment and indicates a potential risk for humans, even if this alone does not allow the level of risk to be determined – this would require investigating the viability of the infective stage of the parasites and the parasite burden per faeces. In line with Conraths and Deplazes (2015), we consider that data from faeces collected in the environment has the advantage of yielding more relevant information for preventing foodborne parasite transmission than investigating prevalence in definitive host populations, since humans run a much higher risk of contamination from contact with the environment than from contact with definitive hosts. Furthermore, such data also has the advantage of allowing hotspots of intensive transmission to be identified; hotspots have already been identified in the transmission of *E. multilocularis* to its intermediate hosts (Raoul *et al.*, 2015) and in the transmission of *Toxocara* spp. to humans (Mizgajska-Wiktor *et al.*, 2017).

Almost one-third of the faeces we collected in kitchen gardens were from foxes. This relatively high occurrence of faeces from a wild carnivore in close proximity to humans is not surprising since foxes are known to come close to villages and buildings at night in rural areas (Janko *et al.*, 2012; Krauze-Gryz *et al.*, 2012). This is likely to explain why *E. multilocularis* DNA was detected close to rural homes in Poland, where foxes approach human settlements in search of food (Szostakowska *et al.*, 2014). A study by Bastien *et al.* (unpublished data) revealed that the presence of fox faeces in kitchen gardens can be explained by the latter's accessibility (when considering fenced as well unfenced gardens), and by the food availability in close proximity (when considering only easy-to-access kitchen gardens). In our study, 66% of the sampled kitchen gardens were open access, i.e. easily accessible to canids, and most were near pastures, meadows or forest edges where voles, the main fox prey in the area, are generally

abundant (Guislain *et al.*, 2007). Accessibility and food availability could thus explain the relatively frequent collection of fox faeces in the sampled kitchen gardens. The detection of *E. multilocularis* DNA in almost 35% of the kitchen gardens is thus not surprising since more than 50% of foxes necropsied during the 2001–2005 period were found to carry *E. multilocularis* worms in their intestines (Guislain *et al.*, 2008) and there is no reason to assume that the prevalence of this parasite in the vulpine population was lower during the sampling period of our study. *Echinococcus multilocularis* was also detected in two dog faeces (out of 18) collected in kitchen gardens from two different villages. Given the high reproductive potential of this parasite in foxes and dogs (Kapel *et al.*, 2006), we can assume that the *E. multilocularis* DNA detected in fox and dog faeces originated from eggs, nonetheless the distinction between viable and non-viable eggs would provide valuable information when considering infection risk. In any case, given the occurrence of fox faeces in kitchen gardens, the occurrence of *E. multilocularis* DNA in these faeces as well as in dog faeces, and the non-homogeneous distribution of faeces testing positive for parasites we observed, the results indicate that some kitchen gardens could be hotspots for *E. multilocularis*, and thus at transmission risk for those consuming raw fruits and vegetables from these gardens. The detection of *E. multilocularis* DNA in different environmental matrices in a kitchen garden belonging to an AE patient in Poland (Lass *et al.*, 2016) tends to confirm this hypothesis.

Cat faeces in kitchen gardens were characterized by their abundance, accounting for 58% of the 219 faeces identified from morphological and/or molecular identification. This high occurrence probably resulted both from the relatively high density of the cat population as compared to the dog and fox populations and to the selection of kitchen gardens by cats to defecate because they seek to cover their faeces with loose soil. Due to this covering behaviour, the detection of cat faeces in kitchen gardens may have been less exhaustive than the detection of fox and dog faeces. However, the possible underestimation of cat faeces was probably low in the November to February sessions because the soil was generally frozen or wet, deterring cats from burying their faeces. It may have been higher in March and April, when the soil had thawed and some cat faeces may have been deeply buried as gardeners often turn over the soil during this period.

Although *E. multilocularis* DNA was detected in almost 7% of the cat faeces collected in kitchen gardens, cats probably play a minor role in the transmission of this parasite since the reproductive potential of *E. multilocularis* is thought to be low in cats (Kapel *et al.*, 2006). This assumption is supported by the fact that no eggs were found in the 10 out of 321 cat faeces collected in two villages of the study area that tested positive for *E. multilocularis* in a molecular

analysis as well as by the fact that the infected cats originating from these villages carried only immature worms (Umhang *et al.*, 2015). However, Knapp *et al.* (2016b) reported eggs in cat faeces in eastern France, observing entire eggs, with shell and hooks, under the microscope. The role of cats in *E. multilocularis* transmission in terms of the infectivity of eggs warrants further study.

The 33.3% [27.0–48.6] occurrence of *Toxocara* spp. DNA identified by qPCR in cat faeces collected in kitchen gardens is very similar to the 35.7% [31.2–40.1] occurrence of eggs from this parasite detected by flotation technique on faeces collected in the environment from a stray cat population in Argentina (Sommerfelt *et al.*, 2006). This similarity may be explained by the fact that in our study, as in the Sommerfelt *et al.* (2006), only a small percentage of the individuals from the outdoor cat population depositing the faeces collected in kitchen gardens had been dewormed (Forin-Wiart *et al.*, 2014). In contrast, the 11.6% [5.1–21.6] occurrence of *Toxocara* spp. DNA in fox faeces collected in kitchen gardens was lower than the 22.3% [19.9–24.7] occurrence of eggs from this parasite in 1213 fox faeces collected in the field in Belarus and examined with standard flotation techniques (Shimalov and Shimalov, 2002). The direct observation of eggs would allow a more reliable assessment of the zoonotic risk related to the detection of *Toxocara* spp. DNA in cat, fox and dog faeces collected in kitchen gardens; nonetheless, the occurrence of faeces testing positive in our sample suggests this risk may be significant.

Toxoplasma gondii DNA was detected in 1.6% of the cat faeces collected in kitchen gardens; this is in line with the low proportion of individuals found to excrete oocysts in cat populations (Dubey, 2010). *T. gondii* was also detected in two dog faeces, which was an unexpected result as canids do not usually excrete *T. gondii* oocysts. *Toxoplasma gondii* DNA detected by qPCR may originate from bradyzoites of infected prey a cat or dog has just ingested, as has been experimentally demonstrated by Pouille *et al.* (2016). Furthermore, as coprophagy is relatively common in dogs (Frenkel and Parker, 1996, Nijssse *et al.*, 2015), the *T. gondii* DNA detected in the two dog faeces may also have resulted from the ingestion of cat faeces with *T. gondii* oocysts, as has been suggested to explain the detection of *Toxocara cati* and other atypical parasites in dog faeces (Fahrion *et al.*, 2011; Nijssse *et al.*, 2015). More of a concern could be the detection of *E. multilocularis* and *Toxocara* spp. in dog faeces collected in kitchen gardens; particularly the discovery of two faeces yielding positive qPCR results for these parasites in the same kitchen garden. The fact that the dog that deposited these faeces was confined in this kitchen garden infers that eggs from this infected individual were shed where fruit and vegetables are

grown and could thus present a zoonotic risk for the dog's owners and any consumers of the garden's produce.

In conclusion, this study revealed that faecal deposition by cats, foxes and dogs does not appear minor in certain kitchen gardens of northeastern France, nor does the occurrence of foodborne zoonotic parasites in their faeces. In particular, the high occurrence of *E. multilocularis* DNA in fox and dog faeces emphasizes the need to prevent access to kitchen gardens by canids to the extent possible in areas where AE is endemic. This could be done through information campaigns to make gardeners aware of the zoonotic threat, by promoting the enclosure of kitchen gardens with fences, by reducing food availability in proximity, and by avoiding using kitchen gardens as dog pens. In addition, the deposition of faeces in kitchen gardens by free-roaming cats can lead to a risk of human exposure to *Toxocara* spp. that should not be underestimated, as has been noted by Deutz *et al.* (2005). Preventing free-roaming cats from accessing kitchen gardens is more difficult as they can easily climb fences, but other recommendations to limit the risk of toxocariasis and toxoplasmosis infections could be promoted, such as washing hands after contact with soil or plants, and cooking or thoroughly washing fruit and vegetables in contact with soil. These recommendations would also be valuable in helping to prevent AE infection.

Acknowledgements

This work was partly supported by a grant from the Conseil Général des Ardennes. We are very grateful to the 94 Ardennes inhabitants who allowed us to survey their kitchen gardens and to our 19 village contacts who helped us obtain these authorizations. We would also like to thank Jordan Carvalho for his contribution to the collection and analysis of faeces and Elise Bradbury for her editorial review. Finally, we would like to thank the two anonymous reviewers for their very helpful comments on the first draft of the manuscript.

References

- Afonso, E., Germain, E., Poulle, M.-L., Ruetten, S., Devillard, S., Say, L., Villena, I., Aubert, D., Gilot-Fromont, E., 2013. Environmental determinants of spatial and temporal variations in the transmission of *Toxoplasma gondii* in its definitive hosts. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 2, 278–285.
- Alvarado-Esquível, C., Estrada-Martínez, S., Liesenfeld, O., 2011. *Toxoplasma gondii* infection in workers occupationally exposed to unwashed raw fruits and vegetables: a case control seroprevalence study. *Parasit Vectors* 4, 235.

- Azam, D., Ukpai, O.M., Said, A., Abd-Allah, G.A., Morgan, E.R., 2012. Temperature and the development and survival of infective *Toxocara canis* larvae. *Parasitol. Res.* 110, 649–656.
- Brochier, B., De Blander, H., Hanosset, R., Berkvens, D., Losson, B., Saegerman, C., 2007. *Echinococcus multilocularis* and *Toxocara canis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) in Brussels, Belgium. *Prev. Vet. Med.* 80, 65–73.
- Combes, B., Comte, S., Raton, V., Raoul, F., Boué, F., Umhang, G., Favier, S., Dunoyer, C., Woronoff, N., Giraudoux, P., 2012. Westward Spread of *Echinococcus multilocularis* in Foxes, France, 2005–2010. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 2059–2062.
- Conraths, F.J., Deplazes, P., 2015. *Echinococcus multilocularis*: Epidemiology, surveillance and state-of-the-art diagnostics from a veterinary public health perspective. *Vet. Parasitol.* 213, 149–161.
- Deplazes, P., van Knapen, F., Schweiger, A., Overgaauw, P.A.M., 2011. Role of pet dogs and cats in the transmission of helminthic zoonoses in Europe, with a focus on echinococcosis and toxocarosis. *Vet. Parasitol.* 182, 41–53.
- Deutz, A., Fuchs, K., Auer, H., Kerbl, U., Aspöck, H., Köfer, J., 2005. *Toxocara*-infestations in Austria: a study on the risk of infection of farmers, slaughterhouse staff, hunters and veterinarians. *Parasitol. Res.* 97, 390–394.
- Dorny, P., Praet, N., Deckers, N., Gabriel, S., 2009. Emerging food-borne parasites. *Vet. Parasitol.* 163, 196–206.
- Dubey, J.P., 2010. *Toxoplasmosis of Animals and Man*. Second edition, CRC Press, Boca Raton. ed., 313pp.
- Dyachenko, V., Pantchev, N., Gawlowska, S., Vrhovec, M.G., Bauer, C., 2008. *Echinococcus multilocularis* infections in domestic dogs and cats from Germany and other European countries. *Vet. Parasitol.* 157, 244–253.
- Eckert, J., Deplazes, P., Kern, P., 2011. Alveolar echinococcosis (*Echinococcus multilocularis*) and other neotropical forms of *Echinococcus* (*Echinococcus vogeli* and *Echinococcus oligarthrus*), in: *Oxford Textbook of Zoonoses Biology, Clinical Practice, and Public Health Control*. pp. 669–699.
- Fahrion, A.S., Schnyder, M., Wichert, B., Deplazes, P., 2011. *Toxocara* eggs shed by dogs and cats and their molecular and morphometric species-specific identification: Is the finding of *T. cati* eggs shed by dogs of epidemiological relevance? *Vet. Parasitol.* 177, 186–189.
- Fallah, A.A., Makhtumi, Y., Pirali-Kheirabadi, K., 2016. Seasonal study of parasitic contamination in fresh salad vegetables marketed in Shahrekord, Iran. *Food Control* 60, 538–542.

- Forin-Wiart, M.-A., Gotteland, C., Gilot-Fromont, E., Poulle, M.-L., 2014. Assessing the homogeneity of individual scat detection probability using the bait-marking method on a monitored free-ranging carnivore population. *Eur. J. Wildl. Res.* 60, 665–672.
- Frenkel, J.K., Parker, B.B., 1996. An apparent role of dogs in the transmission of *Toxoplasma gondii*: the probable importance of xenosmophilia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 791, 402–407.
- Guislain, M.H., Raoul, F., Poulle, M.L., Giraudoux, P., 2007. Fox faeces and vole distribution on a local range: ecological data in a parasitological perspective for *Echinococcus multilocularis*. *Parasite* 14, 299–308.
- Guislain, M.-H., Raoul, F., Giraudoux, P., Terrier, M.-E., Froment, G., Hubert, F., Poulle, M.-L., 2008. Ecological and biological factors involved in the transmission of *Echinococcus multilocularis* in the French Ardennes. *J. Helminthol.* 82, 143–151.
- Gyang, P.V., Akinwale, O.P., Lee, Y.-L., Chuang, T.-W., Orok, A.B., Ajibaye, O., Liao, C.-W., Chen, P.-C., Chou, C.-M., Huang, Y.-C., Barghouth, U., Fan, C.-K., 2015. Seroprevalence, disease awareness, and risk factors for *Toxocara canis* infection among primary schoolchildren in Makoko, an urban slum community in Nigeria. *Acta Trop.* 146, 135–140.
- Janko, C., Schröder, W., Linke, S., König, A., 2012. Space use and resting site selection of red foxes (*Vulpes vulpes*) living near villages and small towns in Southern Germany. *Acta Theriol. (Warsz.)* 57, 245–250.
- Kapel, C.M.O., Torgerson, P.R., Thompson, R.C.A., Deplazes, P., 2006. Reproductive potential of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes, dogs, raccoon dogs and cats. *Int. J. Parasitol.* 36, 79–86.
- Kern, P., Ammon, A., Kron, M., Sinn, G., Sander, S., Petersen, L.R., Gaus, W., Kern, P., 2004. Risk factors for alveolar echinococcosis in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 10 (12), 2088–2093.
- Kłapeć, T., Borecka, A., 2012. Contamination of vegetables, fruit and soil with geohelminths eggs on organic farms in Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 19, 421–425.
- Knapp, J., Millon, L., Mouzon, L., Umhang, G., Raoul, F., Ali, Z.S., Combes, B., Comte, S., Gbaguidi-Haore, H., Grenouillet, F., Giraudoux, P., 2014. Real time PCR to detect the environmental faecal contamination by *Echinococcus multilocularis* from red fox stools. *Vet. Parasitol.* 201, 40–47.
- Knapp, J., Umhang, G., Poulle, M.-L., Millon, L., 2016a. Development of a real-time PCR for a sensitive one-step copro-diagnosis allowing both the identification of carnivore feces and the detection of *Toxocara* spp. and *Echinococcus multilocularis*. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM-03467.

- Knapp, J., Combes, B., Umhang, G., Aknouche, S., Millon, L., 2016b. Could the domestic cat play a significant role in the transmission of *Echinococcus multilocularis*? A study based on qPCR analysis of cat feces in a rural area in France. *Parasite* 23, 42.
- Krauze-Gryz, D., Gryz, J.B., Goszczyński, J., Chylarecki, P., Zmihorski, M., 2012. The good, the bad, and the ugly: space use and intraguild interactions among three opportunistic predators—cat (*Felis catus*), dog (*Canis lupus familiaris*), and red fox (*Vulpes vulpes*)—under human pressure. *Can. J. Zool.* 90, 1402–1413.
- Lass, A., Pietkiewicz, H., Szostakowska, B., Myjak, P., 2012. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 1101–1108.
- Lass, A., Szostakowska, B., Myjak, P., Korzeniewski, K., 2015. The first detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in environmental fruit, vegetable, and mushroom samples using nested PCR. *Parasitol. Res.* 114, 4023–4029.
- Lass, A., Szostakowska, B., Myjak, P., Korzeniewski, K., 2016. Fresh fruits, vegetables and mushrooms as transmission vehicles for *Echinococcus multilocularis* in highly endemic areas of Poland: reply to concerns. *Parasitol. Res.* 115, 3637–3642.
- Lélu, M., Gilot-Fromont, E., Aubert, D., Richaume, A., Afonso, E., Dupuis, E., Gotteland, C., Marnef, F., Poulle, M.-L., Dumètre, A., Thulliez, P., Dardé, M.-L., Villena, I., 2011. Development of a sensitive method for *Toxoplasma gondii* oocyst extraction in soil. *Vet. Parasitol.* 183, 59–67.
- Lélu, M., Villena, I., Darde, M.-L., Aubert, D., Geers, R., Dupuis, E., Marnef, F., Poulle, M.-L., Gotteland, C., Dumetre, A., Gilot-Fromont, E., 2012. Quantitative Estimation of the Viability of *Toxoplasma gondii* Oocysts in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5127–5132.
- Liu, Q., Wei, F., Gao, S., Jiang, L., Lian, H., Yuan, B., Yuan, Z., Xia, Z., Liu, B., Xu, X., Zhu, X.-Q., 2009. *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in China. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 162–166.
- Mizgajska-Wiktor, H., Jarosz, W., Fogt-Wyrwas, R., Drzewiecka, A., 2017. Distribution and dynamics of soil contamination with *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs in Poland and prevention measures proposed after 20 years of study. *Vet. Parasitol.* 234, 1–9.
- Nijse, R., Mughini-Gras, L., Wagenaar, J.A., Franssen, F., Ploeger, H.W., 2015. Environmental contamination with *Toxocara* eggs: a quantitative approach to estimate the relative contributions of dogs, cats and foxes, and to assess the efficacy of advised interventions in dogs. *Parasit. Vectors* 8: 397.

- Opel, K.L., Chung, D., McCord, B.R., 2010. A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR. *J. Forensic Sci.* 55, 25–33.
- Overgaauw, P.A.M., van Knapen, F., 2013. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Vet. Parasitol.* 193, 398–403.
- Piarroux, M., Piarroux, R., Knapp, J., Bardonnet, K., Dumortier, J., Watelet, J., Gerard, A., Beytout, J., Abergel, A., Bresson-Hadni, S., Gaudart, J., for the FrancEchino Surveillance Network, 2013. Populations at Risk for Alveolar Echinococcosis, France. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 721–728.
- Piarroux, M., Gaudart, J., Bresson-Hadni, S., Bardonnet, K., Faucher, B., Grenouillet, F., Knapp, J., Dumortier, J., Watelet, J., Gerard, A., others, 2015. Landscape and climatic characteristics associated with human alveolar echinococcosis in France, 1982 to 2007. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 20.
- Pouille, M.-L., Forin-Wiart, M.-A., Josse-Dupuis, É., Villena, I., Aubert, D., 2016. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA by qPCR in the feces of a cat that recently ingested infected prey does not necessarily imply oocyst shedding. *Parasite* 23, 29.
- Raoul, F., Hegglin, D., Giraudoux, P., 2015. Trophic ecology, behaviour and host population dynamics in *Echinococcus multilocularis* transmission. *Vet. Parasitol.* 213, 162–171.
- Reischl, U., Bretagne, S., Krüger, D., Ernault, P., Costa, J.-M., 2003. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect. Dis.* 3, 7.
- Robert-Gangneux, F., Aubert, D., Villena, I., 2015. Toxoplasmosis: A Widespread Zoonosis Diversely Affecting Humans and Animals. In: Sing, A. (Ed.), *Zoonoses - Infections Affecting Humans and Animals: Focus on Public Health Aspects*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 355–376.
- Robertson, L.J., van der Giessen, J.W., Batz, M.B., Kojima, M., Cahill, S., 2013. Have foodborne parasites finally become a global concern. *Trends Parasitol* 29, 101–103.
- Shimalov, V., Shimalov, V., 2002. Helminth fauna of the red fox (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) in southern Belarus. *Parasitol. Res.* 89, 77–78.
- Slifko, T.R., Smith, H.V., Rose, J.B., 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int. J. Parasitol.* 30, 1379–1393.
- Sommerfelt, I.E., Cardillo, N., López, C., Ribicich, M., Gallo, C., Franco, A., 2006. Prevalence of *Toxocara cati* and other parasites in cats' faeces collected from the open spaces of public institutions: Buenos Aires, Argentina. *Vet. Parasitol.* 140, 296–301.

- Szostakowska, B., Lass, A., Kostyra, K., Pietkiewicz, H., Myjak, P., 2014. First finding of *Echinococcus multilocularis* DNA in soil: Preliminary survey in Varmia-Masuria Province, northeast Poland. *Vet. Parasitol.* 203, 73–79.
- Torgerson, P.R., Schweiger, A., Deplazes, P., Pohar, M., Reichen, J., Ammann, R.W., Tarr, P.E., Halkik, N., Müllhaupt, B., 2008. Alveolar echinococcosis: From a deadly disease to a well-controlled infection. Relative survival and economic analysis in Switzerland over the last 35 years. *J. Hepatol.* 49, 72–77.
- Umhang, G., Comte, S., Raton, V., Hormaz, V., Boucher, J.-M., Favier, S., Combes, B., Boué, F., 2014. *Echinococcus multilocularis* infections in dogs from urban and peri-urban areas in France. *Parasitol. Res.* 113, 2219–2222.
- Umhang, G., Forin-Wiart, M.-A., Hormaz, V., Caillot, C., Boucher, J.-M., Poulle, M.-L., Franck, B., 2015. *Echinococcus multilocularis* detection in the intestines and feces of free-ranging domestic cats (*Felis s. catus*) and European wildcats (*Felis s. silvestris*) from northeastern France. *Vet. Parasitol.* 214, 75–79.
- Veit, P., Bilger, B., Schad, V., Schäfer, J., Frank, W., Lucius, R., 1995. Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasitology* 110, 79–86.
- Villeneuve, A., Polley, L., Jenkins, E., Schurer, J., Gilleard, J., Kutz, S., Conboy, G., Benoit, D., Seewald, W., Gagné, F., 2015. Parasite prevalence in fecal samples from shelter dogs and cats across the Canadian provinces. *Parasit. Vectors* 8: 281.

Table II.B.1 Primers and hydrolysis probes used to detect *Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii* and *Toxocara* spp. parasites, and carnivore host identification of copro-samples

Targeted species	Gene	Sequence name	Nucleotide sequence	Reference
<i>E. multilocularis</i>	<i>rrnL</i>	rrn-Fwd	5'-CTGTGATCTTGGTGTAGTAGTTGAGATTT3'	Knapp <i>et al.</i> , 2014
		rrn-Rev	5'-GGCTTACGCCGGTCTTAACTC-3'	
		rrn-probe	5'-TGGTCTGTTCGACCTTTTTAGCCTCCAT-3'	
<i>Toxocara</i> spp.	<i>CoxI</i>	Toxo-Fwd	5'-AAAATAGCCAAATCCACACTACTACCA-3'	Knapp <i>et al.</i> , 2016a
		Toxo-Rev	5'-GGTGTGGGACTAGTTGAACTGTGTA-3'	
		Toxo-probe	5'-CCCCATAGTCCTCAAAG-3'	
<i>T. gondii</i>	<i>529-rep</i>	Tg-Fwd	5'-AGAGACACCGGAATGCGATCT-3'	Lélu <i>et al.</i> , 2011
		Tg-Rev	5'-CCCTCTTCTCCACTCTTCAATTCT-3'	
		Tg-probe	5'-ACGCTTTCCTCGTGGTGTGGCG-3'	
<i>Vulpes vulpes</i>	<i>CytB</i>	Vv-Fwd	5'-ACCTTCCCGCACCATCAAA-3'	Knapp <i>et al.</i> , 2016a
		Vv-Rev	5'-TGTTGCAATCTGTAGAATAAGGCATA-3'	
		Vv-probe	5'-CTGCCTGATGGAACCTCGGGTCCC-3'	
<i>Canis familiaris</i>	<i>CytB</i>	Cf-Fwd	5'-CCACCCACTAGCCAAAATTGTT-3'	Knapp <i>et al.</i> , 2016a
		Cc-Rev	5'-AAGTTCCATCAAGCAGAGATGTTAGA-3'	
		Cf-probe	5'-ATAACTCATTCAATTGACCTCCCAGCGCC	
<i>Felis s. catus</i>	<i>CytB</i>	Fc-Fwd	5'-CCCTTCTAGGAGTCTGCCTAATCTT-3'	Knapp <i>et al.</i> , 2016a
		Fc-Rev	5'-CGGTTATTGTGTCTGATGTGTAGTGT-3'	
		Fc-probe	5'-AAATCCTCACCGGCCTCTTTTTGGC-3'	
<i>Geotrichum candidum</i>	<i>CytB</i>	Geo-Fwd	5'-CACCGCCCGTCGCTAC-3'	Knapp <i>et al.</i> , 2014
		Geo-Rev	5'-AGAAAAGTTGCCCTCTCCAGTT-3'	
		Geo-probe	5'-TCAATCCGGAAGCCTCACTAAGCCATT-3'	

Table II.B.2. Concordance matrix between faeces identification based on morphological assessment and on molecular analysis. In grey cells: occurrence of faeces per species for which the morphological identification was concordant with the molecular analysis (e.g. 19 out of 23 faeces identified as fox faeces from morphological examination were confirmed in molecular analysis). In other cells: the number and percentage of faeces for which the morphological identification did not correspond with the molecular analysis. Percentages are given with their 95% confidence intervals.

	Fox by PCR		Dog by PCR		Cat by PCR	
Fox	19/23	82.6% (61.2–95.0)	0/23	0	4/23	17.4% (4.9–38.8)
Dog	3/19	15.8% (3.4–39.6)	12/19	63.2% (38.3–83.7)	4/19	21.1% (6.0–45.5)
Cat	6/62	9.7% (3.6–19.9)	2/62	3.2% (0.4–11.1)	54/62	87.1% (76.1–94.3)

Table II.B.3. Occurrence of cat, fox, dog and unidentified faeces collected in kitchen gardens that yielded positive qPCR results for the detection of *Echinococcus multilocularis*, *Toxocara* spp. or *Toxoplasma gondii* DNA as compared to the total number of faeces that yielded qCR results for the given emitters and parasites (i.e. faeces without inhibitors). Percentages are given with their 95% confidence intervals.

	<i>Toxocara</i> spp.		<i>E. multilocularis</i>		<i>Toxoplasma gondii</i>	
Cat	31/93	33.3% (27.0–48.6)	6/86	7% (2.6–14.6)	2/125	1.6% (0.1–5.7)
Red fox	8/69	11.6% (5.1–21.6)	24/69	34.8% (23.5–47.6)	0/28	0%
Dog	1/18	5.5% (0.1–27.3)	2/18	11.1% (1.4–34.7)	2/21	9.5% (1.2–30.4)
Unidentified	0/13	0%	2/13	15.4% (1.9–45.4)	1/25	4.0% (0.1–20.3)
Total	40/193	20.7% (15.2–27.1)	34/186	18.3% (13.0–24.6)	5/199	2.5% (0.8–5.7)

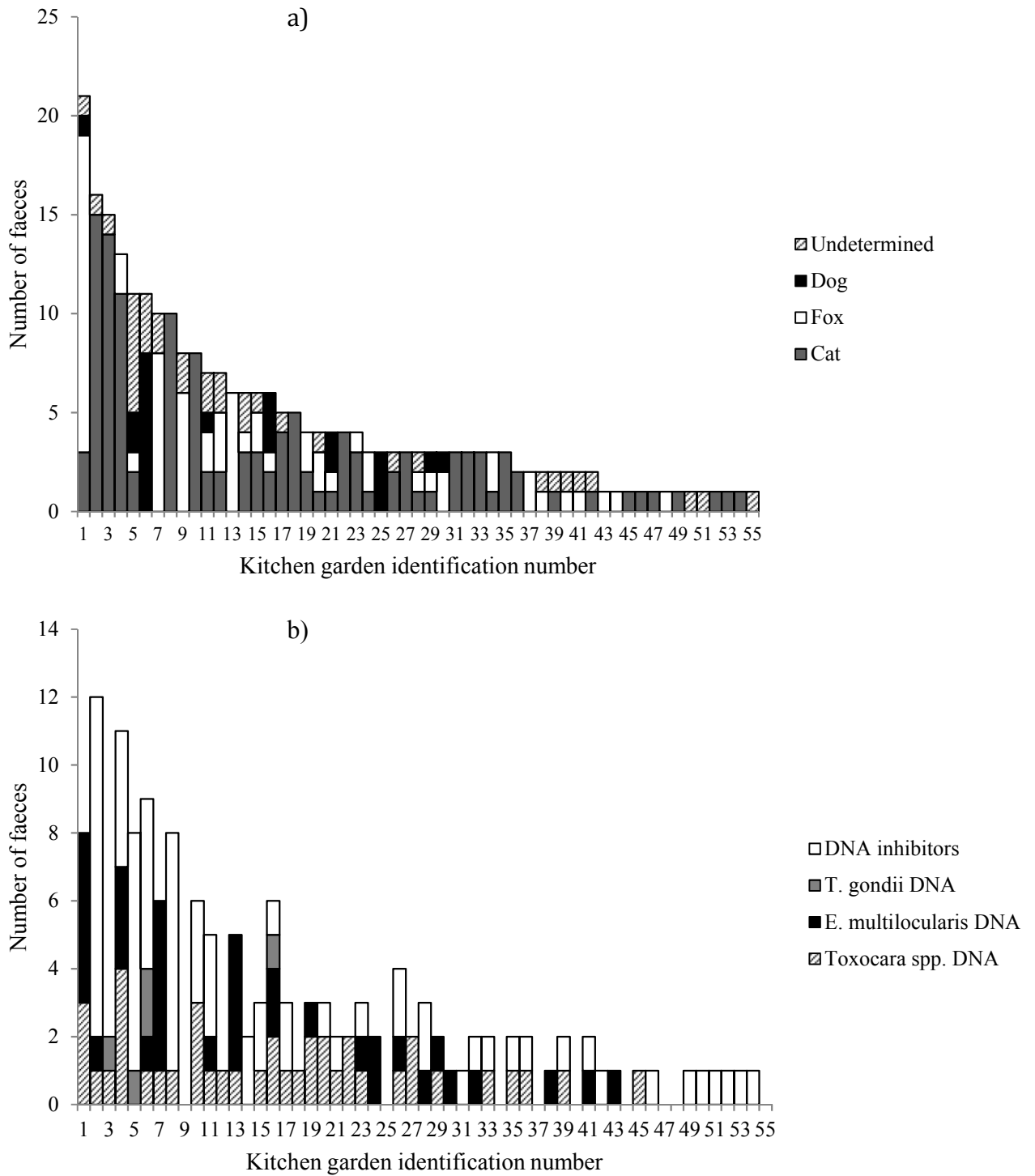


Figure II.B.1: The number of carnivore faeces collected in the 55 (out of 94) sampled kitchen gardens in which at least one stool was collected; a) the number of cat, fox, dog and unidentified faeces; b) the number of faeces that yielded positive results for the detection of *Toxocara* spp., *Echinococcus multilocularis* or *Toxoplasma gondii*, as well as the number of faeces with DNA inhibitors.

C. Article 2: High density of fox and cat faeces in kitchen gardens and resulting rodent exposure to *Echinococcus multilocularis* and *Toxoplasma gondii*.

Matthieu Bastien^{1,2,3}, Amélie Vaniscotte⁴, Benoit Combes³, Gérald Umhang⁵, Estelle Germain⁶, Valentin Gouley², Alice Pierlet², Thomas Quintaine^{1,2}, Marie-Amélie Forin-Wiart^{1,2}, Isabelle Villena^{1,7}, Dominique Aubert^{1,7}, Franck Boué⁵ and Marie-Lazarine Poulle^{1,2}

¹University of Reims Champagne-Ardenne, EA 3800 PROTAL, SFR Cap Santé, 51092 Reims cedex, France ;

²University of Reims Champagne-Ardenne, CERFE, 08240 Boult-aux-Bois, France ;

³French Establishment for Fighting Zoonoses (ELIZ), Domaine de Pixérécourt, 54220 Malzéville, France ;

⁴EcoDataDesign, France ;

⁵ANSES, Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife, National Reference Laboratory for *Echinococcus* spp., Wildlife Eco-epidemiology and Surveillance Unit, 54220 Malzéville, France ;

⁶Research and Observation Centre on Carnivores (CROC), 57590 Lucy, France ;

⁷ University Hospital of Reims, Department of Parasitology-Mycolology, National Reference Centre on *Toxoplasma*, 51092 Reims cedex, France ;

Address for correspondance: M. Bastien. bastien.matth@gmail.com

Soumis à Folia Parasitologica

Abstract

The faeces of the red fox (*Vulpes vulpes*) and the domestic cat (*Felis catus*) can be responsible for the spread of *Echinococcus multilocularis* eggs and *Toxoplasma gondii* oocysts into the environment. The accidental ingestion of these eggs or oocysts through consumption of raw fruits or vegetables in contact with contaminated soil can lead to alveolar echinococcosis (AE) or toxoplasmosis infection in humans. This study provides a quantitative assessment of the faecal deposition by foxes and cats in kitchen gardens where fruits and vegetables are grown, and the consequences of this deposit in zoonosis transmission. Regarding that the density of definitive host faeces is one of the main factor of infection risk for intermediate hosts, the density of fox and cat faeces, as well as the prevalence of both AE and toxoplasmosis in rodent populations (contaminated by ingestion of eggs or oocysts like humans), were compared within and outside of kitchen gardens. Our results showed that mean density of fox faeces did not significantly differ between kitchen gardens and habitat edges (0.29 ± 0.04 faeces/m² versus 0.22 ± 0.02 faeces/m²), the latter being known as habitat of high fox faeces densities. Likewise, the density of cat faeces was significantly higher within than outside of kitchen gardens (0.86 ± 0.22 faeces/m² versus 0.04 ± 0.02 faeces/m²). The sampled kitchen gardens might thus be considered as one of the possible hotspots for both fox and cat defecation. Over the 130 rodents trapped, 14% were infected by at least one species of fox or cat intestinal parasites and they are significantly more often contaminated when they are exposed to a kitchen garden. These results suggest that deposition of red fox and cat faeces in kitchen gardens is a clear concern for the transmission risk of *E. multilocularis* and *T. gondii* and should be prevented using effective means.

Keywords: *Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii*, kitchen gardens, carnivore faeces; intermediate hosts

INTRODUCTION

The use of relatively small cultivated plots devoted to growing food for household consumption is generally considered beneficial since these kitchen gardens provide herbs, fruits and vegetables that contribute to household health and food security (Finerman and Sackett 2003, Litt *et al.* 2011, Marsh 1998, Reyes-García *et al.* 2012). However, excepted few studies (Blaszkowska *et al.* 2011, Piarroux *et al.*, 2013), little attention has been paid to the potential health risk associated with the contamination of kitchen gardens by foodborne agents, including the zoonotic parasites *Echinococcus multilocularis* and *Toxoplasma gondii*. *Echinococcus multilocularis* is responsible for human alveolar echinococcosis (AE), a rare but life-threatening helminthic zoonosis that is considered one of the most dangerous in the northern hemisphere (Eckert *et al.* 2011). *Toxoplasma gondii* is responsible for toxoplasmosis, a zoonosis that is usually subclinical, but may cause severe neurologic or ocular disease in congenitally infected children, as well as neurological or ocular damage, or even death, in immunosuppressed patients (Dubie and Tere 2014, Robert-Gangneux *et al.* 2015).

Echinococcus multilocularis and *T. gondii* reproduce in the intestines of the carnivores that are their definitive hosts, producing microscopic eggs (*E. multilocularis*) or oocysts (*T. gondii*) spread into the environment with the host's faeces. The density of definitive host faeces is one of the main factor of both the infection of intermediate hosts with *E. multilocularis* (Giraudoux *et al.* 2003) and the contamination of soil by *T. gondii* (Afonso *et al.* 2008). In Europe, the red fox (*Vulpes vulpes*) is the main definitive host of *E. multilocularis* (Eckert and Deplazes 2004). Free-roaming domestic dogs (*Canis lupus familiaris*) and domestic cats (*Felis silvestris catus*) can also carry this parasite in their intestines, but these carnivores are considered less responsible than red foxes for the spread of *E. multilocularis* eggs in the environment. Indeed, the prevalence of this parasite in dog populations is very low (Deplazes *et al.* 2004) and the excretion of its eggs by cats are controversial (Kapel *et al.* 2006, Umhang *et al.* 2015). Felids are the only definitive host species for *T. gondii*, and the domestic cat is generally the main definitive host of this parasite in Western Europe (Gilot-Fromont *et al.* 2012).

Echinococcus multilocularis eggs and *T. gondii* oocysts are very resistant in the environment and can remain viable and infectious for months or years in optimal conditions of low temperature and high humidity (Federer *et al.* 2015, Veit *et al.* 1995, Lélou *et al.* 2012). In Europe, the principal *E. multilocularis* intermediate hosts are the European water vole (*Arvicola terrestris*) and meadow voles (*Microtus* sp.) (Eckert and Deplazes 2004). The prevalence of AE in rodent species populations in endemic areas is generally less than 1–6% (Eckert *et al.* 2011). Around the world, all warm-blooded animals, including rodent species, can act as *T. gondii*

intermediate hosts (Tenter *et al.* 2000). Depending on the host species, the geographical area and the season of the year, up to 73% of small rodents may have antibodies against *T. gondii* revealing a past infection (Tenter *et al.* 2000). The eggs of *E. multilocularis* and the oocysts of *T. gondii* can have been dropped off in vegetables and fruit in contact with contaminated soil (Lass *et al.* 2012, Lass *et al.* 2015), and their accidental ingestion can be a direct source of human contamination (Cook *et al.* 2000, Kern *et al.* 2004). Results from a preliminary study conducted in a high AE-endemic area in northeastern France revealed that the deposition of fox and cat faeces in kitchen gardens devoted to growing fruit and vegetables is not negligible in this area, nor is the percentage of faeces that yielded positive qPCR results for *E. multilocularis* and *T. gondii* (Pouille *et al.* in revision).

The present study explored the potential epidemiological consequences of faeces deposit by investigating the fox and cat faeces density, the occurrence of *E. multilocularis* and *T. gondii* in definitive host faeces and the prevalence of both AE infection and *T. gondii* antibodies in rodent populations within and outside of kitchen gardens. Rodents were chosen because they are hosts both for *E. multilocularis* and *T. gondii* and become infected by free-living stages of these parasites that are also infectious for humans (Reperant *et al.* 2009). Infection by the *Taenia* genus was also considered because the eggs of these parasites are also shed by cats, dogs and foxes and this parasite is generally more prevalent in Europe than *E. multilocularis* and *T. gondii* species. In Switzerland, *Taenia taeniaeformis* was founded in respectively 20% and 33% of the *Arvicola terrestris* sampled in Zurich and in the canton of Geneva (Hofer *et al.* 2000, Reperant *et al.* 2009). In Austria 22% of *Microtus* sp. and 30% of the *A. terrestris* trapped were infected (Führer *et al.* 2010). Infection by this genus was thus used to provide a complete overview of environmental contamination that could result in rodent infection with canids and felids parasites spread by faeces.

MATERIALS AND METHODS

1. Study area and host populations

The study was based on data gathered in a survey conducted in 2013–2015 in a rural area of 650 km² located in the Ardennes region of northeastern France (49°25'N, 4°50'E) as well as on data previously collected in surveys conducted in the same region during previous sampling period (Table 2.C.1). The human population density is low (around 16 inhabitants/km²) and spread out in villages, most of which have less than 200 inhabitants. Most of the villages lie

close to habitats of woods or other vegetation that are generally used as retreat habitats by red foxes (Janko *et al.* 2012).

In the study area, the red fox density was about 3–4 foxes/km² during the 2003–2006 period (Guislain *et al.* 2007). The prevalence of *E. multilocularis* in the vulpine population during the 2001–2005 period was 53% (Guislain *et al.* 2008); The meadow vole and the water vole are the main prey of both red foxes (Guislain *et al.* 2008) and domestic cats (Forin-Wiart 2014) and 4.1% of the 710 rodents trapped during the 2010–2011 period have been shown to have antibodies against *T. gondii* (Gotteland *et al.* 2014). The cumulative incidence rate for human infection with AE during the 1982–2007 period in the region was between 2.74 and 6.10 – one of the highest reported in France (Piarroux *et al.* 2013).

2. Red fox and cat faeces density inside and outside of kitchen gardens

2.1. Cat and fox faeces Sampling outside kitchen gardens

Fox faeces outside kitchen gardens were collected in March and October 2004 and 2005 (Guislain *et al.* 2007) and in March and October 2007 and 2008 (Quintaine 2010), when the vegetation is most sparse. Transect walks were used for sampling. A band 2 m in width on either side of defined transects was surveyed in order to detect fox faeces, which were identified by their shape and size. Transects were defined in three types of habitat: arable land (1.895 ha sampled), grassland (3.21 ha sampled) and habitat edges (6.256 ha sampled). The habitat edges had vegetation of various heights, from nearly ground level to 2 m in height. These included road shoulders and stream banks as well as forest edges. The total sampled surface area was 11.361 ha.

The collection of cat faeces outside kitchen gardens was conducted during two 1-week sessions in November–December 2011 and March 2012 (Forin-Wiart *et al.* 2014). Transects were walked in two villages (Boult-aux-Bois and Briquenay) and in their surrounding pastures and meadows (see Forin-Wiart *et al.* 2014 for the method). A total surface area of 1.82 ha was sampled. Cat faeces were first discriminated visually in the field by their shape and size, and were then accurately identified using molecular analysis for host species in order to implement this previous study (Table 2.C.1).

2.2. Cat and fox faeces sampling inside kitchen gardens

From 2014 to 2015, 43 private kitchen gardens located in eight villages were prospected four times to detect the presence of cat and fox faeces. These gardens were used only for growing food (not ornamental plants), providing vegetables and fruits such as lettuce, potatoes, carrots,

leeks, cabbages, aromatic herbs, strawberries, etc. for one household. They were located in villages and situated close to houses; they had open access to foxes and cats due to the absence of continuous fencing. Out of the 43 kitchen gardens sampled, 46% were close to poultry, orchards or compost heaps – possible food sources for red foxes. To compare cat faeces density inside and outside kitchen gardens, only the faeces collected in kitchen gardens located in Boulton-aux-Bois and Briquenay, where cat faeces were also prospected outside kitchen gardens, were used for the analysis (Table 2.C.1).

Sampling was performed in October and March, i.e. outside of the gardening period, to avoid damage to seedlings. Each survey consisted of a visual scan of the whole garden surface in the course of a walked transect. Fox, cat or unidentified faeces were first discriminated visually in the field on the basis of their shape and size, and were later accurately identified by molecular analysis for host species (see following). All collected faeces were decontaminated for five days at -80 °C and stored at -20 °C before analysis. The size of the kitchen gardens sampled ranged from 16 m² to 1794 m², for a total sampled surface area of 5.91 ha.

A quantity of 0.5 g of each copro-sample was subjected to DNA extraction using the QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following manufacturer recommendations. The carnivore host species (fox, cat, dog) was identified by carrying out a multiplex real-time PCR assay using the protocol described in Knapp *et al.* (2016). The detection of DNA from *Toxoplasma gondii* was undertaken on a sub-sample of 763 faeces from the four first sampling sessions by real-time PCR as previously described (Pouille *et al.*, submitted).

2.3. Fox and cat density

Since the comparison of fox faeces density within and outside of kitchen gardens was performed on data collected in two different time periods separated by ten years, variability in fox density over this period could partly explain any difference in faeces density observed between habitats. To take this effect into account, significant changes in the mean number of hunted foxes per hunting period per village between the two sampling periods were estimated using a Wilcoxon, Mann and Whitney rank sum test and considered as a proxy for the temporal variability of fox density. The number of hunted foxes per hunting period (winter) per village was provided by the local Hunting Agency (Fédération départementale des chasseurs des Ardennes).

Since the turnover rate in the cat population of Boulton-aux-Bois and Briquenay was close to 1 during the 2008–2012 period (Forin-Wiart 2014, Gotteland 2013, Lélou 2010), the inter-annual cat density was considered stable during the whole study period.

3. Rodent trapping, necropsy and parasite detection

3.1. Rodent trapping

Rodent trapping was designed to target *Arvicola terrestris* and *Microtus* sp., but captures of bank voles (*Myodes glareolus*) and field mice (*Apodemus* sp.) also occurred. In April 2015, trapping was simultaneously conducted in 25 sites located in 100-m buffer zones around kitchen gardens and in 25 sites located at a distance of at least 200 m from any kitchen garden. In May 2016, a second trapping session was simultaneously conducted in 15 other sites located in 100-m buffer zones around kitchen gardens and in 10 sites located at a distance of at least 200 m from any kitchen garden. The selection of trapping sites was based on the presence of holes and grass tracks, which are characteristic of the presence of *Microtus* sp., and on earth mounds, which are characteristic of *Arvicola terrestris* (Giraudoux *et al.* 1995). *Arvicola terrestris* was trapped with Topcat traps (TOPCAT, GmbH, Wintersingen, CH) set up near mounds for three consecutive nights and checked once a day. Individuals from *Microtus* sp. were trapped with INRA live traps, which also allowed the capture of *Myodes glareolus* and *Apodemus* sp. In each of the 75 selected trapping sites, 34 INRA traps were set up in a line at intervals of 3 m for three consecutive nights and checked once a day, as per the standardized method of Spitz *et al.* (1974). Thus, a total of 65 Topcat traps and 1350 INRA traps were set up in the 100-m buffer zones around kitchen gardens, and 69 Topcat traps and 1156 INRA traps were set up at a distance of at least 200 m from any kitchen garden.

The geographical coordinates of each trapped individual were recorded using a global positioning system (GPS). The distance from this trapping point to the nearest kitchen garden was then calculated using the 'rgdal' package (Bivand *et al.* 2014) in order to classify trapped rodents as 'exposed' or 'not exposed' to parasites potentially spread by fox or cat faeces in a kitchen garden. The exposure/non-exposure variable was considered dependent on the mean movement range of individuals, which is 20 m for *Microtus arvalis* (Briner *et al.* 2005), 20 m for *Microtus agrestis* (Pusenius and Viitala 1993), 40 m for *Apodemus* sp. (Vukicevic-Radic *et al.* 2006), 80 m for *A. terrestris* females and 130 m for males (Stoddart 1970), and 135 m for *Myodes glareolus* (Kozakiewicz *et al.* 1993). If the distance between a rodent's capture location and the barycentre of the nearest kitchen garden was inferior or equal to the mean movement range reported for the species, the individual was considered 'exposed' to parasites potentially spread by fox and cat faeces in a kitchen garden. If not, it was considered 'not exposed'.

3.2. Rodent necropsy

Each trapped rodent was specifically identified on the basis of its size, morphology and teeth

characteristics with the aid of a reference atlas (Marchesi *et al.* 2008). It was then weighed, sexed and dissected. Hearts were submerged in 1mL of miliQ water and fluids were stored at -20 °C until analysis (see 3.3). In the case of the presence of lesions on the liver, samples were collected and stored at -20 °C until molecular analysis (see 3.4).

3.3. *Toxoplasma gondii* serological diagnosis

Heart fluids were tested for the presence of *T. gondii* antibodies using the modified agglutination test (MAT) for the detection of *T. gondii*-specific IgG antibodies (Dubey and Desmonts 1987) with antigen prepared at the Laboratory of Parasitology-Mycolology, Reims. A two-fold dilution was used for the serum, starting at 1:3 dilution. The 1:6 dilution was used as the threshold for the analysis of serological results as suggested by Gotteland *et al.* (2014).

3.4. PCR diagnosis of rodent livers for *E. multilocularis* and *Taenia* sp.

The DNA from sampled parasitic lesions was extracted using the iPrep purification instrument (Invitrogen, iPrep ChargeSwitch gDNATissue Kit). A multiplex PCR assay was carried out to diagnose parasitic species (Trachsel *et al.* 2007). Sequencing was performed to identify the species involved after comparison with the nucleotide sequences available in GenBank.

4. Data analysis

Analyses were performed using the statistical software program R 3.1.3 (R Core Team 2015). All confidence intervals were calculated using the Clopper and Pearson exact test for Binomial data.

4.1. Fox and cat faeces density inside and outside kitchen gardens

The density of fox and cat faeces (number of faeces found / sampled surface area in m²) was calculated per transect (for the outside garden sampling) or per kitchen garden (for the within garden sampling) and per sampling session. The mean density of fox and cat faeces were estimated per habitat i.e arable land, grassland, habitat edges and kitchen gardens.

The mean fox faeces density per habitat could not be normalized and thus the densities were compared using the Kruskal-Wallis rank sum test. The mean fox faeces density was compared pairwise among habitats using Dunn's *post hoc* tests. The mean cat faeces density inside and outside kitchen gardens of Boulton-aux-Bois and Briquenay was compared using a Wilcoxon, Mann and Whitney rank sum test.

4.2. Assessment of fox density per winter

The mean number of hunted foxes per winter was calculated and compared using a Wilcoxon,

Mann and Whitney rank sum test.

4.3. Prevalence of rodents exposed and not exposed to a kitchen garden

The prevalence of *E. multilocularis* and *T. gondii* in the rodent populations exposed *versus* not exposed to a kitchen garden was compared using a Chi-squared test.

RESULTS

1. Density of fox and cat faeces inside *versus* outside kitchen gardens

Within kitchen gardens, 88 fox faeces and 141 cat faeces were collected while 206 fox faeces and 261 cat faeces were collected outside kitchen gardens. Out of the 229 faeces collected inside kitchen garden, 186 (81%) were visually attributed to cats and foxes and the 43 others (19%) were not identified on the field. Molecular analyses confirmed the visual identification of host species for 76% of faeces visually attributed to fox and 79% of faeces visually attributed to cat. As a result, 16 faeces not identified on the field were attributed to red foxes (18% of faeces attributed to red fox by molecular analyses) and 27 were attributed to cat (19% of faeces attributed to cat by molecular analyses). Finally, 22 fox faeces (25%) were misattributed to cat on the field and 14 (9.9%) were misattributed to red fox on the field.

The mean density of fox faeces varied significantly according to the habitat (Kruskal-Wallis test: $\chi^2=19.712$, $df = 3$, $P<0.001$; Figure 2.C.1). It did not vary significantly between kitchen gardens and habitat edges (0.29 ± 0.04 faeces/m² and 0.22 ± 0.02 faeces/m², respectively; Dunn's *Post hoc* test; $P=0.959$), but was significantly higher in kitchen gardens than in grassland habitats (0.14 ± 0.03 ; Dunn's *Post hoc* test; $P=0.017$) or in arable land (0.04 ± 0.02 ; Dunn's *Post hoc* test; $P<0.001$). The mean density of cat faeces was significantly higher inside than outside kitchen gardens (0.86 ± 0.22 faeces/m² and 0.04 ± 0.02 cat faeces/ m², respectively; $W=1700$; $P<0.001$).

2. Prevalence in fox and cat faeces collected inside kitchen gardens.

Over the 88 fox faeces collected inside gardens, 21 (23.9%, 95% CI=15.4–34.1) were positive for the presence of *E. multilocularis* DNA. Over the 141 cat faeces, 6 (4.3%, 95% CI=1.6–9.0) were positive for the presence of *T. gondii* DNA. No fox faeces were found to be positive for *T. gondii*, whereas 2 cat faeces were positive for *E. multilocularis* DNA.

3. Fox density during the sampling period

The mean numbers of hunted foxes were not significantly different between time periods (Kruskal-Wallis rank sum test: $\chi^2=10.607$, $df = 5$, $P=0.060$; Figure 2.C.2), although a lower mean number of hunted foxes was recorded for the winter of 2013–2014 compared to the other winters (Figure 2.C.2).

4. Prevalence of rodents exposed versus not exposed to kitchen gardens

A total of 130 rodents were trapped: 47 *Arvicola terrestris*, 42 *Apodemus* sp., 32 *Microtus* sp. and 9 *Myodes glareolus* (Table 2.C.2). Of the 57 rodents exposed to kitchen gardens potentially contaminated by fox and cat faeces, 13 (23%, 95% CI=12.7–35.8) tested positive for at least one of the three parasites. This was significantly different to the 5 out of 73 rodents (7%, 95% CI=2.3–15.3) not exposed to kitchen gardens that tested positive (Table 2.C.2, $\chi^2=5.56$, $df=1$, $P=0.018$). *Echinococcus multilocularis* DNA was detected by PCR in 5 out of 130 trapped rodents (3.8%, 95% CI=1.3–8.7); its occurrence was 3 out of 57 rodents (5%, 95% CI=1.1–14.6) exposed to kitchen gardens in contrast to 2 out of 73 rodents (2.7%, 95% CI=0.3–9.5) not exposed to kitchen gardens. The three ‘exposed’ rodents testing positive for *E. multilocularis* were trapped close to three different kitchen gardens, two of which were located in the same village. *Toxoplasma gondii* antibodies were found in 4 out of 130 trapped rodents (3.1%, 95% CI=0.8–7.7); all four were exposed to different kitchen gardens in the same village. With the exception of *E. multilocularis* (which is in the Taeniidae family), the same *Taenia* cestode species was identified from liver lesions: *Taenia (Hydatigera) taeniaeformis*. Of the 57 rodents considered exposed to potentially contaminated kitchen gardens, 7 (12%, 95% CI=5.1–23.7) tested positive for *Taenia* sp. in contrast to 3 out of 73 rodents (4%, 95% CI=0.9–11.5) not exposed to kitchen gardens. The seven rodents testing positive for the presence of *Taenia* sp. were trapped close to six different kitchen gardens; two rodents were trapped in the same kitchen garden. One *A. terrestris* exposed to a potentially contaminated kitchen garden tested positive for both the presence of *E. multilocularis* DNA and *T. gondii* antibodies.

DISCUSSION

In addition to the detection of *E. multilocularis* and *T. gondii* on fruits and vegetables harvested in cultivated lands (Lass *et al.* 2012, Lass *et al.* 2015), our collection of fox and cat faeces contaminated with these parasites in kitchen gardens and the high prevalence we found for those

parasites in rodent population (Pouille *et al.* in revision, present study), support the hypothesis regarding that kitchen gardens might be micro-foci with a high transmission risk of foodborne zoonosis. Spatial heterogeneity in the probability of infection of intermediate hosts with *E. multilocularis* at a local scale has been reported in rural (Giraudoux *et al.* 2002) as well as urban areas (Hofer *et al.* 2000, Reperant *et al.* 2009, Robardet *et al.* 2011). Fox faeces distribution is known as one of the factors that can give rise to such micro-foci of *E. multilocularis* transmission (Giraudoux *et al.* 2002). Similarly, environmental contamination with *T. gondii* has been described as highly heterogeneous at the local scale and driven in large part by the spatial distribution of cat faeces (Afonso *et al.* 2008, Simon *et al.* in press).

Our results showed that the mean density of fox faeces within kitchen gardens did not significantly differ from that found along habitat edges, which are known to be a hotspot of fox faeces deposition compared to other habitats (Giraudoux *et al.* 2002, Guislain *et al.* 2007). This comparison is based on data collected in previous studies (Table 2.C.1) and thus need to be interpreted regarding some bias. Indeed, contrary to the molecular analyses done to identify host species for the faeces collected inside gardens, no molecular confirmation was performed to confirm host species of the faeces collected outside kitchen gardens (Guislain *et al.*, 2007; Quintaine *et al.*, 2010). In the present study, 24% of the faeces collected on the field were misattributed to fox. In return, 38/88 faeces attributed to fox by molecular analyses were not identified as from fox on the field. This result indicates that although some faeces could have been misattributed to foxes during the Guislain *et al.* (2007) study and the Quintaine (2010) study, others could have been not collected thinking it was not from fox. As a result, the fox density outside kitchen gardens wouldn't have been too much under or upper estimated despite the identification by molecular analysis was not performed. However, a simultaneous survey of fox faeces density within and outside kitchen gardens with an identification of faeces emitter in the two samples is advisable to confirm that kitchen gardens seem to be a non-negligible spot for fox defecation. Finally, kitchen gardens can be considered as an hotspot for cat faeces, since the mean density of cat faeces was much higher in kitchen gardens than outside of them.

Fox faeces density can vary with fox population density (Pleydell *et al.* 2004). In Germany, Janko *et al.* (2012) showed that fox density increased by a factor of 3–8 in rural villages compared to strictly rural areas. They postulated that villages and small towns offer foxes enough resources to reduce their home-range size if there are suitable retreat habitats (such as patches of woodland or vegetation) in the vicinity. In our study area, most of the villages were close to a retreat habitat; they also contained potential food sources for foxes such as poultry, orchards or compost heaps. Moreover, most of the kitchen gardens were located in the

proximity of open landscapes, which offer a suitable habitat for voles. As a result, the fox density at night, when foxes forage, is probably higher inside than outside villages, at least during October and March when most of the village inhabitants are inside their homes before nightfall. The high fox density in villages where kitchen gardens are located, coupled with the high food supply for foxes around kitchen gardens – which can result in frequent faeces deposition since the intensity of defecation by a red fox is positively linked to its food consumption during the previous hours (Goszczyński 1990) – may contribute to the high density of fox faeces observed in kitchen gardens. Concerning cat faeces, the higher density found within gardens may be partly explained by the concentration of the cat population inside a village, but may also be the result of cats' preference for defecating in loose soil so they can cover their faeces.

Regarding the high density of fox and cat faeces in kitchen gardens emphasize the importance of those areas in *E. multilocularis* and *T. gondii* transmission to intermediate hosts. Our results confirmed this hypothesis since we found that intermediate host rodents exposed to kitchen gardens potentially contaminated by fox or cat faeces were more often infected by fox or cat intestinal parasites than rodents not exposed to these gardens. Another factor increasing the infection risk in kitchen gardens is the preservation of the parasites' infectious stage in the environment. Kitchen gardens may provide particularly suitable conditions for taeniid eggs (including *E. multilocularis*) and *T. gondii* oocysts as they are watered during the dry summer period, and desiccation is thought to critically hamper the viability of these eggs and oocysts (Federer *et al.* 2015, Lélou *et al.* 2012). The high density of fox and cat faeces in conjunction with suitable conditions for the preservation of parasite eggs may explain why rodents exposed to potentially contaminated kitchen garden soil are 3.5 times more likely to be infected with fox and cat intestinal parasites than rodents not exposed to these gardens.

To conclude, our findings indicate that the presence of *E. multilocularis* and *T. gondii* in fox and cat faeces collected in the kitchen gardens of the study area should be considered a concern regarding the risk of transmission of these parasites to their intermediate hosts and thus may be also to humans, which are accidental hosts. Fox and cat faeces were found in high densities in kitchen gardens and DNA of parasites were detected inside. Moreover, the prevalence of parasitic infection in rodents was higher within than outside of kitchen gardens, demonstrating that the transmission cycle of both *E. multilocularis* and *T. gondii* is efficient in kitchen gardens. To our knowledge, no data are available on the amount of eggs or oocysts required to infect humans but considering that kitchen gardens are used to grow vegetables often destined to be

eaten raw, and considering that eggs or oocysts can be dropped off to fruit and vegetables in contact with contaminated soil (Lass *et al.* 2012, 2015), measures should be taken to prevent carnivores from depositing faeces within these cultivated areas.

Acknowledgements

We are very grateful to those who allowed us to sample their privately owned kitchen gardens. We are also indebted to S. Debrielle, Q. Gutknecht and A. Merieau, from the Fédération des Chasseurs des Ardennes, for providing data about fox hunting. Many thanks to Regine Geers, Vanessa Hormaz, Jean-Marc Boucher, Christophe Caillot and Camille Renault for their contribution to laboratory analysis, and to Elise Bradbury for the English editorial review. Financial support for this study was provided by the Conseil Général des Ardennes.

REFERENCES

- Afonso, E., Germain, E., Poulle, M.-L., Ruetten, S., Devillard, S., Say, L., Villena, I., Aubert, D., Gilot-Fromont, E., 2013. Environmental determinants of spatial and temporal variations in the transmission of *Toxoplasma gondii* in its definitive hosts. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 2, 278–285.
- Afonso, E., Lemoine, M., Poulle, M.-L., Ravat, M.-C., Romand, S., Thulliez, P., Villena, I., Aubert, D., Rabilloud, M., Riche, B., Gilot-Fromont, E., 2008. Spatial distribution of soil contamination by *Toxoplasma gondii* in relation to cat defecation behaviour in an urban area. *Int. J. Parasitol.* 38, 1017–1023.
- Afonso, E., Poulle, M.-L., Lemoine, M., Villena, I., Aubert, D., Gilot-Fromont, E., 2007. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in small mammals from the Ardennes region, France. *Folia Parasitol. (Praha)* 54, 313.
- Bivand, R., Keitt, T., Rowlingson, B., 2014. rgdal: Bindings for the geospatial data abstraction library. R Package Version 08-16.
- Blaszkowska, J., Kurnatowski, P., Damińska, P., 2011. Contamination of the soil by eggs of geohelminths in rural areas of Lodz district (Poland). *Helminthologia* 48, 67–76.
- Briner, T., Nentwig, W., Airoldi, J.-P., 2005. Habitat quality of wildflower strips for common voles (*Microtus arvalis*) and its relevance for agriculture. *Agric. Ecosyst. Environ.* 105, 173–179.
- Burnham, K.P., Anderson, D.R., 2004. Multimodel inference understanding AIC and BIC in model selection. *Sociol. Methods Res.* 33, 261–304.

- Cook, A. J. C., Gilbert, R. E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P. A., Foulon, W., Semprini, A. E., Dunn, D. T., Congenital, E. R. N., 2000. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *Br. Med. J.* 321, 142-147.
- Deplazes, P., Hegglin, D., Gloor, S., Romig, T., 2004. Wilderness in the city: the urbanization of *Echinococcus multilocularis*. *Trends Parasitol.* 20, 77–84.
- De Thoix, B., Demar, M., Aznar, C., Carme, B., 2003. Ecologic Correlates of *Toxoplasma gondii* Exposure in Free-ranging Neotropical Mammals. *J. Wildl. Dis.* 39, 456–459.
- Dubey, J.P., Desmonts, G., 1987. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine veterinary journal* 19, 337–339.
- Dubie, T., Tere, G., 2014. Toxoplasmosis: Epidemiology with the emphasis of its public health importance. *Merit Research Journals of Medicine and Medical Sciences.* 2(4), 097-108.
- Eckert, J., Deplazes, P., 2004. Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 107–135.
- Eckert, J., Deplazes, P., Kern, P., 2011. Alveolar echinococcosis (*Echinococcus multilocularis*) and neotropical forms of Echinococcosis (*Echinococcus vogeli* and *Echinococcus oligarthrus*), in: *Oxford Textbook of Zoonoses Biology, Clinical Practice, and Public Health Control.* pp. 669–699.
- Federer, K., Armua-Fernandez, M.T., Hoby, S., Wenker, C., Deplazes, P., 2015. In vivo viability of *Echinococcus multilocularis* eggs in a rodent model after different thermo-treatments. *Exp. Parasitol.* 154, 14–19.
- Finerman, R., Sackett, R., 2003. Using home gardens to decipher health and healing in the Andes. *Med. Anthropol. Q.* 17, 459–482.
- Forin-Wiart, M.-A., 2014. [Identification of the factors influencing the predation exerted by domestic cats (*Felis silvestris catus*) in a rural area.] PhD thesis, Reims Champagne Ardenne University. (in French).
- Forin-Wiart, M.-A., Gotteland, C., Gilot-Fromont, E., Poulle, M.-L., 2014. Assessing the homogeneity of individual scat detection probability using the bait-marking method on a monitored free-ranging carnivore population. *Eur. J. Wildl. Res.* 60, 665–672.
- Führer, H.-P., Schneider, R., Walochnik, J., Auer, H., 2010. Extraintestinal helminths of the common vole (*Microtus arvalis*) and the water vole (*Arvicola terrestris*) in Western Austria (Vorarlberg). *Parasitol. Res.* 106, 1001–1004.

- Gilot-Fromont, E., Llu, M., Dard, M.-L., Richomme, C., Aubert, D., Afonso, E., Mercier, A., Gotteland, C., Ville, I., 2012. The Life Cycle of *Toxoplasma gondii* in the Natural Environment, in: Djurkovi Djakovi, O. (Ed.), Toxoplasmosis - Recent Advances. InTech.
- Giraudoux, P., Craig, P.S., Delattre, P., Bao, G., Bartholomot, B., Harraga, S., Quéré, J.P., Raoul, F., Wang, Y., Shi, D., Vuitton, D.A., 2003. Interactions between landscape changes and host communities can regulate *Echinococcus multilocularis* transmission. *Parasitology*, 127, S1-S11.
- Giraudoux, P., Delattre, P., Takahashi, K., Raoul, F., Quéré, J.P., Craig, P., Vuitton, D., Pawlowski, Z., 2002. Transmission ecology of *Echinococcus multilocularis* in wildlife: what can be learned from comparative studies and multiscale approaches? In: Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on Cestode Zoonoses: Echinococcosis and Cysticercosis: An Emergent and Global Problem, Poznan, Poland, 10-13 September 2000. IOS Press, pp. 251–266.
- Giraudoux, P., Pradier, B., Delattre, P., Deblay, S., Salvi, D., Defaut, R., 1995. Estimation of water vole abundance by using surface indices. *Acta Theriol. (Warsz.)* 40, 77–96.
- Goszczyński, J., 1990. Scent marking by red foxes in Central Poland during the winter season. *Acta Theriol. (Warsz.)* 35, 7–16.
- Gotteland, C., Chaval, Y., Villena, I., Galan, M., Geers, R., Aubert, D., Poulle, M.-L., Charbonnel, N., Gilot-Fromont, E., 2014. Species or local environment, what determines the infection of rodents by *Toxoplasma gondii*? *Parasitology* 141, 259–268.
- Gotteland, C., 2013. [Spatial and temporal environmental contamination dynamic of *Toxoplasma gondii*]. PhD thesis, Reims Champagne Ardenne University. (in French)
- Guislain, M.-H., Raoul, F., Giraudoux, P., Terrier, M.-E., Froment, G., Ferte, H., Poulle, M.-L., 2008. Ecological and biological factors involved in the transmission of *Echinococcus multilocularis* in the French Ardennes. *J. Helminthol.* 143–151.
- Guislain, M.H., Raoul, F., Poulle, M.L., Giraudoux, P., 2007. Fox faeces and vole distribution on a local range: ecological data in a parasitological perspective for *Echinococcus multilocularis*. *Parasite* 14, 299–308.
- Hofer, S., Gloor, S., Müller, U., Mathis, A., Hegglin, D., Deplazes, P., 2000. High prevalence of *Echinococcus multilocularis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) and voles (*Arvicola terrestris*) in the city of Zürich, Switzerland. *Parasitology* 120, 135–142.
- Janko, C., Schröder, W., Linke, S., König, A., 2012. Space use and resting site selection of red foxes (*Vulpes vulpes*) living near villages and small towns in Southern Germany. *Acta Theriol. (Warsz.)* 57, 245–250.

- Kapel, C.M.O., Torgerson, P.R., Thompson, R.C.A., Deplazes, P., 2006. Reproductive potential of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes, dogs, raccoon dogs and cats. *Int. J. Parasitol.* 36, 79–86.
- Kern, P., Ammon, A., Kron, M., Sinn, G., Sander, S., Petersen, L.R., Gaus, W., Kern, P., 2004. Risk factors for alveolar echinococcosis in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 12.
- Knapp, J., Umhang, G., Poulle, M.-L., Millon, L., 2016. Development of a real-Time PCR for a sensitive one-step coprodiagnosis allowing both the identification of carnivore feces and the detection of *Toxocara* spp. and *Echinococcus multilocularis*. *Applied and Environmental Microbiology* 82, 2950–2958.
- Kozakiewicz, M., Kozakiewicz, A., Łukowski, A., Gortat, T., 1993. Use of space by bank voles (*Clethrionomys glareolus*) in a Polish farm landscape. *Landsc. Ecol.* 8, 19–24.
- Lass, A., Szostakowska, B., Myjak, P., Korzeniewski, K., 2015. The first detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in environmental fruit, vegetable, and mushroom samples using nested PCR. *Parasitology Research* 114, 4023–4029.
- Lass, A., Pietkiewicz, H., Szostakowska, B., Myjak, P., 2012. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 1101-1108.
- Lélu, M., Villena, I., Darde, M.-L., Aubert, D., Geers, R., Dupuis, E., Marnef, F., Poulle, M.-L., Gotteland, C., Dumetre, A., Gilot-Fromont, E., 2012. Quantitative Estimation of the Viability of *Toxoplasma gondii* Oocysts in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5127–5132.
- Lélu, M., 2010. [Study of a complex life-cycle parasite, *Toxoplasma gondii* : transmission cycle variability and environmental stage dynamic]. PhD thesis, Reims Champagne Ardenne University. (in French)
- Litt, J.S., Soobader, M.-J., Turbin, M.S., Hale, J.W., Buchenau, M., Marshall, J.A., 2011. The influence of social involvement, neighborhood aesthetics, and community garden participation on fruit and vegetable consumption. *Am. J. Public Health* 101, 1466–1473.
- Marchesi, P., Blant, M., Capt, S., 2008. Mammifères de Suisse- Clé de détermination, CSCF & SSBF. ed, Faune-Helvetica. Neufchatel.
- Marsh, R., 1998. Building on traditional gardening to improve household food security. *Food Nutr. Agric.* 4–14.
- Piarroux, M., Piarroux, R., Knapp, J., Bardonnat, K., Dumortier, J., Watelet, J., Gerard, A., Beytout, J., Abergel, A., Bresson-Hadni, S., Gaudart, J., for the FrancEchino Surveillance Network, 2013. Populations at Risk for Alveolar Echinococcosis, France. *Emerg. Infect.*

Dis. 19, 721–728.

- Pleydell, D.R.J., Raoul, F., Tourneux, F., Danson, F.M., Graham, A.J., Craig, P.S., Giraudoux, P., 2004. Modelling the spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* infection in foxes. *Acta Trop.* 91, 253–265. doi:10.1016/j.actatropica.2004.05.004
- Pouille, M.-L., Bastien, M., Richard, Y., Dupuis E., Aubert D., Villena I., Knapp J., Detection of *Echinococcus multilocularis* and other foodborne parasites in fox, cat and dog faeces collected in kitchen gardens in a high endemic area for Alveolar echinococcosis. *Vet. Parasitol.*, in revision.
- Pusenius, J., Viitala J., 1993. Varying Spacing Behaviour of Breeding Field Voles, *Microtus Agrestis*. In *Annales Zoologici Fennici*, 143–52.
- Quintaine, T., 2010. [Ecology of the transmission of *Echinococcus multilocularis*: identification of the suitable habitats and modelling of the effect of the definitive host behaviour, *Vulpes vulpes*.] PhD thesis, Franche-Comté University. (in French)
- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Reperant, L.A., Hegglin, D., Tanner, I., Fischer, C., Deplazes, P., 2009. Rodents as shared indicators for zoonotic parasites of carnivores in urban environments. *Parasitology* 136, 329.
- Reyes-García, V., Aceituno, L., Vila, S., Calvet-Mir, L., Garnatje, T., Jesch, A., Lastra, J.J., Parada, M., Rigat, M., Vallès, J., Pardo-De-Santayana, M., 2012. Home Gardens in Three Mountain Regions of the Iberian Peninsula: Description, Motivation for Gardening, and Gross Financial Benefits. *J. Sustain. Agric.* 36, 249–270.
- Robardet, E., Giraudoux, P., Caillot, C., Augot, D., Boue, F., Barrat, J., 2011. Fox defecation behaviour in relation to spatial distribution of voles in an urbanised area: An increasing risk of transmission of *Echinococcus multilocularis*? *Int. J. Parasitol* 41, 145–154.
- Robert-Gangneux, F., Aubert, D., Villena, I., 2015. Toxoplasmosis: A Widespread Zoonosis Diversely Affecting Humans and Animals, in: Sing, A. (Ed.), *Zoonoses - Infections Affecting Humans and Animals: Focus on Public Health Aspects*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 355–376.
- Ruiz, A., Frenkel, J.K., 1980. Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29, 1161–1166.
- Simon, J. A., Kurdzialewicz, S., Jeannot, E., Dupuis, E., Marnef, M., Aubert, D., Villena, I., Pouille, M.-L. Spatial distribution of soil contaminated with *Toxoplasma gondii* oocysts in

- relation to the distribution and use of domestic cat defecation sites on dairy farms. *Int. J. Parasitol.*, in press.
- Spitz, F., Le Louarn, H., Poulet, A., Dassonville, R., 1974. Standardisation des piégeages en ligne pour quelques espèces de rongeurs. *Rev. Ecol. (Terre & Vie)*, 28: 564-578.
- Stoddart, D.M., 1970. Individual range, dispersion and dispersal in a population of water voles (*Arvicola terrestris* L.). *J. Anim. Ecol.* 403–425.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30, 1217–1258.
- Trachsel, D., Deplazes, P., Mathis, A., 2007. Identification of taeniid eggs in the faeces from carnivores based on multiplex PCR using targets in mitochondrial DNA. *Parasitology* 134, 911.
- Torgerson, P.R., 2016. Fresh fruits, vegetables, and mushrooms as transmission vehicles for *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology Research* 115, 4447–4448.
- Umhang, G., Forin-Wiart, M.-A., Hormaz, V., Caillot, C., Boucher, J.-M., Poulle, M.-L., Franck, B., 2015. *Echinococcus multilocularis* detection in the intestines and feces of free-ranging domestic cats (*Felis s. catus*) and European wildcats (*Felis s. silvestris*) from northeastern France. *Vet. Parasitol.* 214, 75–79.
- Veit, P., Bilger, B., Schad, V., Schäfer, J., Frank, W., Lucius, R., 1995. Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasitology* 110, 79–86.
- Vukicevic-radic, O., Matic, R., Kataranovski, D., Stamenkovic, S., 2006. Spatial organization and home range of *Apodemus flavicollis* and *Apodemus agrarius* on Mt. Avala, Serbia. *Acta Zool. Acad. Sci. Hung.* 52, 81–96.

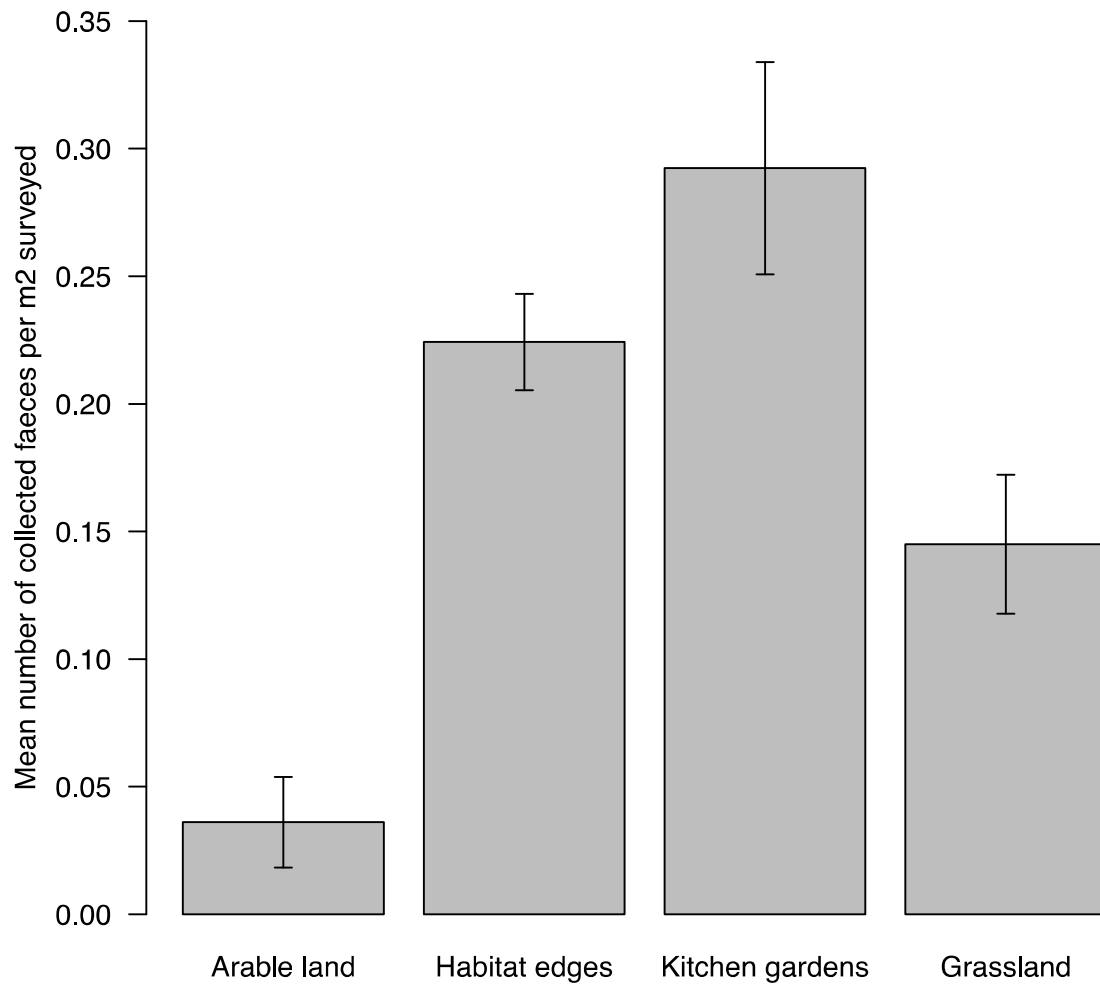


Figure II.C.1. Mean number of red fox faeces collected per m² surveyed (\pm standard errors) in arable land, habitat edges, kitchen gardens and grassland, assessed both from data collected in this study and from previous studies in the same study area by Guislain *et al.* (2007) and Quintaine (2010).

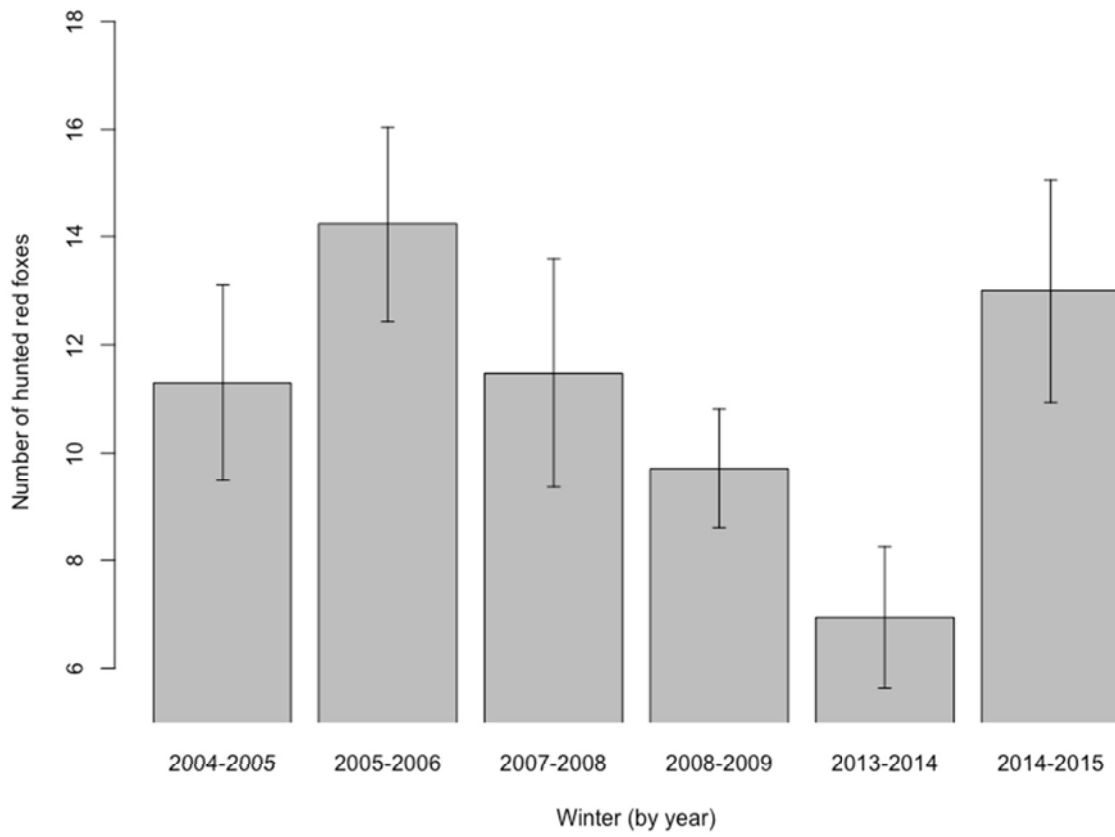


Figure II.C.2. Mean number of red foxes hunted per winter in the study area during the sampling period (mean \pm standard errors).

1 Table II.C.1. Information about the dataset used to assess fox faeces and cat faeces densities inside and outside kitchen gardens

Study	Goal	Definitive host	Host faeces identification	Sampled habitat	Period of collect	Parasite detection in faeces
Guislain <i>et al.</i> 2007	Investigate the overlap between the spatial distributions of voles and fox faeces in relation with the transmission dynamics of <i>E. multilocularis</i>	Red Fox (<i>Vulpes vulpes</i>)	Visual	<ul style="list-style-type: none"> - Arable land - Grassland - Habitat edges 	March & Oct. 2004 & 2005	None
Quintaine 2010 (PhD)					March & Oct. 2007 & 2008	
Forin-Wiart <i>et al.</i> 2014)	Assess the individual scat detection probability in a rural free ranging cat population	Domestic cat (<i>Felis s. catus</i>)	Molecular (genotyping)	2 villages (Briquenay & Boult-aux-bois) and their surrounding pastures and meadows	Nov-Dec 2011 March 2012	None
Present study	Assess the fox and cat densities in kitchen gardens and the rodent exposure to their parasites.	Fox & Cat	Molecular (qPCR)	Kitchen gardens	Oct. & March 2014 & 2015	<i>E. multilocularis</i> & <i>T. gondii</i>

2

Table II.C.2. Occurrence of rodent species according to their exposure to kitchen gardens, and infectious status. Percentages are provided with their 95% CI.

	Species	Trapped	Infected	Infected by <i>E. multilocularis</i>	With antibodies against <i>T. gondii</i>	Infected by <i>Taenia</i> sp.
Exposed	<i>A. terrestris</i>	33	9	2	2	6
	<i>Microtus</i> sp.	6	1	0	1	0
	<i>Myodes glareolus</i>	4	1	0	1	0
	<i>Apodemus</i> sp.	14	2	1	0	1
	Total	57	13 (23% [12.7–35.8])	3 (5% [1.1–14.6])	4 (7% [1.9–17.0])	7 (12% [5.1–23.7])
Not exposed	<i>A. terrestris</i>	14	1	0	0	1
	<i>Microtus</i> sp.	26	4	2	0	2
	<i>Myodes glareolus</i>	5	0	0	0	0
	<i>Apodemus</i> sp.	28	0	0	0	0
	Total	73	5 (7% [2.3–15.3])	2 (3% [0.3–9.5])	0	3 (4% [0.9–11.5])

III.PARTIE II : Caractérisation des potagers à risque de parasitoses lié au dépôt de fèces de chat, chien et renard.

A. Préambule

La distribution des fèces de carnivores parasités dans l'environnement résulte de la distribution spatiale de ces fèces et de la distribution des parasites dans les populations de carnivores hôtes définitifs. De nombreuses espèces de mammifères, en particulier les carnivores, utilisent leurs fèces à des fins de marquage et, de ce fait, tendent à les déposer de façon à ce qu'elles soient facilement détectées par des congénères, en bordure de territoire (Stewart *et al.* 2001), le long de sentiers ou de façon surélevée (Wemmer *et al.* 1996, Barja *et al.* 2005). Quelques espèces ont également des zones dédiées à ce comportement, comme des latrines qui peuvent être utilisées par un seul individu (musaraigne, porc-épic, ...) ou plusieurs (ratons-laveurs, hyènes tachetées, protèles, chats domestiques, MacDonald 1980, Page *et al.* 1998, Sagara 1999, Afonso *et al.* 2008). Ces comportements induisent donc un dépôt de fèces hétérogène dans l'environnement.

En plus de l'hétérogénéité spatiale du dépôt de fèces par les carnivores, la charge parasitaire et la prévalence d'individus contaminés sont des modificateurs du risque de contamination environnementale. La prévalence d'un parasite peut être variable d'une population à l'autre, c'est notamment le cas pour *E. multilocularis* (Miterpakova *et al.* 2006, Combes *et al.* 2012, Guerra *et al.* 2014). Ainsi, le parasite a été retrouvé dans les intestins de 30% des renards roux analysés au Luxembourg (Takumi *et al.* 2007), 46% de ceux analysés en Suisse (Reperant *et al.* 2007), ou encore 53% de ceux provenant des Ardennes françaises (Guislain *et al.* 2008). De même, la prévalence de *Toxocara* spp. dans les populations de chats et chiens est très variable d'une région à l'autre. En Europe de l'Ouest, les taux d'infection par *T. canis* reportés chez les chiens varient entre 3,5% et 34% et celles de *T. cati* chez les chats oscillent entre 8% et 76% (Deplazes *et al.* 2011).

Par ailleurs, dans les populations d'hôtes définitifs, certaines catégories d'individus sont plus fréquemment contaminées que d'autres. Les chiots de moins de trois mois sont ainsi souvent identifiés comme étant les principaux responsables de la contamination environnementale par *Toxocara canis* car ils sont très fréquemment parasités (Overgaauw et Nederland 1997, Luty 2001, Morgan *et al.* 2013). De même, les jeunes chats ont une probabilité plus élevée que les chats adultes de faire une primo-infection et donc d'être excréteurs de millions d'oocystes de *T. gondii* dans leurs fèces (Dubey 2004). De plus, la charge parasitaire peut être variable d'un individu à l'autre. Ainsi, dans les études conduites en France et en Suisse, moins de 10% des

renards portaient plus de 70% de la biomasse d'*E. multilocularis* (Raoul *et al.* 2001, Fischer *et al.* 2005, Guislain *et al.* 2008).

Dans le chapitre I, nous avons montré que les potagers semblent être des lieux privilégiés de défécation pour les carnivores et, comme certains de ceux-ci sont porteurs de parasites responsables de zoonoses, les potagers semblent être favorables à la contamination des hôtes intermédiaires. Cependant, cette contamination des terrains maraichers par les parasites de carnivores ne semble pas homogène puisque 25% seulement des potagers échantillonnés concentraient plus de 75% des fèces collectées.

Dans ce contexte, l'objectif de ce second chapitre est d'identifier les facteurs expliquant le dépôt de fèces de chat, chien et renard dans les potagers et la distribution des parasites dans ces fèces. Pour ce faire, nous avons échantillonné 192 potagers répartis dans les départements des Ardennes et de la Moselle. Huit sessions de prospection et collecte de fèces de carnivores ont été réalisées au cours des hivers 2014-2015 et 2015-2016. Au total, 1016 fèces de chat, chien ou renard ont été collectées et, pour chaque déjection, l'hôte a été identifié visuellement sur le terrain, sur la base de leur morphologie, avant d'être vérifié par biologie moléculaire. Pour 22,5% des fèces, le collecteur n'a pas pu identifier d'hôte sur la base des critères morphologiques bien qu'elles aient été assignées à un hôte chat, chien ou renard par biologie moléculaire. Lorsqu'un collecteur identifiait une espèce hôte pour la crotte collectée sur le terrain, il se trompait dans 25,6% des cas. Le taux d'erreur d'assignation sur le terrain était plus important lorsque le collecteur désignait le chien comme espèce hôte avec 49,2% de mauvaise assignation comparé au taux d'erreur d'assignation de 31,9% pour le renard et 16% pour le chat (Tableau III.A.1).

Les analyses suivantes ont donc été basées uniquement sur les 1016 fèces dont l'hôte a été identifié par biologie moléculaire et sont traitées dans l'**article 3** intitulé :

Bastien M., Vaniscotte A., Combes B., Umhang G., Raton V., Germain E., Villena I., Aubert D., Boué F. and M-L. Poulle. Fox, cat and dog faeces deposit in kitchen gardens: drivers and patterns of contamination in some rural hot spots of food borne zoonosis transmission. En preparation.

Tableau III.A.1 : Matrice de concordance entre l'identification de l'hôte des fèces réalisée sur le terrain sur la base de la morphologie de l'excrément et l'identification réalisée par biologie moléculaire. Les cases grises représentent la bonne concordance entre les deux techniques d'identification de l'hôte.

		Hôte identifié par biologie moléculaire			
		Renard	Chien	Chat	Total
Hôte identifié selon les critères morphologiques	Renard	158	9	65	232
	Chien	10	60	48	118
	Chat	55	15	368	438
	Indéterminé	96	16	116	228
	Total	319	100	597	1016

Cette étude a permis de montrer que la densité de fèces de renard collectées dans les potagers clôturés était significativement plus faible que celles collectées dans les potagers non clôturés. Parmi les potagers non clôturés, 53% contenaient au moins une crotte de renard et la modélisation de nos données nous a permis de montrer que la présence d'un verger et celle d'*A. terrestris* étaient deux facteurs favorisant la présence de fèces de ce carnivore. L'ADN d'*E. multilocularis* et de *Toxocara* spp. a été détecté, respectivement dans 15% et 29% des fèces de ce canidé. Ces résultats permettent d'appuyer l'hypothèse selon laquelle, certains potagers seraient plus à risque que d'autres en termes de dépôt de parasites présents dans les fèces de renard. En revanche, bien qu'au moins une crotte de chat ait été collectée dans presque 2/3 des potagers prospectés, nous n'avons pas pu mettre en évidence de facteurs expliquant ce dépôt. Cette importante utilisation des potagers par les chats pour déféquer serait plutôt due à la préférence de cette espèce pour les sols meubles présents dans ces terrains, pour enterrer leur fèces. Les ADNs d'*E. multilocularis*, de *T. gondii* et de *Toxocara* spp. ont été détectés, respectivement dans 1%, 2,6% et 38% des fèces de chat. Enfin, peu de fèces de chien ont été collectées dans les potagers prospectés (moins de 10% du total) mais la présence du parasite *Toxocara* spp. détecté dans ces fèces appuie l'importance d'empêcher les chiens de fréquenter les potagers pour éviter d'en contaminer le sol.

De manière générale, la quantité de fèces contenant de l'ADN de parasite trouvée dans les potagers était corrélée à la quantité de fèces déposées. Ces résultats soulignent le besoin de définir et de promouvoir des mesures efficaces pour prévenir le dépôt de fèces de carnivores dans les potagers.

B. Article 3: Fox, cat and dog faeces deposit in kitchen gardens: drivers and patterns of contamination in some rural hot spots of food borne zoonosis transmission.

M. Bastien^{1,2,3}, A. Vaniscotte⁴, B. Combes³, G. Umhang⁵, V. Raton³, E. Germain⁶, I. Villena^{1,7}, D. Aubert^{1,7}, F. Boué⁵ and M.-L. Poulle^{1,2}

¹University of Reims Champagne-Ardenne, EA 3800 PROTAL, SFR Cap Santé, 51092 Reims cedex, France

²University of Reims Champagne-Ardenne, CERFE, 08240 Boult-aux-Bois, France

³French establishment for fighting zoonoses (ELIZ), Domaine de Pixérécourt, 54220 Malzéville, France

⁴EcoDataDesign, France

⁵ANSES, Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife, National Reference Laboratory for *Echinococcus* spp., Wildlife Eco-epidemiology and Surveillance Unit, 54220 Malzéville, France

⁶CROC, Research and observation center on carnivores, 57590 Lucy, France

⁷ University Hospital of Reims, Department of Parasitology-Mycolology, National Reference Center on *Toxoplasma*, 51092 Reims cedex, France

Corresponding author: M. Bastien, bastien.matth@gmail.com

En Préparation

Abstract:

As potential hosts, red fox (*Vulpes vulpes*), domestic dogs (*Canis familiaris*) and domestic cats (*Felis catus*) can contaminated their environment with *Echinococcus multilocularis*, *Toxocara* spp., and *Toxoplasma gondii*. These parasites are responsible for food-borne zoonoses of major concern in Europe. Because humans can become infected by accidental swallowing of the infective eggs or oocysts ending-up on fruit or vegetables, this study aimed to identify environmental factors explaining the presence of red fox, dog and cat faeces in kitchen gardens. During winters 2014 to 2016, we sampled carnivore faeces in 192 kitchen gardens located in two regions of northeastern France. Molecular analyses on faeces materials were used to identify carnivore species and to detect parasite DNA. The size of kitchen gardens, their accessibility, the presence of food resource in their close proximity and the composition of the surrounding landscape were used as explanatory variables of faeces distribution. Among 1016 faeces collected, at least one carnivore scat was collected in 77% of the gardens. *Echinococcus multilocularis* DNA was detected in 15% and 1.2% of fox and cat faeces. *Toxocara* spp. DNA was detected in 17.6%, 38.4% and 11% of fox, cat and dog faeces and *T. gondii* DNA was detected in 2.6% of cat faeces. Fox faeces density was significantly lower within enclosed kitchen gardens (1.5 ± 0.8 faeces/ha) than in open and partially open ones (12 ± 2 faeces/ha and 14 ± 2.5 faeces/ha). The presence of fox faeces within the easy-to-access kitchen gardens was explained by the availability of two food resources for foxes: fruits and *Arvicola terrestris* (one of the main red fox prey in the region). Cat and dog faeces densities did not differ according to the kitchen garden accessibility and only the presence of loose soil could explain the presence of cat faeces in kitchen gardens. On a general way, the finding of faeces carrying foodborne parasites was correlated to the total number of faeces found per kitchen gardens.

Key-words: food-borne agents, environmental contamination, carnivore faeces, *Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii*, *Toxocara* spp.

Introduction

Most of the parasites responsible for foodborne diseases involve the environment as a contaminant reservoir for humans (Newel *et al.* 2010). Humans become infected through food, water or soil contaminated with the infectious stage of the parasite often released into the environment with animal faeces (Dorny *et al.* 2009). Faeces of canids and felids can notably carry foodborne parasites with a complex life-cycle that involves the predation as a transmission way between the intermediate hosts (prey species) and the definitive hosts (predator species). Among canids, the red fox (*Vulpes vulpes*) is the main definitive host of *Echinococcus multilocularis* in Europe (Eckert and Deplazes, 2004) but the domestic dog (*Canis familiaris*) can also act as definitive host for this parasite (Deplazes *et al.*, 2004, Umhang *et al.* 2012, Umhang *et al.* 2014). Felids, and particularly the domestic cat (*Felis catus*), can spread *Toxoplasma gondii* oocysts in their environment (Hill and Dubey, 2002), while foxes, dogs and cats can release *Toxocara* spp. eggs (Deplazes *et al.* 2011, Franssen *et al.* 2014). Domestic cats can also act as definitive host for *E. multilocularis* but their contribution to the environmental contamination by this parasite is controversial (Umhang *et al.* 2015, Knapp *et al.* 2016a)

The distribution of *E. multilocularis*, *Toxocara* spp. and *T. gondii* in their definitive host population is known to be highly heterogeneous. Indeed, we know from studies conducted in France and Switzerland that less than 10% of foxes could carry more than 70% of the *E. multilocularis* biomass (Raoul *et al.* 2001, Fischer *et al.* 2005, Guislain *et al.* 2008), while in the city of Bristol (U.K.) dogs less than 12 weeks of age dominate total *Toxocara* spp. output (Morgan *et al.* 2013). Furthermore, whatever the cat population considered, only a few individuals may be shedding *T. gondii* oocysts at any given time but they may produce millions of oocysts (Dubey 2004).

Echinococcus multilocularis, *T. gondii*, and *Toxocara* spp. are of great concern in Europe since they are ranking third, fourth and twentieth of the multicriteria-based ranking for risk management of foodborne parasites (Robertson *et al.*, 2013). *Echinococcus multilocularis* is responsible for human alveolar echinococcosis (AE), a rare but life-threatening disease considered as one of the most dangerous helminthic zoonosis in the northern hemisphere (Eckert *et al.*, 2011). *Toxoplasma gondii* is responsible for toxoplasmosis, a zoonosis that is generally asymptomatic in healthy humans but that can cause serious illness in immunocompromised individuals or when acquired congenitally (Hill and Dubey, 2002; Robert-Gangneux *et al.*, 2015). *Toxocara* spp. are responsible for toxocariasis, a generally asymptomatic zoonosis but that can occasionally lead to two main clinical syndromes in humans: ocular larva migrans and visceral larva migrans (Overgaauw and van Knapen, 2013).

The consumption of unwashed raw fruits and vegetable has been identified as a transmission risk for human AE (Kern *et al.*, 2004; Piarroux *et al.*, 2013), toxocariasis (Gyang *et al.*, 2015; Fallah *et al.*, 2016) and toxoplasmosis (Liu *et al.*, 2009; Alvarado-Esquivel *et al.*, 2011). *Echinococcus multilocularis* DNA, *T. gondii* DNA and *Toxocara* spp. eggs have been detected in environmental fruits and vegetable (Lass *et al.*, 2012, 2015, 2016, Klapčević and Borecka 2012), and a recent study emphasized the role of faeces deposit by cats, foxes and dogs in some kitchen gardens in the pre-harvested contamination of these

fresh products (Poulle *et al.* submitted). However, in order to guide preventive measure against the pre-harvested contamination of fruits and vegetable with foodborne parasites, the factors explaining host faecal deposit in kitchen gardens require investigations.

The present study aimed to identify the factors that could explain the deposit of faeces by dogs, cats and foxes in kitchen gardens of north-eastern France and to gather information about the spatial and temporal pattern of this deposit in relation with the faeces contamination with food-borne parasite and the different host species. While we particularly focus on fox species deposit and *E. multilocularis* prevalence, considered as responsible for the most threatening zoonosis transmission in the study area, we hope to provide information that might be useful to guide preventive measures of kitchen gardens contamination in other areas where carnivore faeces can be a source of human contamination with foodborne parasites.

2. Material and Methods

2.1. Study area

The study was conducted in two regions of north-eastern France (Figure III.B.1a): the French Ardennes (49° 25' N, 4° 50' E) and the Moselle (48° 49' N, 6° 30' E). The French Ardennes area is wooded (oaks *Quercus* spp., beeches *Fagus sylvatica*, hornbeams *Carpinus betulus* and spruces *Picea abies*), with cultivated fields and pastures and a low human population density (around 16 inhabitants/km²) spread out in small villages, most of them having less than two hundred inhabitants. The Moselle region alternates wooded areas, like in the Ardennes, and more industrialized areas with higher human density (around 170 inhabitants/km²) spread out in villages having generally around one thousand inhabitants. *Echinococcus multilocularis* prevalence in the vulpine population is about 40% in Ardennes as well as in Moselle (Combes *et al.*, 2012). The Ardennes and Moselle study areas are among those with the higher AE incidence in France (Piarroux *et al.*, 2015).

2.2. Sampling design

Ten villages were selected in each region such that: i) their distribution range covers the entire study area and ii) we had a personal contact in the village in order to introduce us to local gardeners given that 'having confidence in the field researcher' was a prerequisite to obtain the authorization to sample privately owned kitchen gardens. In each of the 20 initially selected villages (Figure III.B.1b), a 5-km buffer was defined from the village center that potentially includes other villages. Four to thirteen kitchen gardens were then randomly chosen per buffer (Figure III.B.1c), depending on the size of the 'trust network' of our contacts in the village, such that a total of 192 private kitchen gardens were sampled in 38 villages. The size of each kitchen garden was accurately measured with a linear meter: out of the 192 kitchen gardens, 185 were relatively small plots (mean 207.3 ± 14.0 m², min= 4 m², max= 1276 m²) devoted to household consumption and seven were larger cultivated plots (mean= 7 550.2 ± 2

275.2 m², min= 512.5 m², max=20 553 m²) devoted to market gardening. Both are latter called 'kitchen gardens'.

From January 2014 to December 2015, a visual scan was performed by walking the whole surface of the 192 kitchen gardens to detect and collect carnivore faeces. These samplings were conducted every six weeks during the autumn-winter period (October to March), *i.e.* out of the gardening period to avoid damaging the seedlings, for a total of eight sampling scans per kitchen gardens during the 2014-2015's period. In Moselle, the January 2015 session was replaced by a January 2016 session because the snow cover prevented us to find any scat. All collected faeces were decontaminated seven days at -80°C and stored at -20°C before analysis.

2.3. Identification of the faeces emitter and detection of parasite DNA

A quantity of 0.5 g of each copro-sample was submitted to DNA extraction using the QIAamp Fast DNA Stool Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) following manufacturer recommendations. The carnivore species (fox, cat, dog) was then identified using a multiplex real-time PCR assay following Knapp *et al.* (2016b). The detection of DNA from both *E. multilocularis* and *Toxocara* spp. was undertaken by real-time PCR (qPCR) as previously described (Knapp *et al.*, 2014; Knapp *et al.* 2016b). Nevertheless, the two qPCR reactions were performed as one multiplex reaction also including detection of an internal control plasmid previously used (Umhang *et al.* 2015). The qPCR reactions were performed in duplicate in a final volume of 25µl and run on a RotorGene thermocycler (Qiagen). All *E. multilocularis*-positive copro-samples obtained by real-time PCR were confirmed by sequencing the PCR products of a second real-time PCR, performed on the same gene, as proposed by Knapp *et al.* (2016b). The detection of DNA from *Toxoplasma gondii* was undertaken on a sub-sample of 763 faeces from the 4 first sampling sessions by real-time PCR as previously described (Pouille *et al.*, submitted).

2.4. Characterization of kitchen gardens

Kitchen gardens were characterized using some of their attributes which could *a priori* explain their use by carnivore species and occurrences of faeces. We discriminated three main groups of attributes: landscape at the village scale, accessibility and direct or indirect food resources.

Landscape at the village scale landscape - The landscape composition, *i.e.* regarding forest, arable land, hedges, grassland and building covers landscape classes was estimated in the 5-km buffers for the sampled villages using data from BD TOPO database (IGN, France) with QGIS version 1.8.0 (QGIS Development Team, 2012). Villages were then grouped according to their landscape composition (see VILLAGE CLUSTER variable in the 2.5.1 section).

Accessibility - The accessibility of kitchen gardens for foxes and dogs was estimated by classifying gardens as 'open' (no fence around it), 'enclosed' (with a continuous fence at least 1.2 m high), or 'partially open' (with a non-continuous fencing) (ACCESSIBILITY variable).

Resources - The occurrence of potential direct attractions such as food resources for foxes in less than 100 m of the kitchen garden was also systematically noted: presence/absence of poultry (POULTRY variable) and compost heap (COMPOST variable) that could be food resources; and number of fruit tree (FRUIT TREE variable) as a proxy of the quantity of fruits fall in the ground that could be a food resource for foxes (Silva *et al.* 2005). In addition, as meadow vole and fossorial vole populations are submitted to annual and inter-annual fluctuations (Giraudoux *et al.* 1997, Delattre *et al.* 1999), the index of presence of these species was noted at each prospecting session. Fresh burrow entries and fresh earth tumuli were respectively considered as index of the presence of *Microtus* spp. (MICROTUS variable) and *Arvicola* sp. (ARVICOLA variable) (Giraudoux *et al.* 1995). Additionally, the presence/absence of indirect resource variables such as habitats favourable to the meadow voles *Microtus* sp. and the fossorial vole *Arvicola terrestris shermann* which are the main fox prey in the study area (Guislain *et al.* 2008): pasture (PASTURE variable), meadow (MEADOW variable), forest edge (FOREST variable) or arable land (ARABLE LAND variable), were considered in the vicinity of the kitchen garden (100m). Additionally, we registered the presence/absence of dairy farm (FARM variable) that could be responsible for the presence of foxes (Sidorovich 2013) and free-ranging cats (Barrat 1997). Indirect resource variables were later called ‘Habitat variables’.

2.5. Statistical analyses

2.5.1 Village clustering

A hierarchical clustering of a Principal Components Analysis (PCA) was performed to group villages in relation with their land cover characteristics (see Lê *et al.* 2008 for the procedure and section 2.4 for the estimation of landscape composition). The PCA of the land cover variables was performed using the FactoMineR package (Husson *et al.* 2016). Covariates that explained the variability of village land cover were identified by estimating their contributions on the main reduced dimensions of the analysis. The most homogeneous land cover groups were determined by a statistical test (“v.test”) on the difference between the mean per cluster and the overall mean for each variable which describe the contribution of each variable for each cluster. The groups obtained following this hierarchical clustering were used in further analyses (VILLAGE CLUSTER variable).

2.5.2 Factors analysis of faeces deposit

In a preliminary step, the mean densities (per m²) over sampling session of fox, cat and dog faeces were compared between the different type of kitchen garden fence, i.e. enclosed, partially open and open kitchen gardens using a Wilcoxon, Kruskal and Wallis rank sum test. Regarding that the dog faeces density was very low whatever the type of kitchen garden fence the analysis was realized only for fox and cat faeces.

The effect of kitchen garden accessibility and food resource availability on the number of fox faeces (FOX FAECES variable) and cat faeces (CAT FAECES variable) found per kitchen garden and per session was tested using a Generalized Linear Mixed effects Model (GLMM). FOX FAECES and CAT

FAECES variables were found to be over-dispersed and were therefore modelled as negative binomial distributed dependent variables. The log-transformed value of the size of kitchen gardens (SIZE variable) was incorporated as an offset variable in the models since it differs between sampling units. Because FOX FAECES, CAT FAECES, ARVICOLA and MICROTUS variables were measured repeatedly in time, a random effect on the kitchen gardens was added into the model to take into account the within-garden correlation among observations, and the effects of the year (YEAR) and months (MONTH) of the sampling were added as fixed effects. The “VILLAGE” variable was also incorporated as a random effect since the number of villages was too large ($N = 38$) to incorporate it as a covariate. Regarding the small number of replicates per group for both random factors, only a random intercept (and not a random slope term) was considered. Accessibility, Resources and Habitat variables were also added as explanatory variables. Because small mammal and fox faeces spatial distribution are known to rely on landscape structure and composition (Giraudoux *et al.* 2002, Guislain *et al.* 2007), we also incorporated into the model the VILLAGE CLUSTER variable as a surrogate of the main landscape types found in the sampling area. Model fit was evaluated by estimating the over-dispersion parameter and distribution of model residuals against fitted values.

In order to reduce confusing effects due to partial correspondences between covariates, to simplify variable selection procedure, and in accordance with our *a priori* hypothesis on the environmental factor effects, sub-models corresponding to the combination of the different groups of covariates (Resources and Habitat variables) were fitted and compared using AIC estimates to select an approximate best variable combination (Burnham and Anderson, 2004). The explanatory power of each covariate was then evaluated by estimating the loss of explained deviance induced by dropping each covariate from the models: AIC of the models including *versus* excluding each covariate were compared. The significant effect of random intercept was tested using likelihood ratio test to discriminate between ‘models that excluded’ and ‘models that included’ the random variables. Finally, the presence of spatial autocorrelation in model residuals that could have not been explained by the model was investigated.

2.5.3 Spatial and temporal pattern of faecal prevalence

The correlation between the density (per m^2) of faeces that yielded positive qPCR result for at least one parasite and the density of total number of collected faeces was assessed using a Spearman correlation test. Then, the faecal prevalence (ratio of the total number of contaminated faeces by at least one parasite over the total number of faeces collected) was estimated for each kitchen garden and the resulting prevalence were compared pairwise among host species using Dunn’s *post hoc* tests. The relationship between the faeces prevalence in kitchen gardens where at least one scat was collected and the number of host species identified from faeces collection in these gardens was assessed using Chi-square tests or Fisher exact tests.

The presence of spatial autocorrelation in the distribution of fox faeces and cat faeces positive for *E.*

multilocularis or *Toxocara* spp. was assessed within the whole sampling area under the assumption that the distance between kitchen gardens affects their probability to be contaminated by the same infected host individual. The occurrence of contaminated faeces was modelled as a binomial response of a generalized mixed effect model that includes the kitchen garden as a random effect and no covariates (null model). The residuals of the null model were first plotted as a visualization tool to detect any spatial pattern. Then, the presence of spatial-autocorrelation in model residuals was investigated by drawing an experimental semi-variogram. Auto-correlations were tested using the Moran I index at pre-defined time lag. We focused our analysis on the within village spatial autocorrelation, i.e. within the distances between kitchen garden lower than 3000 m which corresponds to the maximum distances found between kitchen gardens within the same village over the whole sampling area.

Finally, the amount of faeces deposit per m² every 6 weeks (latter called: ‘turnover of faeces deposit’) was estimated for each host species by taking into account only faeces collected in December, January and March but excluding those collected in October that could have been deposited from more than 6 weeks. The mean numbers of collected faeces per 100m² per 6 weeks and the mean number of positive faeces collected per 100 m² per 6 weeks were compared pairwise among host species using Dunn’s *post hoc* tests.

3. Results

At least one carnivore scat was collected in 148/192 (77%) of the sampled kitchen gardens, for a total amount of 1016 faeces collected. Based on qPCR analysis, 597/1016 (58.7%) of the copro-samples were from cats, 319/1016 (31.3%) were from foxes, and 100/1016 (9.8%) were from dogs. Out of the 192 sampled kitchen gardens, 129 (67.2%) contained at least one cat scat, 87 (45.3%) contained at least one fox scat and 43 (22.4%) contained at least one dog scat (including seven enclosed kitchen gardens used as dog’s pen).

3.1. Village clustering according to the composition of their surrounding landscape

The first two dimensions of the Principal Component Analysis explained 61% of the variability between villages regarding their land-cover covariates (Figure III.B.2a) and thus were used for the clustering. The first dimension (x-axis) allows discriminating villages regarding to their percentage of forest covering (x-axis contribution=38%), arable land covering (x-axis contribution=26%) and building covering (x-axis contribution=21%). The second dimension (y-axis) discriminated villages regarding mainly their percentage of grassland covering (x-axis contribution=60%). The optimal level of division allows classifying the villages in 4 clusters (Figure III.B.2b): Cluster 1 groups together villages surrounded by forests and grassland (respectively $v.test=3.93$ and $v.test=3.53$; $p<0.001$); Cluster 2 groups together villages mainly surrounded by grassland ($v.test=4.67$; $p<0.001$); Cluster 3 groups together villages mainly covered by buildings ($v.test=5.29$; $p<0.001$); and Cluster 4 groups together villages mainly surrounded by arable land ($v.test = 3.21$; $p<0.001$)

3.2. Faeces density distribution

The mean densities of cat faeces and dog faeces did not significantly differ between enclosed kitchen gardens, open kitchen gardens and partially open kitchen gardens (respectively Wilcoxon, Kruskal and Wallis rank sum test, $\chi^2 = 2.91$; $p > 0.05$ and Wilcoxon, Kruskal and Wallis rank sum test, $\chi^2 = 2.11$; $p > 0.05$, Figure III.B.3). By contrast, the mean density of fox faeces significantly differed between enclosed kitchen gardens on one side and open kitchen garden and partially open kitchen garden in another side (Wilcoxon, Kruskal and Wallis rank sum test, $\chi^2 = 63.88$; $p < 0.05$, Figure III.B.3).

Regarding that the fox faeces density was very low in enclosed kitchen gardens and that the cat faeces density was relatively high whatever the kitchen garden, the following analysis was done for fox faeces by taking into account only open and partially open gardens, and for cat faeces by taking into account all the kitchen gardens.

3.4. Factors explaining fox faeces deposit

The most parsimonious predictive model for fox faeces deposit included the effects of Resources and MONTH variables (Table III.B.1). Adding others covariates in the model did not add sufficient explanation of the number of fox faeces found in kitchen gardens to be selected. No over-dispersion was found in model residuals of the resulting full model (ratio=0.71; $\text{Chi}^2=848$; $p=1$). From the backward variable selection, MONTH, ARVICOLA and FRUIT TREES, in order of importance, were selected as explanatory variables (Table III.B.2). Additionally, taken alone, FARM was found to have an explanatory power of FOX FAECES (Table III.B.2). Also, the Village cluster 3 was selected as an explanatory variable (Table III.B.2).

Regarding the regression coefficients, less fox faeces was found in March and October than in December and January (Figure III.B.4a). Also, less fox faeces were found in the kitchen gardens located in the Village cluster 3 compared to the others Village clusters (Figure III.B.4a). On the contrary, FOX FAECES was positively correlated with ARVICOLA and was significantly higher in kitchen gardens with more than ten fruit trees and in kitchen gardens located near a farm than in others (Figure III.B.4a). Adding a random effect on the kitchen garden ("GARDEN" variable) significantly increased the explained variance in comparison to the model with a random effect only on the VILLAGE variable ($\text{Chi}^2 = 86.486$; $\text{df}=1$, $p < 2.2e-16$). The standard deviation of regression estimates between kitchen gardens ($\text{sd}=1.4$) was larger than the effects of the covariates, suggesting a large within-garden correlation in FOX FAECES. The within-village variability was not found to explain a significant part of the observed variability ($\text{Chi}^2 = 0.02$; $\text{df}= 1$, $p=0.8875$).

3.5. Factors explaining cat faeces deposit

No over-dispersion in residuals of the full model explaining CAT FAECES was found (ratio=0.71; $\text{Chi}^2=811$; $p=1$). Regarding sub-models comparison, only MONTH and YEAR were selected as explanatory set of variables (Table III.B.3). The effect of MONTH was the most important: there was

significantly less cat faeces found in March than in other sampling months (Figure III.B.4b). Also, the regression coefficients were significantly negative for 2016 and 2015, with a lower amount of cat faeces found for those years than for 2014 (Figure III.B.4b). Taken alone, the presence of pasture in the vicinity of the kitchen garden had a slight negative effect on cat faeces deposit.

Finally, no spatial autocorrelation in model residuals was found for both cat faeces and fox faeces distribution models. Moran Index was found no significant whatever the distance lag considered.

3.6. Spatial and temporal pattern of faecal prevalence according to host species.

Out of 1016 faeces collected and identified, 338 were tested positive for at least one parasite. *Echinococcus multilocularis* DNA was detected in 5.4% of the faeces and in 15% of the fox faeces; *Toxocara* spp. DNA was detected in 29.1% of faeces and in 38.4% of cat faeces and *T. gondii* was detected in 2.6% of cat faeces tested. Sixteen fox faeces and six cat faeces were tested positive for the presence of both *E. multilocularis* and *Toxocara* spp. DNA and four cat faeces were tested positive for the presence of both *Toxocara* spp. DNA and *T. gondii* DNA.

The density of positive faeces increased with the density of faeces found (Spearman correlation test, $R=0.62$, $p<0.0001$). On average, $33 \pm 3\%$ of the faeces were positive in the kitchen gardens where at least one positive stool was found (Table III.B.5). The occurrence of positive faeces didn't differ between the fox faeces sample ($31 \pm 4\%$) and the cat faeces sample ($36 \pm 3\%$) (Dunn's *Post hoc* test: $p=0.197$) but was lower in the dog faeces sample ($16 \pm 5\%$) than in the fox faeces sample (Dunn's *Post hoc* test: $p=0.009$) and in the cat faeces sample (Dunn's *Post hoc* test: $p=0.0002$).

Spatial pattern of faecal prevalence - The probability to find a positive stool is two-fold higher in kitchen gardens where faeces from at least two carnivore species were found than in kitchen gardens where faeces from only one carnivore species were found (Table III.B.5, $\text{Chi}^2 = 9.19$, $p=0.002$). As expected, the probability to find a stool positive for *E. multilocularis* DNA was higher in kitchen gardens where at least one fox stool was found than in gardens where only cat faeces and dog faeces were found (Table III.B.5, $\text{Chi}^2 = 17.8$, $p=0.0001$). In the same way, the probability to find a positive stool for *Toxocara* spp. was higher in kitchen gardens where at least one fox stool was found than in others (Table III.B.5, $\text{Chi}^2 = 6.11$, $p=0.01$) and was higher in kitchen gardens where at least one cat stool was found than in those without cat stool (Table III.B.5, $\text{Chi}^2 = 6.17$, $p=0.01$). Conversely, the finding of cat faeces or dog faeces did not influence the probability to find a positive stool for *E. multilocularis* (respectively: Fisher test, $\text{OR}=1.47$, $p=0.76$ and $\text{chi}^2=0.05$, $p=0.83$) and the finding of at least one dog stool did not influence the probability to find a positive stool for *Toxocara* spp. ($\text{chi}^2=0.02$, $p=0.88$).

The contaminated faeces with *E. multilocularis* DNA appeared to be clustered in the south-eastern part of both the Ardennes and the Moselle study areas (Figure III.B.5). Also, the semi-variogram showed an increasing semi-variance until 1000 m (Figure III.B.6). The spatial autocorrelation of positive faeces for *E. multilocularis* was found significant for distances until 500 m (Figure III.B.6, top panel). The

spatial distribution of positive faeces for *Toxocara* spp was also found autocorrelated for the smallest distance lag (Figure III.B.6, bottom panel).

Temporal pattern - The mean turnover of cat faeces was significantly higher than the mean turnover of fox and dog faeces (Figure III.B.7, respectively: Dunn's *Post hoc* test: $p=0.03$ and Dunn's *Post hoc* test: $p=0.05$): there were more cat faeces deposited between two sampling session than fox and dog faeces. By contrast, the mean turnover of positive cat faeces didn't significantly differ from the mean turnover of positive fox faeces (Figure III.B.7, Dunn's *Post hoc* test: $p=0.41$), whereas it significantly differs from the mean turnover of positive dog faeces (Figure III.B.7, respectively: Dunn's *Post hoc* test: $p=0.003$).

4. Discussion

Our study first emphasizes that a large part of kitchen garden might be spots of faecal deposition by foxes, cats and/or dogs. Indeed, the carnivore faeces appeared largely - even heterogeneously - distributed in kitchen gardens since at least one carnivore scat was found in 77% of the 192 kitchen gardens prospected. More than half of the 1016 collected faeces were from cats, but 1/3 were from red foxes *i.e.* potentially a source of human contamination with *E. multilocularis*. Moreover, our study provides for the very first time detailed information about the factors responsible for the heterogeneous distribution of fox, cat and dog faeces with *E. multilocularis*, *Toxocara* spp. and/or *T. gondii* in kitchen gardens.

We first showed that a fence from at least 1.2 m high considerably reduces the fox faeces deposit in kitchen gardens. Such fencing should thus be strongly promoted in AE endemic areas. The very few fox faeces found in some fenced kitchen gardens suggests however that fences must be regularly inspected to fix up eventual holes allowing fox entrance, and that kitchen garden door must be closed all the time and all around the year. Among the non-fenced kitchen gardens, 53% contained at least one fox scat suggesting a potentially large distribution of the contamination of these non-fenced kitchen gardens with *E. multilocularis*. Fox faeces deposit was lower in kitchen gardens located in villages mainly covered by buildings than in kitchen gardens located in villages mainly surrounded by forests, grassland or arable land, confirming that villages surrounded with plenty of cover or dense vegetation offering safe resting sites near the settlements are the most used by red foxes (Janko *et al.*2012). Additionally, our study unveiled that the vicinity of a farm might also influence the presence of fox faeces in kitchen gardens. The use of barns as resting and breeding sites by red foxes (Sidorovich 2013) could explain this result.

Another main result of this study is that red fox faeces deposit within unfenced kitchen garden appeared to directly depend on the availability of two food resources for red foxes: *Arvicola terrestris* and fruits fall in the ground. This result confirms that the distribution of resources in the environment is one of the main factors driving the red fox faeces spatial distribution (Raoul *et al.*, 2015). Despite the fact that *Microtus sp.* is known to be the main prey species of the red fox in the study area (Guislain *et*

al. 2008), its presence didn't explain the fox faeces deposit inside unfenced kitchen garden. A lower availability of *Microtus sp.* compared to *Arvicola* during the study period could explain this result, the red fox predation on *Arvicola sp.* being dependent on the density of *Microtus arvalis* (Raoul *et al.* 2010). Finally, the probability to find a fox scat was higher in kitchen garden where one fox scat was previously found than in kitchen gardens where no fox scat was found, suggesting that kitchen gardens where fox faeces were found are regularly frequented by foxes all along the winter. One can therefore assume that kitchen gardens close to each other could be visited by the same parasitized individual and, consequently, would be largely and regularly contaminated by fox faeces. The spatial autocorrelation of faeces positive for *E. multilocularis* tends to confirm this hypothesis and warn against the possibility that some kitchen gardens might be at high-risk of human contamination with this parasite.

By contrast with results concerning fox faeces, the resource availability was not found to be an explanatory factor of the cat faeces deposit in kitchen gardens. The only reason the cats come to kitchen gardens is probably to defecate, as observed when they come to sandpits (Uga *et al.* 1996). Cats generally bury their faeces when they are in their main living area (Turner 2000). Due to this covering behaviour, the detection of cat faeces could have been lower than the detection of fox and dog faeces. The resulting underestimation of cat faeces was probably low for the October to February sessions because the soil was generally too frozen to be dig, but was probably higher in March sessions when the soil was thawed explaining why less cat faeces were found during these sessions. Despite this probable underestimation, cat faeces accounted for more than half of the faecal sample and at least one cat scat was found in almost 2/3 of the prospected kitchen gardens. The high occurrence of cat faeces and their large distribution within kitchen gardens most probably result from both the cat attraction toward loose soil suitable to cover faeces and their ability to pass through fences or to climb over them. New faeces had often been found in kitchen gardens from one sampling session to another attesting for their frequent use as defecation place for cats, that finding could be of a concern regarding the high occurrence of *Toxocara spp.* in these faeces. By contrast, dog faeces accounted for less than 10% of the collected faeces and were found in only 22% of the kitchen gardens prospected. However, the detection of *Toxocara spp.* DNA in 11% of the collected dog faeces incites to ban dogs from going through the kitchen garden and to aware dog owners to the zoonotic risk linked to the use of their enclosed kitchen gardens as dog pen.

On a general way, the finding of faeces carrying foodborne parasites was correlated to the total number of faeces found per kitchen gardens and the probability to find a positive stool was two-fold higher in kitchen gardens visited by at least two carnivore species than in kitchen gardens visited by only one. These results provide tangible arguments to promote preventive measure of carnivore faecal deposition in kitchen gardens whatever the species. When possible, a continuous fencing of kitchen gardens should be encouraged (and may be financially supported) to avoid fox and dog entrance. In the same way, efforts should be taken to repulse cats when seen trying to defecate in the kitchen gardens. When fencing is not possible; a vole population control inside the kitchen gardens should be strongly

recommended all the more if the kitchen garden is in village surrounded by forest and grassland and/or located near an orchard or a farm identified as attractive factors for foxes.

References

- Alvarado-Esquivel, C., Estrada-Martínez, S., Liesenfeld, O., 2011. *Toxoplasma gondii* infection in workers occupationally exposed to unwashed raw fruits and vegetable: a case control seroprevalence study. *Parasite and Vectors* 4, 235.
- Azam, D., Ukpai, O.M., Said, A., Abd-Allah, G.A., Morgan, E.R., 2012. Temperature and the development and survival of infective *Toxocara canis* larvae. *Parasitology research* 110, 649–656.
- Błaszowska, J., Góralaska, K., Wójcik, A., Kurnatowski, P., Szwabe, K., 2015. Presence of *Toxocara* spp. eggs in children's recreation areas with varying degrees of access for animals. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 22, 23–27.
- Burnham, K.P., 2004. Multimodel Inference: Understanding AIC and BIC in Model Selection. *Sociological Methods & Research* 33, 261–304.
- Combes, B., Comte, S., Raton, V., Raoul, F., Boué, F., Umhang, G., Favier, S., Dunoyer, C., Woronoff, N., Giraudoux, P., 2012. Westward Spread of *Echinococcus multilocularis* in Foxes, France, 2005–2010. *Emerging Infectious Diseases* 18, 2059–2062.
- Delattre, P., B. De Sousa, E. Fichet-Calvet, J. P. Quéré, Giraudoux, P, 1999. Vole Outbreaks in a Landscape Context: Evidence from a Six Year Study of *Microtus Arvalis*. *Landscape Ecology* 14, 401–412.
- Deplazes, P., Hegglin, D., Gloor, S., Romig, T., 2004. Wilderness in the city: the urbanization of *Echinococcus multilocularis*. *Trends in Parasitology* 20, 77–84.
- Despommier, D., 2003. Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 265–272.
- Dorny, P., Praet, N., Deckers, N., Gabriel, S., 2009. Emerging food-borne parasites. *Veterinary Parasitology* 163, 196–206.
- Eckert, J., Deplazes, P., 2004. Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern. *Clinical Microbiology Reviews* 17, 107–135.
- Eckert, J., Deplazes, P., Kern, P., 2011. Alveolar echinococcosis (*Echinococcus multilocularis*) and neotropical forms of Echinococcosis (*Echinococcus vogeli* and *Echinococcus oligarthrus*), in: *Oxford Textbook of Zoonoses Biology, Clinical Practice, and Public Health Control*. pp. 669–699.
- Fallah, A.A., Makhtumi, Y., Pirali-Kheirabadi, K., 2016. Seasonal study of parasitic contamination in fresh salad vegetables marketed in Shahrekord, Iran. *Food Control* 60, 538–542.

- Giraudoux, P., Delattre, P., Takahashi, K., Raoul, F., Quéré, J.P., Craig, P., Vuitton, D., Pawlowski, Z., 2002. Transmission ecology of *Echinococcus multilocularis* in wildlife: what can be learned from comparative studies and multiscale approaches? in: Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on Cestode Zoonoses: Echinococcosis and Cysticercosis: An Emergent and Global Problem, Poznan, Poland, 10-13 September 2000. IOS Press, pp. 251–266.
- Giraudoux, P., Pradier, B., Delattre, P., Deblay, S., Salvi, D., Defaut, R., 1995. Estimation of water vole abundance by using surface indices. *Acta theriologica* 40, 77–96.
- Giraudoux, P., Delattre, P., Habert, M., Quéré, J.P., Deblay, S., Defaut, R., Duhamel, R., Moissenet, M.F., Salvi, D., Truchetet, D., 1997. Population dynamics of fossorial water vole (*Arvicola terrestris scherman*): a land use and landscape perspective. *Agriculture, ecosystems & environment* 66, 47–60.
- Goszczyński, J., 1990. Scent marking by red foxes in Central Poland during the winter season. *Acta Theriologica* 35, 7–16.
- Guislain, M.-H., Raoul, F., Giraudoux, P., Terrier, M.-E., Froment, G., Ferte, H., Poulle, M.-L., 2008. Ecological and biological factors involved in the transmission of *Echinococcus multilocularis* in the French Ardennes. *Journal of Helminthology* 143–151.
- Gyang, P.V., Akinwale, O.P., Lee, Y.-L., Chuang, T.-W., Orok, A.B., Ajibaye, O., Liao, C.-W., Chen, P.-C., Chou, C.-M., Huang, Y.-C., Barghouth, U., Fan, C.-K., 2015. Seroprevalence, disease awareness, and risk factors for *Toxocara canis* infection among primary schoolchildren in Makoko, an urban slum community in Nigeria. *Acta Tropica* 146, 135–140.
- Hill, D., Dubey, J.P., 2002. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical microbiology and infection* 8, 634–640.
- Husson, F., Josse, J., Le, S., Mazet, J., Husson, M.F., 2016. Package “FactoMineR.” Obtenido de Multivariate Exploratory Data Analysis and Data Mining: <http://cran.r-project.org/web/packages/FactoMineR/FactoMineR.pdf>.
- Janko, C., Schröder, W., Linke, S., König, A., 2012. Space use and resting site selection of red foxes (*Vulpes vulpes*) living near villages and small towns in Southern Germany. *Acta Theriologica* 57, 245–250.
- Kapel, C.M.O., Torgerson, P.R., Thompson, R.C.A., Deplazes, P., 2006. Reproductive potential of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes, dogs, raccoon dogs and cats. *International Journal for Parasitology* 36, 79–86.
- Kern, P., Ammon, A., Kron, M., Sinn, G., Sander, S., Petersen, L.R., Gaus, W., Kern, P., 2004. Risk factors for alveolar echinococcosis in humans. *Emerging infectious diseases* 12.

- Klapec, T., Borecka, A., 2012. Contamination of vegetables, fruits and soil with geohelminths eggs on organic farms in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 19.
- Knapp, J., Combes, B., Umhang, G., Aknouche, S., Millon, L., 2016a. Could the domestic cat play a significant role in the transmission of *Echinococcus multilocularis*? A study based on qPCR analysis of cat feces in a rural area in France. *Parasite* 23, 42.
- Knapp, J., Umhang, G., Poulle, M.-L., Millon, L., 2016b. Development of a Real-Time PCR for a Sensitive One-Step Coprodiagnosis Allowing both the Identification of Carnivore Feces and the Detection of *Toxocara* spp. and *Echinococcus multilocularis*. *Applied and Environmental Microbiology* 82, 2950–2958.
- Lass, A., Pietkiewicz, H., Szostakowska, B., Myjak, P., 2012. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 31, 1101–1108.
- Lass, A., Szostakowska, B., Myjak, P., Korzeniewski, K., 2015. The first detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in environmental fruit, vegetable, and mushroom samples using nested PCR. *Parasitology Research* 114, 4023–4029.
- Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *Journal of statistical software* 25, 1–18.
- Lélu, M., Villena, I., Darde, M.-L., Aubert, D., Geers, R., Dupuis, E., Marnef, F., Poulle, M.-L., Gotteland, C., Dumetre, A., Gilot-Fromont, E., 2012. Quantitative Estimation of the Viability of *Toxoplasma gondii* Oocysts in Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 5127–5132.
- Liu, Q., Wei, F., Gao, S., Jiang, L., Lian, H., Yuan, B., Yuan, Z., Xia, Z., Liu, B., Xu, X., Zhu, X.-Q., 2009. *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in China. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103, 162–166.
- Magnaval, J.-F., Glickman, L.T., Dorchie, P., Morassin, B., 2001. Highlights of human toxocariasis. *The Korean Journal of Parasitology* 39, 1.
- Muñoz-Zanzi, C.A., Fry, P., Lesina, B., Hill, D., 2010. *Toxoplasma gondii* Oocyst-specific Antibodies and Source of Infection. *Emerging Infectious Diseases* 16, 1591–1593.
- Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., der Giessen, J. van, Kruse, H., 2010. Food-borne diseases — The challenges of 20years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology* 139, S3–S15.
- Piarroux, M., Gaudart, J., Bresson-Hadni, S., Bardonnnet, K., Faucher, B., Grenouillet, F., Knapp, J., Dumortier, J., Watelet, J., Gerard, A., others, 2015. Landscape and climatic characteristics

- associated with human alveolar echinococcosis in France, 1982 to 2007. Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin 20.
- Piarroux, M., Piarroux, R., Knapp, J., Bardonnnet, K., Dumortier, J., Watelet, J., Gerard, A., Beytout, J., Abergel, A., Bresson-Hadni, S., Gaudart, J., for the FrancEchino Surveillance Network, 2013. Populations at Risk for Alveolar Echinococcosis, France. *Emerging Infectious Diseases* 19, 721–728.
- QGIS Development Team, 2012. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project.
- Raoul, F., Deplazes, P., Rieffel, D., Lambert, J.-C., Giraudoux, P., 2010. Predator dietary response to prey density variation and consequences for cestode transmission. *Oecologia* 164, 129–139.
- Raoul, F., Hegglin, D., Giraudoux, P., 2015. Trophic ecology, behaviour and host population dynamics in *Echinococcus multilocularis* transmission. *Veterinary Parasitology* 213, 162–171.
- Reyes-García, V., Aceituno, L., Vila, S., Calvet-Mir, L., Garnatje, T., Jesch, A., Lastra, J.J., Parada, M., Rigat, M., Vallès, J., Pardo-De-Santayana, M., 2012. Home Gardens in Three Mountain Regions of the Iberian Peninsula: Description, Motivation for Gardening, and Gross Financial Benefits. *Journal of Sustainable Agriculture* 36, 249–270.
- Sidorovich, A., A., 2013. Utilization of natal dens by the red fox (*Vulpes vulpes*) and other burrowing mammals in relation to landscape structure in Belarus. *Proceedings of the National academy of sciences of Belarus* 98–101.
- Silva, S.I., Bozinovic, F., Jaksic, F.M., 2005. Frugivory and seed dispersal by foxes in relation to mammalian prey abundance in a semiarid thornscrub. *Austral Ecology* 30, 739–746.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 30, 1217–1258.
- Turner, D.C., 2000. *The domestic cat: the biology of its behaviour*. Cambridge University Press.
- Uga, S., minami, toshikadzu, nagata, kenji, 1996. Defecation habits of cats and dogs and contamination by *Toxocara* eggs in public park sandpits. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 54, 122–126.
- Umhang, G., Raton, V., Comte, S., Hormaz, V., Boucher, J.-M., Combes, B., Boué, F., 2012. *Echinococcus multilocularis* in dogs from two French endemic areas: No evidence of infection but hazardous deworming practices. *Veterinary Parasitology* 188, 301–305.
- Umhang, G., Comte, S., Raton, V., Hormaz, V., Boucher, J.-M., Favier, S., Combes, B., Boué, F., 2014. *Echinococcus multilocularis* infections in dogs from urban and peri-urban areas in France. *Parasitology research* 113, 2219–2222.

- Umhang, G., Forin-Wiart, M.-A., Hormaz, V., Caillot, C., Boucher, J.-M., Poulle, M.-L., Franck, B., 2015. *Echinococcus multilocularis* detection in the intestines and feces of free-ranging domestic cats (*Felis s. catus*) and European wildcats (*Felis s. silvestris*) from northeastern France. *Veterinary Parasitology* 214, 75–79.
- Veit, P., Bilger, B., Schad, V., Schäfer, J., Frank, W., Lucius, R., 1995. Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasitology* 110, 79–86.
- Villena, I., Aubert, D., Gomis, P., Ferte, H., Inglard, J.-C., Denis-Bisiaux, H., Dondon, J.-M., Pisano, E., Ortis, N., Pinon, J.-M., 2004. Evaluation of a Strategy for *Toxoplasma gondii* Oocyst Detection in Water. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 4035–4039.
- Vuitton, D.A., Demonmerot, F., Knapp, J., Richou, C., Grenouillet, F., Chauchet, A., Vuitton, L., Bresson-Hadni, S., Millon, L., 2015. Clinical epidemiology of human AE in Europe. *Veterinary Parasitology* 213, 110–120.

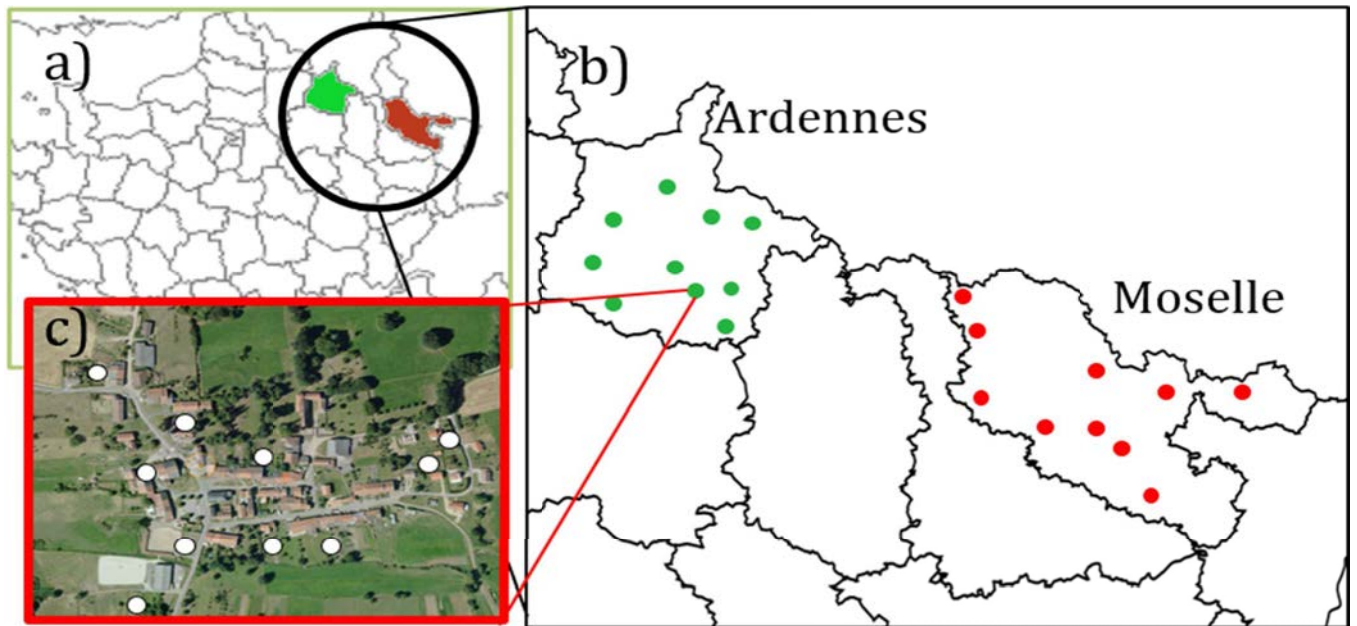


Figure III.B.1: (a) Localization of the two study areas in France. (b). Distribution of the prospected villages. (c) Distribution of the kitchen gardens sampled in one village.

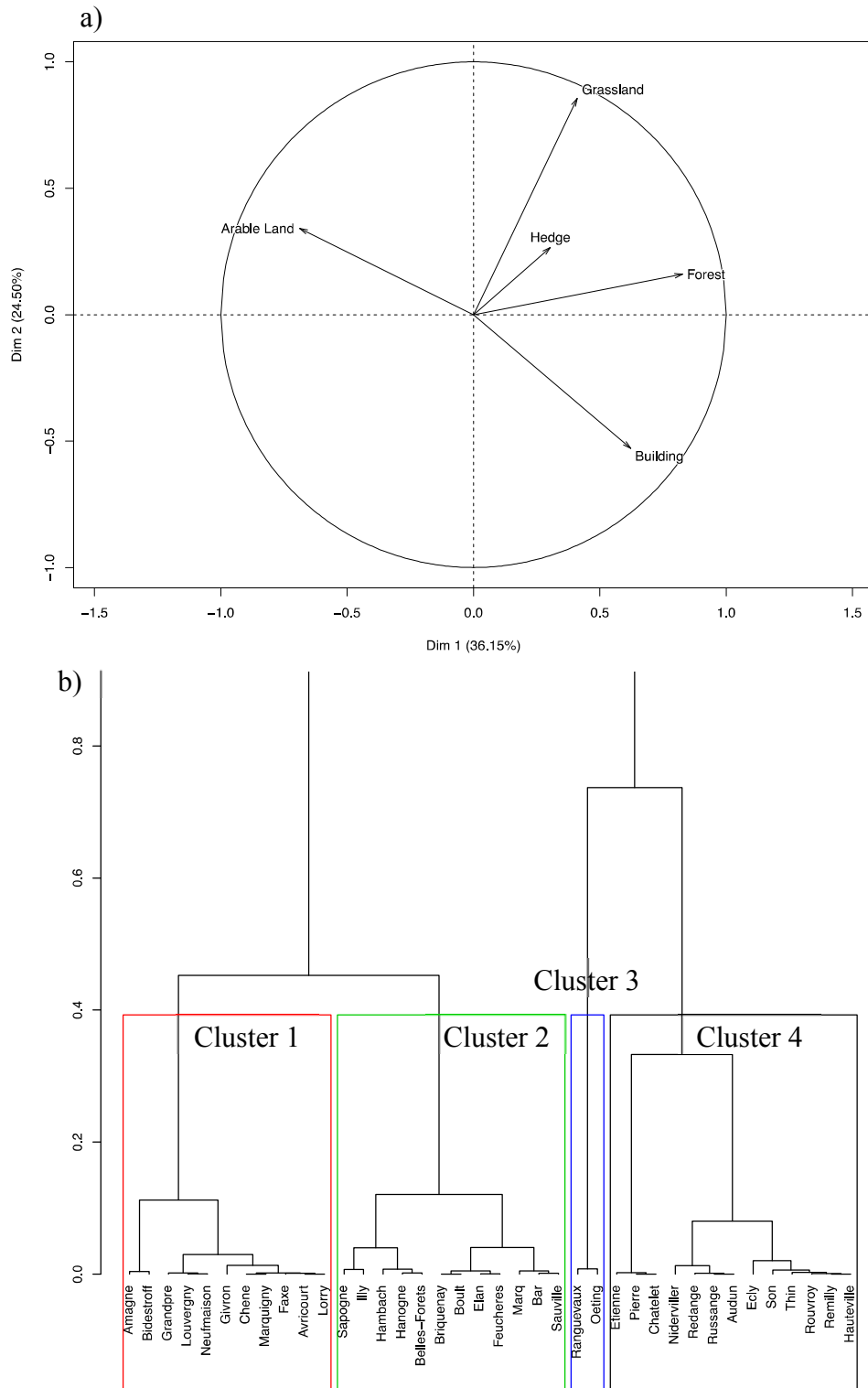


Figure III.B.2: a) Correlation circle of the Principal Components Analysis (PCA) done on landscape variables at the village scale; b) village cluster dendrogram from the hierarchical clustering defined by the main axes of the PCA.

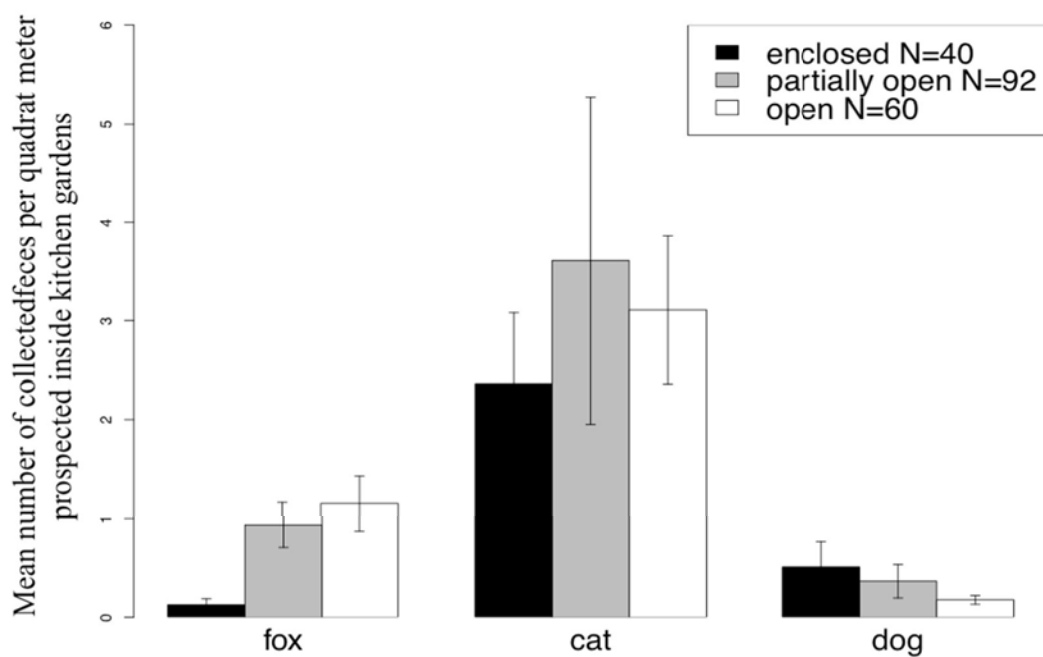


Figure III.B.3: Mean number of fox faeces, cat faeces and dog faeces found per hectare prospected (+/- standard errors) in enclosed, half-open and open kitchen gardens.

Table III.B.1: Model comparison for fox faeces deposits. “Resources” stand for groups of covariates including “POULTRY”, “FRUIT TREE”, “COMPOST”, “ARVICOLA” and “MICROTUS” variables. “Habitats” stand for the group of covariates including “PASTURE”, “MEADOW”, “FOREST”, and “ARABLE LAND” and “FARM” variables. The most parsimonious model is outlined in grey.

Models	AIC	Δ AIC	wi
VILLAGE CLUSTER + Resources + MONTH + YEAR	1179	0	0,68
Resources + MONTH + YEAR	1182	3	0,15
VILLAGE CLUSTER + Habitats + Resources + MONTH + YEAR	1182	3	0,14
VILLAGE CLUSTER + Resources	1187	7	0,02
Resources + Habitats + MONTH + YEAR	1189	10	0,00
Resources	1190	11	0,00
VILLAGE CLUSTER + Habitats + Resources	1190	11	0,00
VILLAGE CLUSTER + MONTH + YEAR	1196	17	0,00
Resources + Habitats	1197	18	0,00
MONTH + YEAR	1199	20	0,00
Habitats + MONTH + YEAR	1206	26	0,00
VILLAGE CLUSTER	1206	27	0,00
null	1209	30	0,00
VILLAGE CLUSTER + Habitats	1211	32	0,00
Habitats	1216	37	0,00
VILLAGE CLUSTER + Habitats + MONTH + YEAR	1256	77	0,00

Table III.B.2: Variables backward selection in GLMM for the fox faeces deposit and the cat faeces deposit. Degrees of freedom (DF) and the delta AIC (Δ AIC) are provided for the full model, null model and the models that excludes each covariate one-by-one. Delta AIC stands for the difference between the full model AIC and the AIC of models excluding each covariate.

	Fox faeces			Cat faeces		
	Df	AIC	Δ AIC	Df	AIC	Δ AIC
Full model	NA	1182	0	NA	2159	0
Model without covariate :						
Pasture	1	1183	1	1	2162	3
Edges	1	1181	-1	1	2157	-2
Arable land	1	1180	-2	1	2160	1
Meadow	1	1180	-2	1	2158	-2
Farm	1	1184	2	1	2158	-1
Microtus	1	1181	-1	1	2160	1
Arvicola	1	1190	8	1	2160	1
Fruit trees	2	1188	6	2	2157	-2
Compost	1	1183	0	1	2158	-1
Poultry	1	1181	-1	1	2157	-2
Village cluster	3	1188	6	3	2157	-2
Month	4	1192	10	4	2167	8
Year	2	1184	1	1	2165	6

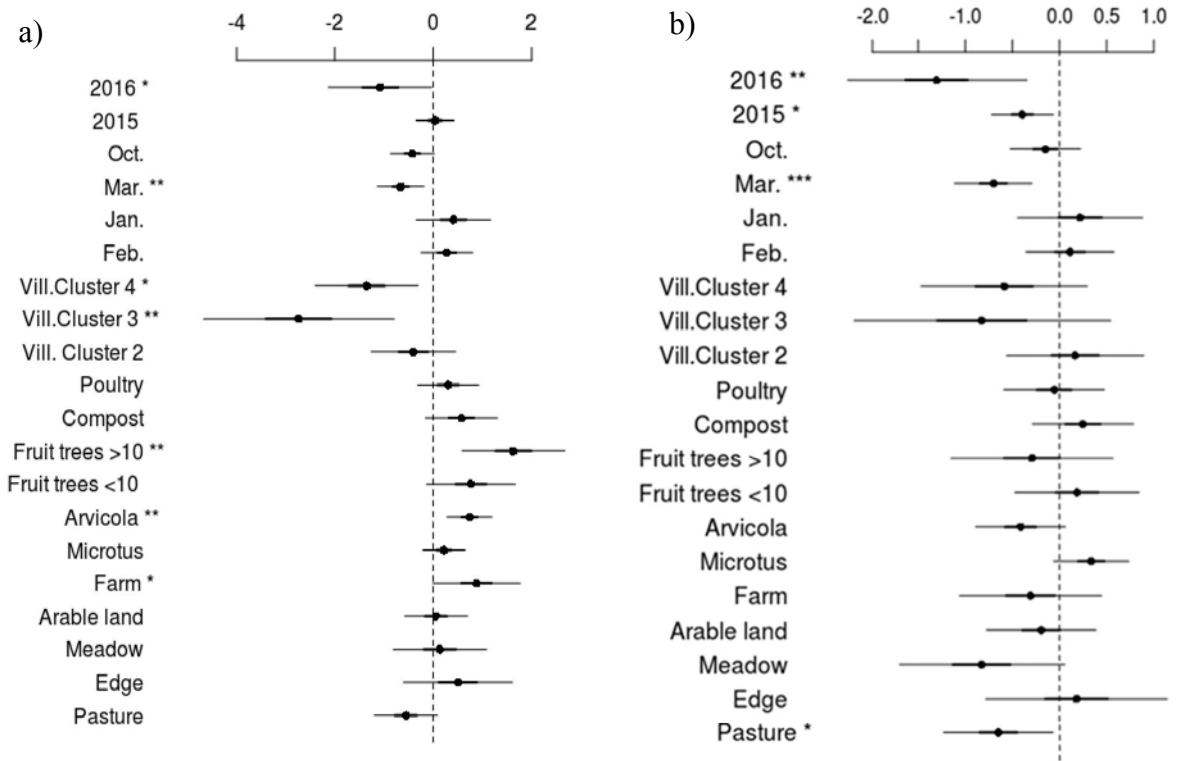


Figure III.B.4: Variable effects (regression coefficients and their 95% confidence intervals) for the full model for (a) fox faeces deposit model and (b) and cat faeces deposit model. Stars indicate the significance level of the Wald test for each covariate

Table III.B.3: Model comparison for cat faeces deposit. “Resources” stand for groups of covariates including “POULTRY”, “FRUIT TREE”, “COMPOST”, “ARVICOLA” and “MICROTUS” variables. “Habitats” stands for the group of covariates including “PASTURE”, “MEADOW”, “FOREST”, and “ARABLE LAND” and “FARM” variables. The most parsimonious model is outlined in grey.

Models	AIC	ΔAIC	wi
Habitats + MONTH + YEAR	2154	0	0,380
MONTH + YEAR	2154	0	0,369
Resources + MONTH + YEAR	2157	3	0,087
VILLAGE CLUSTER + MONTH + YEAR	2157	3	0,087
Resources + Habitats + MONTH + YEAR	2158	4	0,042
VILLAGE CLUSTER + Resources + MONTH + YEAR	2160	6	0,019
VILLAGE CLUSTER + Habitats + Resources + MONTH + YEAR	2160	6	0,016
null	2172	18	0,000
Habitats	2172	18	0,000
VILLAGE CLUSTER	2175	21	0,000
Resources	2176	22	0,000
Resources + Habitats	2177	24	0,000
VILLAGE CLUSTER + Resources	2179	25	0,000
VILLAGE CLUSTER + Habitats + Resources	2180	26	0,000
VILLAGE CLUSTER + Habitats + MONTH + YEAR	2246	92	0,000
VILLAGE CLUSTER + Habitats	2255	102	0,000

Table III.B.4: Occurrence of fox faeces, cat faeces and dog faeces collected in kitchen gardens that yielded positive qPCR results for the detection of *Echinococcus multilocularis*, *Toxocara* spp and *Toxoplasma gondii* DNA. The biomolecular analyses were conducted on all the collected faeces for *E. multilocularis* and *Toxocara* spp. but on subsamples for *T. gondii*.

	<i>E. multilocularis</i>	<i>Toxocara</i> spp.	<i>T. gondii</i>
Fox faeces	48/319 (15.0%)	56/319 (17.6%)	1/225 (0.4%)
Cat faeces	7/597 (1.2%)	229/597 (38.4%)	12/454 (2.6%)
Dog faeces	0/100 (0%)	11/100 (11%)	0/84 (0%)
TOTAL	55/1016 (5.4%)	296/1016 (29.1%)	13/763 (1.7%)

Table III.B.5: Number of kitchen gardens according to the number of host species identified as emitter of the collected stools and according to the detected parasitic DNA.

Kitchen gardens with	Only fox stools	Only cat stools	Only dog stools	Fox & cat stools	Fox & dog stools	Cat & dog stools	Cat, fox & dog stools	Total
At least one stool	12	46	5	47	2	10	26	148
At least one parasitized stool	6	28	0	38	1	6	22	101
A least one stool with <i>E.multilocularis</i>	3	1		17	0	1	9	31
A least one stool with <i>Toxocara</i> spp.	6	26		37	1	6	20	96
A least one stool with <i>T.gondii</i>	0	7		4	0	0	1	12
A least one stool with <i>Toxocara</i> spp. & one with <i>E.multilocularis</i>	3	1		16		1	7	28
A least one stool with <i>Toxocara sp</i> and one with <i>T.gondii</i>		5		3		0	1	9
A least one stool with <i>E.multilocularis</i> & one with <i>T.gondii</i>		1		2		0	0	3
A least one stool with <i>Toxocara</i> spp. & one with <i>E.multilocularis</i> & one with <i>T.gondii</i>		1		2		0	0	3

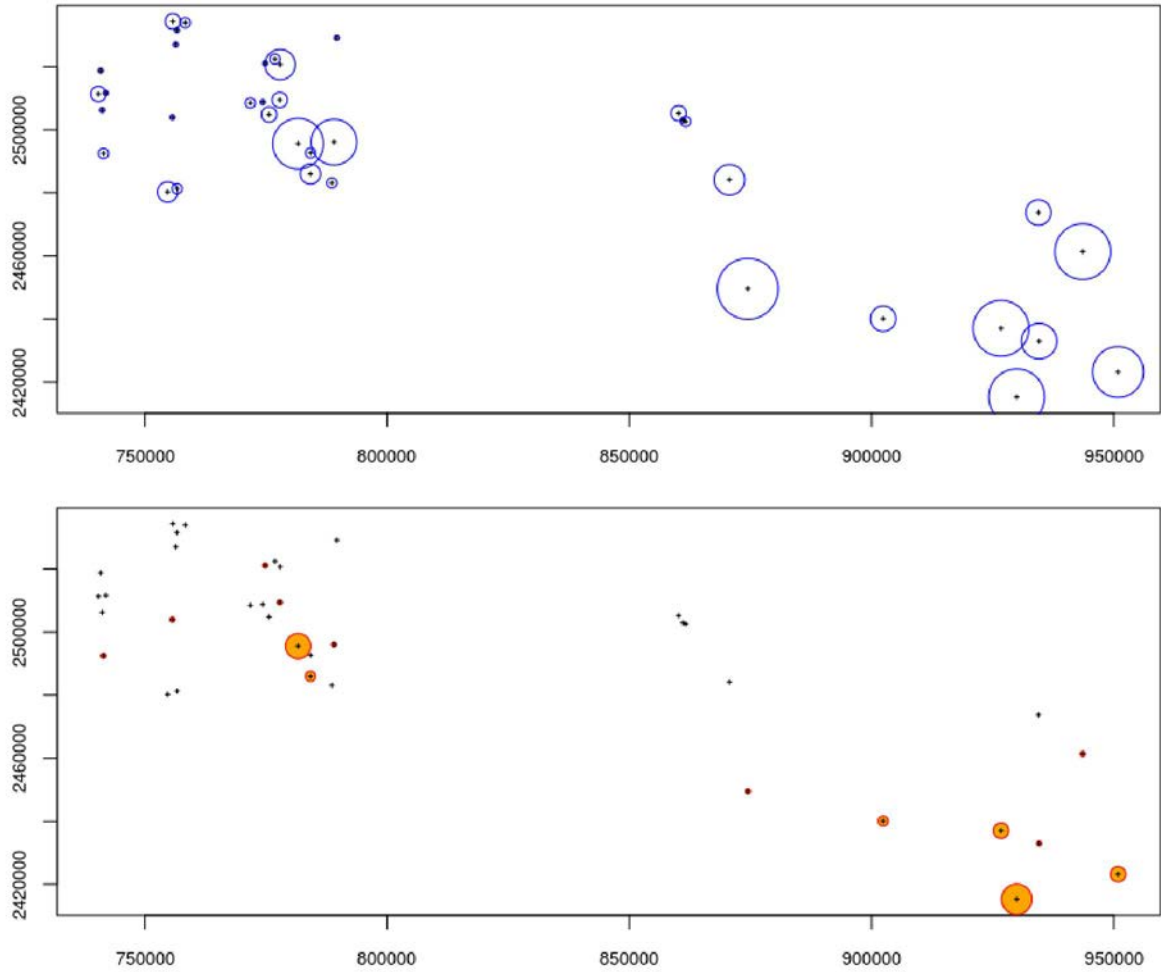


Figure III.B.5: Spatial distribution of the kitchen gardens (top panel) and kitchen garden with positive *E. multilocularis* faeces (bottom panel). Black crosses represent the centroeide of each village and circles size is proportional to the mean number of kitchen gardens (top panel) or kitchen garden with positive *E. multilocularis* faeces (bottom panel) per village.

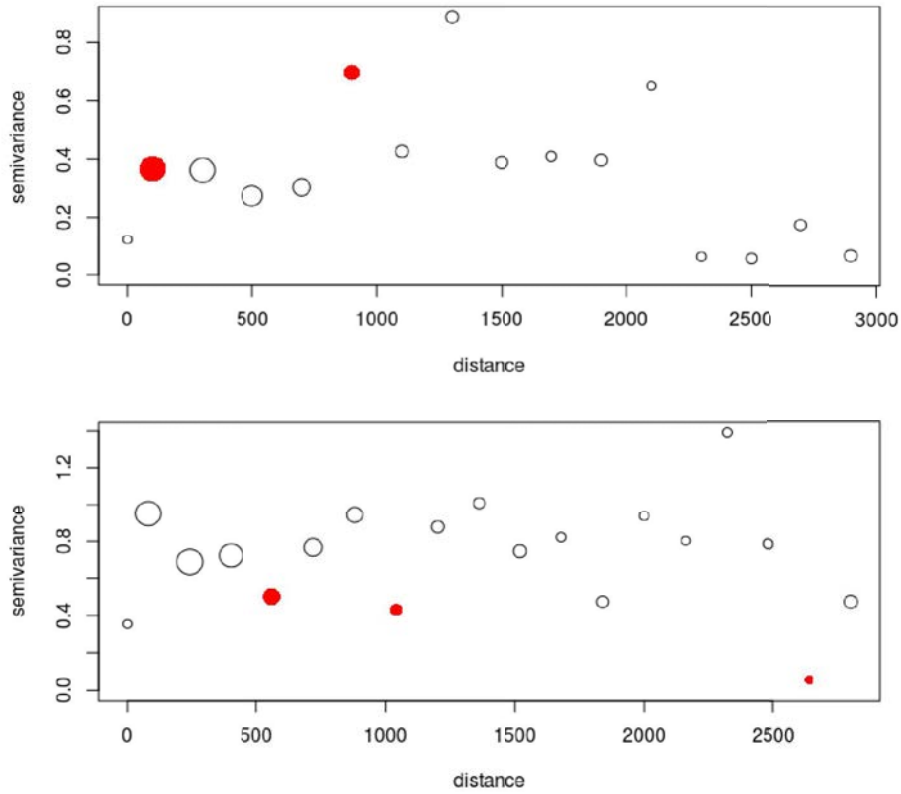


Figure III.B.6: Semi-variogram for each 160 m distance classes estimated for the residuals of the null GLMMs fitted to *Echinococcus multilocularis* (top panel) and *Toxocara* spp. (bottom panel) prevalence in fox faeces. Significant estimated Moran's Indices for each class are provided by filled red circles. Dots size is proportional to the number of neighbors per distance class.

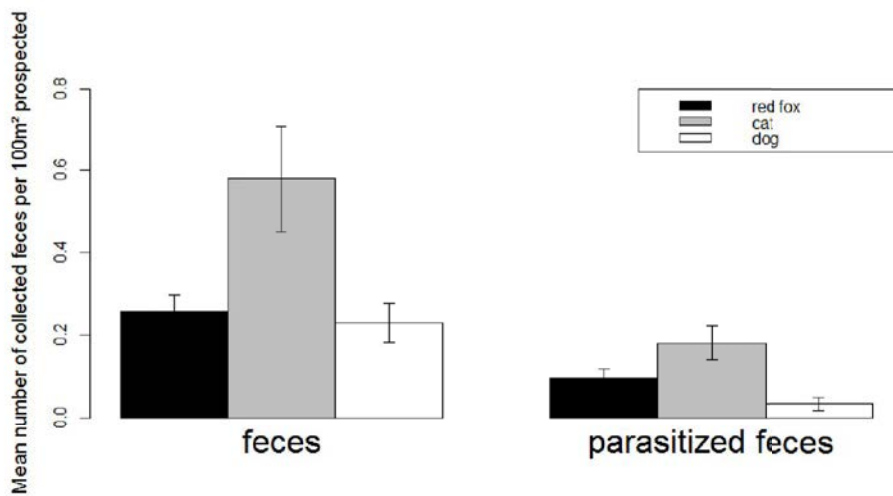


Figure III.B.7: Estimation of the amount of total faeces and parasitized faeces turnover deposited by fox, cat or dog every 6 weeks.

IV. PARTIE III : Contamination du sol des jardins potagers par *Echinococcus multilocularis* et *Toxocara* spp.

A. Préambule

La présence des parasites responsables de zoonoses transmises par l'alimentation et l'intensité de leur transmission sont estimées la plupart du temps à partir de leur prévalence dans les populations d'hôtes. C'est le cas notamment pour *E. multilocularis* pour lequel de nombreux travaux concernent la prévalence dans les populations d'hôtes définitifs (Miterpakova *et al.* 2006, Combes *et al.* 2012, Guerra *et al.* 2014, Takumi *et al.* 2007, Reperant *et al.* 2007, Guislain *et al.* 2008) et d'hôtes intermédiaires (Hofer *et al.* 2000, Stieger *et al.* 2002, Reperant *et al.* 2009) ont été conduits (Conraths et Deplazes 2015). C'est également le cas pour *Toxocara* spp. dont la prévalence dans les populations de chats et chiens est très fréquemment estimée à partir de fèces collectées directement sur les animaux amenés chez des vétérinaires (Overgaauw *et al.* 2009) ou dans des refuges (Dubna *et al.* 2007) ou encore à partir de l'analyse de cadavres d'animaux collectés lors de campagnes de régulation de populations de chats errants (Zibaei *et al.* 2007). Pour *T. gondii*, la recherche d'anticorps spécifiques à ce parasite dans le sérum et/ou de bradyzoïtes présents dans les tissus a été conduite dans de très nombreuses espèces d'animaux domestiques (Marshall *et al.* 2004, Williams *et al.* 2005, Hide *et al.* 2009, Dubey 2010) ou sauvages (Parameswaran *et al.* 2009, Jardine et Dubey 2002, Miller *et al.* 2008, Gotteland *et al.* 2013, Afonso *et al.* 2013). Ce type de données renseigne sur la dynamique de transmission mais n'apporte pas d'information directe sur le risque de contamination humaine lorsque ce dernier est essentiellement lié à la contamination environnementale et non au contact direct avec un hôte.

D'autres travaux portent sur la contamination des fèces déposées dans l'environnement (Uga *et al.* 1996, Raoul *et al.* 2001, Knapp *et al.* 2016, Umhang *et al.* 2016), ce qui apporte davantage d'informations sur le risque de contamination humaine. Cependant, entre le moment où la crotte contaminée est déposée et le moment où sont cueillis puis consommés crus des végétaux qui ont été en contact avec le lieu de dépôt, les œufs ou oocystes peuvent ne pas avoir survécu dans l'environnement ou avoir été dispersés à distance de leur lieu de dépôt. En effet, au cours de leur phase libre, les œufs ou oocystes des parasites sont soumis aux rayonnements ultra-violets, à la chaleur et à la dessiccation qui peuvent les inactiver. Les œufs d'*E. multilocularis* et les oocystes de *T. gondii* ont une très bonne survie dans les environnements ayant pour caractéristiques une faible température et une forte humidité (Veit *et al.* 1995, Lélou *et al.* 2011, Federer *et al.* 2015). Dans un milieu possédant une humidité relative de 100% et une température de 4°C, Veit *et al.* (1995) ont estimé le temps de survie des œufs du cestode à 478

jours. Dans le cas d'humidité relative plus faible ou de température plus élevée, le temps de survie serait moins long. Ainsi, Veit *et al.* (1995) estiment qu'au sud-ouest de l'Allemagne, où la température annuelle moyenne est de 12,7°C, avec des extrêmes allant de -7,5°C à 27°C, la survie de la phase libre d'*E. multilocularis* dans l'environnement serait d'environ 112 jours. Staubach *et al.* (2001) ont montré qu'en Allemagne, dans l'état de Brandenburg, les renards les plus contaminés étaient ceux trouvés proches des points d'eau de surface ou dans les zones avec un indice d'humidité élevé. Ainsi, les conditions de température et d'hygrométrie du sol sur lequel sont déposés les œufs, jouent un rôle important dans la dynamique de transmission du parasite, bien que peu de données soient disponibles actuellement sur la survie des parasites dans l'environnement. Les capacités de dispersion des oocystes de *T. gondii*, très facilement entraînés par les eaux de surface compte tenu de leur très petite taille, sont notamment mises en évidence par la contamination des mammifères marins provoquée par les eaux d'estuaires et/ou la consommation de poissons, hôtes paraténiques (Mikaelian *et al.* 2000, Simon *et al.* 2013). En revanche, les capacités de dispersion à distance de leur lieu de dépôt des œufs d'*E. multilocularis* et *Toxocara* spp. ne sont pas ou peu documentées jusqu'à présent.

Au final, c'est l'évaluation de la contamination du sol (et de l'eau dans le cas de *T. gondii*) qui est la plus informative sur le risque de contamination humaine puisqu'il s'agit là directement de la matrice à partir de laquelle l'humain peut se contaminer. La détection des œufs ou oocystes présents dans le sol n'est cependant pas toujours aisée.

Les œufs de *Toxocara* spp. sont relativement gros comparés à ceux d'*E. multilocularis* et *T. gondii* et se distinguent assez facilement de manière morphologique. Leur détection dans l'environnement est donc possible par des méthodes classiques de flottaison qui séparent les œufs du parasite de la terre à l'aide de solutions de densités supérieures à celles des œufs (O'Lorain 1994). Ainsi, pour *Toxocara* spp., une solution saturée de nitrate de sodium (NaNO₃) de densité 1,35 permet de séparer les œufs (de densité 1,1) de leur matrice avec un taux de récupération de 69,8%. Grâce aux techniques de flottaison, plusieurs études ont été consacrées à la contamination des sols par *Toxocara* spp. en milieu urbain (Dubna *et al.* 2007, Sanaei *et al.* 2012, Blaszkowska *et al.* 2015) ou rural (Jarosz *et al.* 2010, Mizgajska-Wiktor *et al.* 2017). Elles ont permis de mettre en évidence des zones à risque de contamination humaine : bacs à sable, terrains de jeux pour enfants, jardins privés, jardins potagers (Despommier 2003, Gawor *et al.* 2008, Jarosz *et al.* 2010, Klapiec et Borecka 2012). En revanche, la détection et l'identification spécifique des oocystes de *T. gondii* et des œufs d'*E. multilocularis*, beaucoup

plus petits que les œufs de *Toxocara* spp., ont nécessité la mise au point de méthodes de biologie moléculaire (Szostakowska *et al.* 2014, Lélou *et al.* 2011).

Dans la technique récemment développée par Lélou *et al.* (2011), après homogénéisation des échantillons de terre dans de l'acide sulfurique, une solution saturée de sucrose de densité 1,28 est utilisée pour mettre en suspension les oocystes de *T. gondii* éventuellement présents (de densité 1,12). Cette technique permet de détecter la présence d'oocystes dans des échantillons en contenant au minimum entre 10 et 100 par gramme. En revanche, la sensibilité de la méthode reste variable en fonction des types de sol testés, avec une mauvaise détection des oocystes dans le sable. Cette technique a notamment permis de montrer que la contamination des sols, en milieu rural, ne se limitait pas seulement aux principaux secteurs d'activités des chats mais semblait plus diffuse sur le territoire testé (Gotteland *et al.* 2014).

La présence dans le sol d'*E. multilocularis* a été décrite pour la première fois par Szostakowska *et al.* (2014). Ces auteurs ont développé une technique de flottaison à partir d'une solution de chlorure de zinc de densité de 1,4 afin de récupérer les œufs de ce cestode de densité 1,22. Cependant, leur technique ne permet une détection positive de l'échantillon qu'à partir du moment où au moins 100 œufs y étaient présents. Une amélioration de la sensibilité de la méthode était donc nécessaire en vue de développer des analyses sur la contamination environnementale.

Le premier objectif de cette troisième partie de thèse était donc de développer une méthode de détection des trois parasites dans la matrice sol afin de répondre aux questions suivantes :

- Est-ce que le passage des œufs de l'excrément au sol se fait peu de temps après le dépôt de ce dernier ?
- Quelle est la distribution spatiale de la contamination des sols des jardins potagers ?
- La contamination de ces sols dépend-elle de l'importance du dépôt de fèces de chat, chien et renard contaminées par ces parasites ?

Le développement de la méthode et la première question ont fait l'objet de l'**article 4** intitulé :

Umhang G., **Bastien M.**, Renault C., Faisse M., Caillot C., Boucher J-M., Hormaz V., Poulle M-L and F. Boué. Development of a flotation/sieving method to detect *Echinococcus multilocularis* eggs by real-time PCR in soil samples. Soumis à Parasites.

Le protocole mis au point nécessite une étape de filtration pour détecter les œufs d'*E. multilocularis* qui ne permet pas ensuite la détection des oocystes de *T. gondii* qui, du fait de leur petite taille, passent au travers du tamis de filtration. La détection de ces oocystes dans les sols aurait donc nécessité de refaire, sur tous les échantillons, des étapes de flottaison, extraction d'ADN et qPCR, trop coûteuses en temps et en consommables pour pouvoir être intégrées à cette thèse. Dans ce chapitre, nous traiterons donc uniquement de la contamination des sols par *E. multilocularis* et *Toxocara* spp.

La méthode de détection développée consiste au final en quatre étapes :

- la flottaison de l'échantillon de sol dans une solution de chlorure de zinc
- la filtration du surnageant
- l'extraction de l'ADN des œufs contenus dans le filtrat
- la qPCR en temps réel

Les trois premières étapes ont dû être ajustées afin de permettre une détection sensible des œufs des parasites dans les échantillons de sol. Dans l'hypothèse où les œufs du parasite pouvaient être difficilement remis en suspension à partir de l'échantillon de terre, nous avons testé différentes solutions de pré-traitement (Tween, eau, acide sulfurique, hydroxyde de potassium) avant de s'arrêter sur l'utilisation du Tween qui permet de bien remettre les œufs en suspension sans les altérer. De même, deux solutions de flottaison ont été testées, le sucre et le chlorure de zinc. Ce dernier, permettant une meilleure flottaison des œufs d'*E. multilocularis*, a été retenu.

Une étape de filtration a été ajoutée à notre protocole puisque nous avons observé un meilleur rendement en comparaison d'un protocole remplaçant cette filtration par une étape de dilution du gradient de flottaison et de centrifugation des œufs.

Enfin, la mise au point la plus importante a été l'extraction de l'ADN des œufs récupérés après la filtration. Nous avons testé l'ajout d'étapes de congélation/décongélation dans le but de fragiliser les membranes des œufs mais celles-ci n'ont pas amélioré significativement les résultats et elles ont donc été abandonnées pour gagner du temps. Deux kits d'extraction ont également été testés, le QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) utilisé pour l'extraction d'ADN à partir des fèces et le NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel). Ce dernier a montré des résultats plus probants que le premier et a donc été retenu.

Cette technique nous permet donc de détecter dans 100% des cas, 10 œufs d'*E. multilocularis* dans 10g de sol et jusqu'à un seul œuf dans 33% des cas. La collecte d'échantillon de sol sous des fèces dans les jardins potagers échantillonnés nous a permis de montrer que des œufs des parasites sont trouvés dans le sol, sous des fèces contaminées, même si celles-ci n'ont pas encore été lessivées par la pluie.

Les deux dernières questions sur l'évaluation de la contamination environnementale sont traitées dans l'**article 5** intitulé :

Bastien M., Umhang G., Combes B., Raton V., Faisse M., Germain E., Villena I., Aubert D., Boué F. and M-L. Poulle. Contamination du sol par *Echinococcus multilocularis* et *Toxocara* spp. dans des potagers familiaux fréquentés par des renards, chats et chiens. En préparation.

Au cours de la session de prospection de janvier 2015 dans les potagers de l'étude, nous avons collecté cinq échantillons de terre (un par côté et un au centre) dans 50 potagers des Ardennes. Nous avons considéré un potager positif à partir du moment où l'un de ses 5 échantillons de sol était positif pour l'un des deux parasites testés (*Toxocara* spp. et *E. multilocularis*). Ainsi, 42% des potagers avaient au moins un échantillon de sol positif pour *E. multilocularis* et 12% pour *Toxocara* spp. Nous n'avons pas trouvé de lien entre la collecte de fèces (détaillée au chapitre II) et la contamination du sol. Cependant, les potagers contaminés sont souvent proches les uns des autres. Ces résultats soulèvent donc des questions quant à la persistance des œufs de ces parasites et à leur dispersion.

B. Article 4: Development of a flotation/sieving method to detect *Echinococcus multilocularis* and *Toxocara* spp. eggs by real-time PCR in soil samples and use for the study of their transfer from feces to soil.

Gérald Umhang¹, Matthieu Bastien^{2,3,4}, Camille Renault¹, Marine Faisse^{1,4}, Christophe Caillot¹, Jean-Marc Boucher¹, Vanessa Hormaz¹, Marie-Lazarine Poulle^{2,3}, Franck Boué¹.

¹ ANSES Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife, National Reference Laboratory for *Echinococcus* spp., Wildlife Surveillance and Eco-Epidemiology Unit, Technopole Agricole et Vétérinaire, 54220 Malzéville, France

² University of Reims Champagne Ardenne, SFR Cap Santé, EA 3800 PROTAL, 51092 Reims cedex, France

³ University of Reims Champagne Ardenne, CERFE, 08240 Boult-aux-Bois, France

⁴ French Establishment for Fighting Zoonoses (ELIZ), Domaine de Pixérécourt, 54220 Malzéville, France

Soumis à Parasites

Abstract

Soil can be a source of human contamination by many zoonotic helminth species including *Echinococcus multilocularis* and *Toxocara* spp. Unlike for *Toxocara* spp., very few data are available about the detection of *Echinococcus multilocularis* in soil, whereas the prevention of alveolar echinococcosis could be greatly improved through the identification of at-risk areas, especially since very heterogeneous distribution of infective eggs in soil is suspected. Identification of soil contamination by *Echinococcus multilocularis* eggs requires the use of new specific methods. This study describes the development of a new method for the detection of *E. multilocularis* in soil samples with the concentration of eggs using a flotation/sieving method and detection by duplex real-time PCR. *Toxocara* spp. egg detection was also undertaken due to their widespread presence in soil, despite their lower zoonotic potential. Sensitivity of 100% was reached for the detection of ten *E. multilocularis* eggs spiked in ten grams of soil. Concerning *Toxocara* spp., sensitivity was lower but assumed to be due to the reduced effectiveness of the DNA extraction protocol. The parasitological statuses for *E. multilocularis* and *Toxocara* spp. of 63 carnivore feces collected in high-endemic rural areas of France and of soil samples collected under and near these feces were compared. The contamination of soil samples collected under positive feces for *E. multilocularis* (n=3) or *Toxocara* spp. (n=19) confirmed the transfer of eggs from the definitive host to the environment. This transfer seemed to occur rapidly since it was not related to the freshness status of fecal samples.

Keywords: Environmental samples, Soil contamination, *Echinococcus multilocularis*, *Toxocara* spp., Parasite eggs, Real-time PCR.

INTRODUCTION

More than 1.5 billion people (24% of the world's population) are infected with soil-transmitted helminth infections worldwide [20]. In Europe, humans are mainly infected by parasitic species such as *Trichinella*, *Giardia*, *Toxocara*, *Toxoplasma*, and *Echinococcus*. Amongst *Echinococcus* species, *Echinococcus multilocularis*, causing alveolar echinococcosis, is currently a real threat to public health in Europe with a larger endemic area than previously thought [5, 17, 23]. Alveolar echinococcosis is due to oral ingestion of microscopic eggs developing into the larval stage of the tapeworm. The metacestode is made up of small chains of interconnected vesicles almost exclusively in the liver, with tumor-like, infiltrative, destructive growth [3, 8]. When humans are considered as accidental hosts, the parasite lifecycle in Europe is mainly sylvatic involving red foxes (*Vulpes vulpes*) as definitive hosts and small rodents as intermediate hosts. Nevertheless, domestic carnivores, such as cats (*Felis silvestris catus*) and especially dogs (*Canis lupus domesticus*), can also act as definitive hosts after predation of infected rodents. The development of worms in the intestines of definitive hosts results in the production and release of eggs on the soil *via* feces. Worm burden in foxes is known to be very heterogeneous with few foxes harboring the vast majority of worms, leading to a heterogeneous distribution of infected feces responsible for environmental contamination [2, 6, 22]. In humans, the long asymptomatic period (from five to 15 years) makes the identification of the source of infection difficult or impossible. Some recurrent potential risk factors for developing alveolar echinococcosis in Europe have been identified as “dog or cat ownership,” “living in a rural area,” “having a kitchen garden,” “farming” and “handling foxes” [9, 12, 19]. While humans can be infected due to direct contact with infected carnivores having eggs on their fur or their feces, environmental contamination (soil, water, vegetables and fruits) is thought to represent a greater source of infection. Many surveillance studies have been conducted in highly *E. multilocularis* endemic countries in Europe, but these aimed to establish the prevalence of the parasite in different host species from animal samples (intestines, feces or liver) with only a few direct repercussions to prevent alveolar echinococcosis in humans. As feces are the primary source of infective eggs, data obtained from them may constitute a proxy for describing environmental contamination by the parasite. However, the examination of soil contamination by *E. multilocularis* eggs to identify at-risk areas would result in a better understanding of the source of human infection and associated risk factors. Difficulties in the development of these diagnostic methods combining the concentration and detection of parasites from the soil may explain why only very few recent

studies have focused on the identification of *E. multilocularis* eggs in environmental samples such as soil, vegetables and fruits [4, 13, 15, 24]. These studies provided preliminary results which need to be confirmed by additional data.

In this context, the aim of this study was to develop a new flotation/sieving method for the detection of *E. multilocularis* eggs in soil samples by real-time PCR, with evaluation of the limit of detection and sensitivity. Among the many other helminth-eggs that may be found in soil, *Toxocara* spp. has a lifecycle based also on the release of eggs *via* carnivore feces in the soil and ubiquitous presence. This nematode genus is responsible for *larva migrans* in humans mainly infected by environmental sources and constitutes a public health problem [18]. The detection of this zoonotic parasite was thus also evaluated with the method first established for *E. multilocularis*. To illustrate the utilization of this method, soil samples collected under and near carnivore feces were tested in order to improve our understanding of the transfer of eggs from hosts to the environment.

MATERIAL AND METHODS

Origins of soil samples and *E. multilocularis* and *Toxocara* spp. eggs used to develop the method

The soil used for the development of the method was sampled at the experimental station of the ANSES laboratory. No free-ranging carnivores have access to this area, allowing for the collection of soil samples free from helminth eggs. *E. multilocularis* eggs were obtained from a fecal sample of a naturally infected fox diagnosed by the Sedimentation and Counting Technique (SCT) exhibiting no worms of the *Taenia* genus [22]. Additionally, the exclusive presence of *E. multilocularis* eggs was confirmed by PCR. Concerning *Toxocara* spp., eggs came from a fecal sample provided by a naturally infected cat diagnosed by real-time PCR. For both parasites, feces were homogenized in distilled water and then filtered through a 120µm nylon mesh. After centrifugation, the supernatant was discarded and the pellet suspended in order to take the eggs one by one with a micropipette under a stereoscopic microscope (250X magnification).

Concentration of helminth eggs from the soil samples

The flotation method involved using 10g soil samples either spiked with *E. multilocularis* or *Toxocara* spp. eggs or directly collected in the environment. Samples were mixed with 10ml of

a 0.2% solution of Tween20 in order to facilitate the separation of eggs from soil particles. After centrifugation (1000g, 15min), the supernatant was discarded. The pellet was suspended through mixing with 15ml of a zinc chloride solution with a specific density of 1.42. After centrifugation (1000g, 20min), the supernatant was transferred to be filtered on a 20µm nylon mesh using a suction pump. The substrate in the mesh was then rinsed with 50ml of a 0.2% Tween20 solution above a centrifugation tube. After new centrifugation (1000g, 15 min), the supernatant was discarded and the pellet conserved to be subject to DNA extraction. In the context of the method's development, samples of 20g of soil were also tested for *E. multilocularis*. The same flotation protocol was applied but volumes were doubled for the initial step of Tween20 and for zinc chloride.

DNA extraction and qPCR assays

DNA extraction from pellets of soil samples was undertaken using the NucleoSpin Tissue kit (Macherey–Nagel) as recommended by the manufacturer. The detection of DNA from both *E. multilocularis* and *Toxocara* spp. was undertaken by real-time PCR (qPCR) as previously described [10, 11]. Nevertheless, the two qPCR reactions were performed as one multiplex reaction also including detection of an internal control plasmid previously used [26]. The qPCR reactions were performed in duplicate in a final volume of 25µl and run on a RotorGene thermocycler (Qiagen). All *E. multilocularis*-positive copro-samples obtained by real-time PCR were confirmed by sequencing the PCR products of a second real-time PCR, performed on the same gene, as proposed by Knapp *et al.* [11]. Concerning the analysis of fecal samples, 500mg were subject to DNA extraction using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) following the suggested protocols of the manufacturer. The molecular identification of the carnivore host species (i.e. fox, dog, cat) based on the feces was performed as previously described [11]. Detection of DNA from *E. multilocularis* and *Toxocara* spp. was undertaken according to the same real-time PCR protocol described for soil samples.

Determination of sensitivity

The effectiveness of DNA extraction followed by detection with real-time PCR reactions was evaluated by testing several replicates of samples containing only distilled water with ten eggs (n=2), five eggs (n=2), three eggs (n=6) and one egg (n=10). Secondly, the sensitivity of the method was tested all throughout the process, from flotation to qPCR reactions, using soil samples spiked with ten eggs, five eggs, three eggs and one egg of both parasites. The protocol

was initially designed and developed to be able to detect ten *E. multilocularis* eggs in 10g of soil with very high sensitivity, before also being evaluated for *Toxocara* spp.

Detection in soil samples under and near carnivore feces

In order to implement the developed method, fecal and soil samples were collected in October-November 2015 in 49 sites located on two alveolar *E. multilocularis* areas of north-eastern France, Ardennes and Moselle, with 36% and 34% of foxes infected, respectively [1]. One fecal sample was collected per site excepted for four sites where two feces (ten times) and three feces (twice) were collected for a total of 63 carnivore feces collected. For each feces, the freshness status of the sample was classified as “fresh” or “not fresh” according to visual appearance, assuming a scat classified as “fresh” should not be deposited by a carnivore more than 48 hours prior to collection. One soil sample was picked up at the exact place where a fecal sample was found and a second soil sample was also picked up between 50cm and 1m of the first one. A soil sample corresponded to roughly 50g of soil collected at a depth of approximately 5cm from the surface. For analysis, 10g were used after homogenization. In total, two soil samples were collected for each fecal sample leading to 126 soil samples. Levels of the parasites were assessed both in the fecal and soil samples after storage for one week at -80°C to prevent contamination. The link between the presence of feces, regardless of their parasitological status or only considering positive feces for *E. multilocularis* and/or *Toxocara* spp., and soil contamination was assessed using chi-square tests or Fisher's exact test when there were not enough samples. Additionally, the potential link between the freshness status of the positive feces and the contamination of the soil sample collected under feces was tested using Fisher's exact test. All statistical analyses were performed using the statistical software program R 3.1.3 [21] (with a significance threshold of 0.05).

RESULTS

Sensitivity of the method for detection of *E. multilocularis* and *Toxocara* spp. eggs

All *E. multilocularis* eggs in distilled water samples (from ten eggs to one egg) directly subject to DNA extraction and real-time PCR were detected. Average Cq values ranged from 26.43 for ten eggs to 30.99 for one egg. A low standard deviation even for one egg (SD=1.1) provided evidence of the good effectiveness and repeatability of these molecular steps. On the other hand,

while all samples with ten and five *Toxocara* spp. eggs in distilled water also led to a positive result, amplification was observed only for three out of the five samples with three eggs (60%) and only for three out of the ten samples with one egg (30%). When testing naïve soil samples of 10g spiked with ten *E. multilocularis* eggs, a positive qPCR signal was obtained for all samples corresponding to 100% sensitivity (Table IV.B.1). When using five eggs to one egg, sensitivity decreased from 80% to 33.3%. Using 20g of soil also resulted in lower sensitivity for detecting *E. multilocularis* eggs. For *Toxocara* spp., the sensitivity obtained with spiked soil samples (10g) ranged from 41.7% for ten eggs to only 8.3% for one egg (Table IV.B.1).

Detection of parasitic DNA under and near feces

Among the 63 collected feces, DNA from *Toxocara* spp. was identified in 19 samples (30.2%), mainly from cat feces (Table IV.B.2). *E. multilocularis* was detected only in three feces from foxes (4.8% of all collected feces). Overall, *E. multilocularis* and *Toxocara* spp. were detected in 15 (11.7%) and 11 (8.6%) soil samples, respectively. *Toxocara* spp. and *E. multilocularis* were identified together only in one soil sample collected under a fox fecal sample positive for *E. multilocularis* but not for *Toxocara* spp. Due to the low number of feces infected with *E. multilocularis*, the two parasites were considered together for studying links between fecal and soil sample contamination statuses (Table IV.B.3). When comparing parasite contamination in fecal and associated soil samples, a positive correlation was attributed only for the detection of *E. multilocularis* in both fecal and soil samples and/or the same for *Toxocara* spp. Soil contamination by *Toxocara* spp. or *E. multilocularis* was not related to the presence of feces, regardless of the parasitological status of the fecal samples ($\text{Chi}^2=1.21$; $p=0.271$): positive soil was found in places where there was a scat (with or without parasites) as well as in places where there was not. Nevertheless, when considering only positive feces for *Toxocara* spp. or *E. multilocularis*, soil samples collected under these feces were significantly more contaminated by the respective parasite species than others ($\text{Chi}^2=5.64$; $p=0.018$), while soil samples collected near these positive feces were not more contaminated than soil samples collected near non-contaminated feces ($\text{OR}=1.21$; $p=0.729$). Among the 22 fecal samples infected with *E. multilocularis* and/or *Toxocara* spp., nine were considered as “fresh” and 13 as “not fresh.” Contamination by both parasites was not significantly higher for soil samples collected under positive fresh feces than for soil not collected under positive fresh feces ($\text{OR}=2.24$; $p=0.415$).

DISCUSSION

The flotation/sieving method developed in this study proved to be highly sensitive since it enabled the systematic detection of ten eggs of *E. multilocularis* in 10g of soil sample. Additionally, it enabled the potential detection of only one egg in 10g of soil sample. Evaluation of the method's sensitivity appears essential before it can be used in field studies to draw relevant epidemiological conclusions. The use of 10g of soil proved to be more sensitive than the use of 20g. Using a higher quantity may be difficult and time-consuming for logistical reasons in the processing of the flotation/sieving technique requiring the construction of specific in-house material [7] and may also reduce sensitivity. Collecting multiple samples of 10g at different places may provide a better overview of contamination in an area than a single sample of a higher amount due to expected heterogeneity in the spatial distribution of the eggs. Furthermore, the relatively high level of *E. multilocularis* and *Toxocara* eggs in 10g soil samples from this study (11.7% and 8.6% respectively) supports the use of this amount.

The method proved to be less sensitive for the detection of *Toxocara* spp. eggs compared to *E. multilocularis*. Positive amplification results were not systematically obtained after direct DNA extraction of less than five *Toxocara* eggs. This step is the reason for the lower sensitivity in detecting *Toxocara* spp. eggs in soil samples rather than the flotation/sieving step. Further adaptation of the DNA extraction protocol by increasing the lysis period resolved this issue. Additional tests of DNA extraction from several samples of one *Toxocara* egg isolated from cat and fox feces systematically resulted in a positive qPCR signal. Unfortunately, this modification could not be applied to the environmental samples tested since the protocol used was the one initially designed for *E. multilocularis*. Thus, the number of positive environmental samples for *Toxocara* spp. is probably underestimated in this study. Microscopic identification of the eggs instead of molecular diagnosis may also resolve this issue for *Toxocara* spp. While this visual identification is also possible for many other parasite genera, molecular identification is essential for taeniid eggs in order to distinguish between the *Taenia* and *Echinococcus* genera and precisely determine the species involved.

The method was tested with soil samples collected under and near fresh feces to assess a potential link between the detection of eggs and the observation of a fecal sample, assuming a potential transfer of eggs from the infected feces to the soil notably *via* rain washing. Due to the low number of positive feces for *E. multilocularis*, data for both *E. multilocularis* and *Toxocara* spp. were considered but assuming that the results obtained here are transposable for *E.*

multilocularis alone. The detection of parasites in soil samples collected under non-infected feces or near feces could be due to contamination by previous feces, no longer visible at the time of collection, and also by other indirect ways (e.g. birds, insects) as stated by Torgerson (2016) [25]. Based on this result, the detection of feces does not appear to be an absolute indicator of soil contamination but may only be an indicator of risk exposure to parasites. On the other hand, the more frequent contamination of soil samples collected under positive feces for *E. multilocularis* or *Toxocara* spp. compared to soil samples collected near these feces confirms the transfer of eggs from the definitive host to the environment. Furthermore, no difference was found between the contamination status of soil collected under a positive fresh scat and that of soil collected under a positive but non-fresh scat. This result indicates that the transfer of eggs from feces to soil probably occurred very rapidly when the feces were deposited. Removal of feces was previously described as an important way to decrease *Toxocara* egg contamination [16]. In a context of soil contamination prevention, simply removing the observed feces may not be totally effective and efforts should focus on restricting access to these sensitive areas by carnivores.

Very few data are currently available on *E. multilocularis* and other *Echinococcus* species in soil and other environmental samples. Other methods for detecting *E. multilocularis* in environmental samples as recently undertaken in vegetables and fruits [4] need to be developed. As some reliable methods are now available, further studies are needed to evaluate actual environmental contamination in places where humans are often in contact with soil, such as kitchen gardens and public parks, and to evaluate the potential seasonal variation of this contamination. Additionally, quantitative estimation of the viability of *E. multilocularis* eggs in soil as already performed for *Toxoplasma gondii* [14] will also be of particular interest notably considering the accumulation of eggs over time. The evaluation of *E. multilocularis* in environmental samples such as soil, vegetables, fruits and water can help further our understanding of human sources of infection with AE.

References:

1. Combes B, Comte S, Raton V, Raoul F, Boue F, Umhang G, Favier S, Dunoyer C, Woronoff N, Giraudoux P. 2012. Westward spread of *Echinococcus multilocularis* in foxes, France, 2005–2010. *Emerging Infectious Diseases*, 18(12), 2059-2062.
2. Deplazes P, Hegglin D, Gloor S, Romig T. 2004. Wilderness in the city: The urbanization of *Echinococcus multilocularis*. *Trends in Parasitology*, 20(2), 77-84.
3. Eckert J, Deplazes P. 2001. Immunological and molecular techniques for diagnosing the echinococcus multilocularis infection in definitive and intermediate hosts. *Acta Parasitologica*, 46(1), 1-7.
4. Federer K, Armua-Fernandez MT, Gori F, Hoby S, Wenker C, Deplazes P. 2016. Detection of taeniid (*Taenia* spp., *Echinococcus* spp.) eggs contaminating vegetables and fruits sold in European markets and the risk for metacestode infections in captive primates. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 5(3), 249-253.
5. Gottstein B, Stojkovic M, Vuitton DA, Millon L, Marcinkute A, Deplazes P. 2015. Threat of alveolar echinococcosis to public health - a challenge for Europe. *Trends in Parasitology*, 31(9), 407-412.
6. Hofer S, Gloor S, Müller U, Mathis A, Hegglin D, Deplazes P. 2000. High prevalence of *Echinococcus multilocularis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) and voles (*Arvicola terrestris*) in the city of Zurich, Switzerland. *Parasitology*, 120(2), 135-142.
7. Horiuchi S, Uga S. 2016. Modified flotation method, an effective technique for recovering helminth eggs in soil. *Parasitology International*, 65, 576-579.
8. Jenkins DJ, Romig T, Thompson RC. 2005. Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp.--a global update. *International Journal for Parasitology*, 35(11-12), 1205-19.
9. Kern P, Ammon A, Kron M, Sinn G, Sander S, Petersen LR, Gaus W. 2004. Risk factors for alveolar echinococcosis in humans. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12), 2088-93.
10. Knapp J, Millon L, Mouzon L, Umhang G, Raoul F, Said Ali Z, Combes B, Comte S, Gbaguidi-Haore H, Grenouillet F, Giraudoux P. 2014. Real time PCR to detect the environmental faecal contamination by *Echinococcus multilocularis* from red fox stools. *Veterinary Parasitology*, 201(1-2), 40-47.
11. Knapp J, Umhang G, Poulle ML, Millon L. 2016. Development of a real-time PCR for a sensitive one-step copro-diagnosis allowing both the identification of carnivore feces and the detection of *Toxocara* spp. and *Echinococcus multilocularis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(10), 2950-2958.

12. Kreidl P, Allerberger F, Judmaier G, Auer H, Aspöck H, Hall AJ. 1998. Domestic pets as risk factors for alveolar hydatid disease in Austria. *American Journal of Epidemiology*, 147(10), 978-981.
13. Lass A, Szostakowska B, Myjak P, Korzeniewski K. 2015. The first detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in environmental fruit, vegetable, and mushroom samples using nested PCR. *Parasitology Research*, 114(11), 4023-4029.
14. Lélou M, Villena I, Darde ML, Aubert D, Geers R, Dupuis E, Marnef F, Poulle ML, Gotteland C, Dumetre A, Gilot-Fromont E. 2012. Quantitative estimation of the viability of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5127-5132.
15. Matsuo K, Kamiya H. 2005. Modified sugar centrifugal flotation technique for recovering *Echinococcus multilocularis* eggs from soil. *Journal of Parasitology*, 91(1), 208-209.
16. Morgan ER, Azam D, Pegler K. 2013. Quantifying sources of environmental contamination with *Toxocara* spp. eggs. *Veterinary Parasitology*, 193(4), 390-397.
17. Oksanen A, Siles-Lucas M, Karamon J, Possenti A, Conraths FJ, Romig T, Wysocki P, Mannocci A, Mipatrini D, La Torre G, Boufana B, Casulli A. 2016. The geographical distribution and prevalence of *Echinococcus multilocularis* in animals in the European Union and adjacent countries: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, 9(1), 1-23.
18. Overgaauw PAM, van Knapen F. 2008. Toxocarosis, an important zoonosis. *EJCAP*, 18(3), 259-266.
19. Piarroux M, Piarroux R, Knapp J, Dumortier J, Watelet J, Gerard A, Beytout J, Abergel A, Bresson Hadni S, Gaudart J. 2013. Populations at risk for alveolar echinococcosis, France. *Emerging Infectious Diseases*, 19(5), 721-728.
20. Pullan RL, Smith JL, Jasrasaria R, Brooker SJ. 2014. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasites & Vectors*, 7, 1-19.
21. R Core Team. 2015. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
22. Robardet E, Giraudoux P, Caillot C, Boue F, Cliquet F, Augot D, Barrat J. 2008. Infection of foxes by *Echinococcus multilocularis* in urban and suburban areas of Nancy, France: Influence of feeding habits and environment. *Parasite*, 15(1), 77-85.
23. Romig T. 2009. *Echinococcus multilocularis* in Europe--state of the art. *Veterinary Research Communications*, 33 Suppl 1, 31-4.
24. Szostakowska B, Lass A, Kostyra K, Pietkiewicz H, Myjak P. 2014. First finding of *Echinococcus multilocularis* DNA in soil: Preliminary survey in Varmia-Masuria Province, northeast Poland. *Veterinary Parasitology*, 203(1-2), 73-79.

25. Torgerson PR. 2016. Fresh fruits, vegetables, and mushrooms as transmission vehicles for *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology Research*, 115(11), 4447-4448.
26. Umhang G, Forin Wiart M-A, Hormaz V, Caillot C, Boucher J-M, Poulle M-L, Boue F. 2015. *Echinococcus multilocularis* detection in the intestines and feces of free-ranging domestic cats (*Felis s. catus*) and European wildcats (*Felis s. silvestris*) from northeastern France. *Veterinary Parasitology*, 214(1-2), 75-79.

Table IV.B.1. Sensitivites (in %) of the flotation/sieving method combined with DNA extraction and detection by real-time PCR for *E. multilocularis* and *Toxocara* spp. in soil samples (10 or 20g). For each number of eggs, 15 and 12 samples were used for *E. multilocularis* and *Toxocara* spp. Respectively.

number of eggs	<i>E. multilocularis</i>		<i>Toxocara</i> sp.
	10 g	20 g	10 g
1	33.3% (5/15)	NA	8.3% (1/12)
3	66.7% (10/15)	NA	25.0% (3/12)
5	80.0% (12/15)	73.3% (11/15)	8.3% (1/12)
10	100.0% (15/15)	86.7% (13/15)	41.7% (5/12)

Table IV.B.2. *E. multilocularis* and *Toxocara* spp. Infection level of collected feces in kitchen gardens according to the carnivores identified.

	Carnivores species feces identification			Total
	Fox	Cat	Dog	
<i>E. multilocularis</i>	3 (12.0%)	0	0	3 (4.8%)
<i>Toxocara</i> sp.	1 (4.0%)	17 (48.6%)	1 (33.3%)	19 (30.2%)
Number of feces	25	35	3	63

Table IV.B.3. Parasitological status of fecal and soil samples according to their position depending on the feces

Parasitological status of fecal samples	Parasitological status of soil samples			
	under the feces		near the feces	
	<i>E. multilocularis</i>	<i>Toxocara</i> sp.	<i>E. multilocularis</i>	<i>Toxocara</i> sp.
Positive <i>E. multilocularis</i> (n=3)	1	1	1	1
Positive <i>Toxocara</i> sp. (n=19)	3	7	1	1
Negative (n=41)	5	1	5	1

C. Article 5: Contamination du sol par *Echinococcus multilocularis* et *Toxocara* spp. dans des potagers familiaux fréquentés par des renards, chats et chiens.

M. Bastien^{1,2,3}, G. Umhang⁴, B. Combes³, V. Raton³, M. Fâisse^{3,4}, E. Germain⁵, I. Villena^{1,6}, D. Aubert^{1,6}, A. Vaniscotte⁷, F. Boué⁴ and M.-L. Poulle^{1,2}

¹University of Reims Champagne Ardenne, SFR Cap Santé, EA 3800 PROTAL, 51092 Reims cedex, France

²University of Reims Champagne Ardenne, CERFE, 08240 Boulton-aux-Bois, France

³French establishment for fighting zoonoses (ELIZ), Domaine de Pixérécourt, 54220 Malzéville, France

⁴ANSES, Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife, National Reference Laboratory for *Echinococcus* spp., Wildlife Eco-epidemiology and Surveillance Unit, 54220 Malzéville, France

⁵Research and observation center on carnivore (CROC), 57590 Lucy, France

⁶University Hospital of Reims, Department of Parasitology-Mycology, *Toxoplasma* National Center of Reference, 51092 Reims cedex, France.

⁷EcoDataDesign, France

En Préparation.

Résumé

La contamination des sols par *E. multilocularis* et *Toxocara* spp. a été étudiée dans 50 potagers familiaux situés en zone d'endémie d'échinococcose alvéolaire. Des prospections à pied à la recherche de fèces de renard, chat et chien ont été conduites au cours des hivers 2013-2014, 2014-2015 et 2015-2016 pour un total de huit sessions de prospection par potager. Au total, 318 fèces ont été collectées. Pour chacune, l'espèce émettrice et la présence d'ADN de parasite ont été déterminées par des analyses moléculaires. Parallèlement, cinq échantillons de terre ont été prélevés par potager et l'ADN d'*E. multilocularis* et *Toxocara* sp. a été recherché dans ces échantillons grâce à une méthode d'analyse moléculaire récemment mise au point. Sur les 250 échantillons de sol testés, 10% ont été détectés positifs pour *E. multilocularis*. Ils sont répartis dans 42 % des potagers. L'ADN de *Toxocara* sp. a été détecté dans 2% des échantillons, répartis dans 12 % des potagers mais ces proportions sont probablement sous-estimées car la méthode est moins sensible pour la détection de *Toxocara* spp. que pour celle d'*E. multilocularis*. La contamination du sol des potagers n'est pas fonction de la présence/absence de fèces - contaminées ou non - au cours des prospections, probablement car les potagers ont pu être contaminés avant la période de prospection. Nos résultats suggèrent un risque d'exposition humaine à *E. multilocularis* dans les potagers familiaux situés en zone d'endémie. Ils incitent à promouvoir la mise en place des mesures de prévention du dépôt de fèces de renard, chat et chien dans ces potagers par des campagnes d'information ciblées vers les jardiniers.

Mots clés : contamination sol, *Echinococcus multilocularis*, *Toxocara* sp., fèces renard, fèces chats.

Introduction

Le sol peut être une importante source de contamination humaine par les parasites responsables de zoonoses (Torgerson et Macpherson 2011). C'est notamment le cas des helminthes à cycle complexe qui ont pour hôte définitif un canidé ou un félin. Parmi eux figurent *Echinococcus multilocularis*, cestode responsable de l'échinococcose alvéolaire qui est une zoonose actuellement considérée comme très préoccupante en Europe (Eckert et al. 2011, Gottstein et al., 2015a), ainsi que *Toxocara* spp., nématode responsable de la toxocarose qui est une des helmintiases les plus répandues dans les pays industrialisés (Blaszkowska et al. 2011). Les œufs d'*E. multilocularis* et de *Toxocara* spp. sont déposés dans l'environnement avec les fèces des hôtes définitifs parasités. Le renard roux (*Vulpes vulpes*) est l'hôte définitif principal d'*E. multilocularis* en Europe (Eckert and Deplazes 2004). Le chien domestique (*Canis lupus familiaris*) est également hôte définitif de ce parasite mais sa contribution à la contamination du sol est moins importante car la prévalence d'*E. multilocularis* dans ses populations est plus faible (Deplazes et al. 2004, Umhang et al. 2012). Le chat domestique (*Felis silvestris catus*) peut également être parasité par *E. multilocularis* mais sa possible contribution à la dissémination des œufs de ce parasite dans l'environnement est controversée (Kapel et al. 2006, Umhang et al. 2015, Knapp et al. 2016). Le renard roux et le chien sont également hôtes définitifs de *Toxocara canis* tandis que le chat est hôte définitif de *Toxocara cati*. Les œufs d'*E. multilocularis* sont entièrement développés et infectieux pour les hôtes intermédiaires (micromammifères proies) et les hôtes accidentels (humains) au moment de leur excrétion, tandis que ceux de *Toxocara* spp. nécessitent quelques semaines à quelques mois de maturation dans l'environnement pour être infectant (Deplazes et al. 2011). Les œufs d'*E. multilocularis* sont très sensibles à la dessiccation mais peuvent survivre des mois dans un environnement froid et humide (Veit et al. 1995).

L'ingestion de terre contaminée par des œufs de *Toxocara* spp., relativement fréquente chez les jeunes enfants, ainsi que le fait de porter à la bouche des mains ou objets souillées par de la terre contaminée, sont identifiés comme des facteurs de risque de toxocarose (Gawor et al. 2008, Jarosz et al. 2010). Pour cette raison, de nombreux travaux ont porté sur la détection des œufs de ce parasite dans différents types de sol en utilisant la technique de séparation des œufs du substrat par flottaison dans une solution saturée en nitrate de sodium, suivie de l'identification et du comptage des œufs sous microscope (Mizgajska-Wiktor 2005). Il s'avère que les niveaux de contamination des sols utilisés à des fins récréatives (bac à sable, plages, jardins publics...) sont généralement élevés dès lors que les densités de chiens et chats sont

élevées (Bojar et Kłapeć 2012; Dubná et al. 2007; Traversa et al. 2014). En comparaison, très peu de données sont actuellement disponibles sur la contamination par *Toxocara* spp. des substrats utilisés pour les cultures maraichères, bien que la consommation crue de fruits et légumes soit identifiée comme un facteur de risque de toxocarose (Gyang et al. 2015). En régions rurales de Pologne, les œufs de ce parasite ont été trouvés dans des échantillons de terre provenant de terrains potagers familiaux et de tas composts (Blaszkowska et al. 2011), ainsi que dans des échantillons provenant de terrains de maraichers professionnels (Kłapeć and Borecka 2012). L'entretien d'un potager et la consommation crue de fruits et légumes sont également identifiés comme des facteurs de risque d'échinococcose alvéolaire (Kern et al. 2004, Piarroux et al. 2013) mais, jusqu'à très récemment aucune donnée n'était disponible sur la contamination des sols (quels qu'ils soient) par ce parasite. La détection d'*E. multilocularis*, dans des échantillons de sol n'est en effet possible que depuis la très récente mise au point, par Szostakowska et al. (2014) puis Umhang et al. (en révision), de méthodes de biologie moléculaire de détection de l'ADN de ce parasite dans le sol.

Nous avons utilisé la méthode mise au point par Umhang et al. (en révision) pour détecter simultanément l'ADN d'*E. multilocularis* et *Toxocara* spp. dans le sol afin d'analyser la distribution de la contamination des sols par ces parasites dans des potagers familiaux situés en zone d'endémie d'échinococcose alvéolaire. Cette distribution de la contamination parasitaire des sols a été mise en relation avec la présence de fèces de renard, chat et chien, parasitées ou non, dans les terrains potagers.

Matériel et Méthode

2.1. Terrain d'étude

L'étude a été conduite dans le nord-est de la France, dans le département des Ardennes (49° 25' N, 4° 50' E). Le climat est continental, avec de longs hivers, froids et humides. Les températures moyennes varient de -0,7°C à 15°C entre le 1^{er} Octobre et le 30 Mars (www.meteofrance.com) et les précipitations moyennes annuelles sont de l'ordre de 958 mm/an. Les Ardennes françaises sont un département à dominance rurale avec une faible densité d'habitants (environ 16 habitants/km²) répartie dans de petits villages, la plupart ayant moins de 200 habitants. La prévalence d'*E. multilocularis* dans les populations vulpines a été estimée à 36% (Combes et al. 2012). L'incidence cumulée d'échinococcose alvéolaire dans les Ardennes sur la période 1982-2007 est comprise entre 2,74 et 6,10 soit une des plus fortes incidences humaines de cette zoonose en France (Piarroux et al. 2015).

2.2 Terrains potagers échantillonnés

Cinquante potagers familiaux répartis dans 11 villages ont été échantillonnés. Ils ont été sélectionnés aléatoirement dans un échantillon plus large de 94 potagers suivis lors d'une étude conjointe (Bastien et al. en préparation) et dont ils forment un sous-échantillon. La superficie moyenne de ces potagers, mesurée précisément à l'aide d'un mètre linéaire, est de $543,52 \pm 203,1$. Neuf de ces 50 potagers (18%) sont entourés d'une clôture continue d'au moins 1,20m de haut qui empêche l'accès des renards et chiens (mais pas celui des chats), 31 (62%) sont entourés d'une clôture discontinue ou d'un autre type d'obstacles (haie, ruisseau...) susceptible de limiter l'accès des renards et chiens, 10 (20%) sont complètement accessibles aux renards et chiens.

2.3 Echantillonnage et analyse des fèces et échantillons de sol

Huit sessions de recherche et collecte de fèces de carnivores dans les potagers échantillonnés ont été réalisées en octobre, janvier, février et mars des hivers 2013-2014, 2014-2015 et 2015-2016. Les fèces collectées ont été identifiées individuellement, localisées précisément, décontaminées par passage 5 jours à -80°C et conservées à -20°C jusqu'à leur analyse. Des analyses moléculaires ont été conduites sur toutes les fèces collectées pour identifier l'émetteur (renard, chien, chat ou indéterminé) et pour détecter l'ADN d'*E. multilocularis* et de *Toxocara* spp. (voir Bastien et al. en préparation).

Par ailleurs, dans chacun des 50 potagers échantillonnés, cinq échantillons de sols ont été collectés : un sur chacun des quatre côtés et un au centre. Un échantillon de sol correspondait à environ 50g de terre collectée à la surface du sol jusqu'à une profondeur d'environ 5 cm. Au final, 250 échantillons de sol ont donc été collectés et stockés à -80°C pendant une semaine pour décontamination puis à -20°C jusqu'à analyse. Dix grammes de chaque échantillon ont été analysés pour la présence d'ADN d'*E. multilocularis* et de *Toxocara* spp. avec la méthode de flottaison suivie de PCR en temps réel, très récemment mise au point et dont la sensibilité et la spécificité ont été testées (Umhang et al., en révision). Le sol d'un potager a été considéré positif pour *E. multilocularis* et/ou *Toxocara* spp dès lors qu'au moins un des cinq échantillons testés pour ce potager se révélait positif pour le parasite considéré.

2.4 Analyse des données

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R 3.3.2 (R Core Team 2016). Pour chaque potager, le nombre de fèces collectées ainsi que le nombre de fèces dans lesquelles l'ADN d'un parasite a été détecté ont été rapportés à la superficie échantillonnée pour obtenir

une densité de fèces et une densité de fèces positives par mètre carré. De même, le nombre de fèces positives a été rapporté au nombre de fèces collectées par session pour obtenir une proportion de fèces positives par potager. La moyenne de ces proportions sur les huit sessions a été calculée par potager. Ces moyennes pour les potagers avec sol positif ont été comparées à celles des potagers avec sol négatif par un test de rang de Wilcoxon, Mann & Whitney.

Résultats

Au total, 318 fèces de renard, chat ou chien ont été collectées. Dans 11 des 50 potagers échantillonnés (22 %) aucun excrément n'a été trouvé au cours des huit sessions de prospection ; dans 25 potagers (50 %), au moins un excrément de renard a été trouvé, accompagné ou non d'au moins un excrément de chat et/ou de chien ; dans 34/50 potagers (68 %) au moins un excrément de chat a été trouvé, accompagné ou non d'excrément de renard et/ou chien (Tableau IV.C.1). Sur les 250 échantillons de sol testés, 26 (10%) répartis dans 21/50 potagers échantillonnés (42 %) ont été détectés positifs pour *E. multilocularis*, tandis que 6 (2%) répartis dans 6 des 50 des potagers échantillonnés (12%) l'ont été pour *Toxocara spp.* Dans trois potagers au moins un échantillon de sol positif pour la détection d'ADN d'*E. multilocularis* et un échantillon de sol positif pour la détection d'ADN de *Toxocara spp.* ont été trouvés (Tableau IV.C.1). Dans trois autres potagers, deux des cinq échantillons de sol testés se sont révélés positifs pour la détection de l'ADN d'*E. multilocularis*. Dans un potager, trois des cinq échantillons testés se sont révélés positifs pour la détection de l'ADN de ce parasite. La contamination des sols des potagers semble largement répartie sur la zone d'étude puisque, dans 7 des 11 des villages dans lesquels des potagers ont été échantillonnés, au moins un potager a été détecté positif pour la contamination de son sol par au moins un parasite. Dans ces 7 villages, 57% [40 – 71] des potagers ont été détectés positifs pour *E. multilocularis* et/ou *Toxocara spp.*

Les proportions moyennes de fèces positives pour la détection de l'ADN d'*E. multilocularis* ou *Toxocara spp.* ne diffèrent pas significativement entre les potagers dans lesquels les cinq échantillons de sol étaient négatifs pour la détection de ces parasites et les potagers dans lesquels au moins un des échantillons était positif (Figure IV.C.1A, Wilcoxon, Mann & Whitney, $W=202$, $P=0.75$). De même, la proportion moyenne de fèces de renard positives pour *E. multilocularis* ne diffère pas entre les potagers « à sol négatif » et les potagers « à sol positif » pour ce parasite (Figure IV.C.1B Wilcoxon, Mann & Whitney, $W=89.5$, $P=0.18$).

Discussion

Au moins un échantillon de sol a été trouvé positif pour la détection de l'ADN d'*E. multilocularis* dans un potager échantillonné sur deux, ce qui tend à indiquer une large distribution de ce parasite dans les sols des potagers de la région d'étude. Par comparaison, des sols positifs pour la détection d'ADN de *Toxocara* spp. ont été trouvés dans seulement 12 % des potagers échantillonnés. Cette faible proportion est très probablement due à un biais méthodologique. En effet, Umhang et al. (en révision) montrent que la qPCR qui suit l'isolement des œufs et permet l'identification de l'ADN n'est pas aussi sensible pour *Toxocara* spp. que pour *E. multilocularis*. L'extraction directe de l'ADN de moins de cinq œufs de *Toxocara* spp. n'a pas abouti à une amplification systématique contrairement à ce qui a été observé pour *E. multilocularis*. La contamination du sol des potagers par ce parasite a donc probablement été sous-estimée, d'autant plus que la présence de fèces de chats, qui sont fréquemment contaminées par *Toxocara* spp. dans la région (Pouille et al. en révision, Bastien et al. en préparation), dans près de 70% des potagers échantillonnés laissait présager une distribution plus large de ce parasite.

La proportion de 42 % d'échantillons de sol positifs pour *E. multilocularis* que nous avons trouvée dans les potagers peut être expliquée par la prévalence relativement élevée de ce parasite dans la population de renards de la zone d'étude (Combes et al. 2012) et par la présence de fèces de renard dans 50% des potagers échantillonnés. En revanche, l'absence de lien apparent entre la présence de fèces, contaminées ou non, dans le potager et la contamination du sol est plus surprenante. Ce résultat s'explique très probablement par un processus d'accumulation des œufs avec le temps et par leur persistance. En effet, contrairement à la collecte et l'analyse de fèces qui donnent des informations sur la possible contamination du sol à un instant t, l'analyse d'échantillon de sol reflète l'ensemble des événements de contamination qui ont pu avoir lieu au cours du temps à l'endroit du prélèvement. Ainsi, nos résultats laissent à penser que la collecte périodique de fèces de carnivores et leur analyse sous-estiment l'importance de la contamination du sol au niveau micro-local et donc le risque d'exposition des hôtes intermédiaires et accidentels à ce parasite. Ils soulèvent également des questions sur la persistance de la contamination du sol.

En effet, les formes environnementales des parasites à transmission trophique sont souvent très résistantes dans l'environnement. Ainsi, l'ADN de *Toxoplasma gondii* a été détectable expérimentalement dans le sol pendant deux ans en condition favorable d'humidité (Lélu et al. 2010). Cependant, aucune donnée de ce type n'est actuellement disponible pour *E.*

multilocularis pour lequel seules sa résistance aux températures froides et sa sensibilité à la dessiccation et aux températures élevées ont été décrites (Veit et al. 1995, Federer et al. 2015). Ainsi, bien que la perte de viabilité des œufs d'*E. multilocularis* induise sûrement une diminution de la détectabilité de l'ADN par qPCR, comme cela a été proposé pour les oocystes de *T. gondii* (Lélu et al 2010), les échantillons de sol positifs dans notre étude reflètent possiblement une contamination antérieure à notre période de prospection (c'est-à-dire datant de plus de deux ans), ce qui pourrait expliquer la discordance relevée entre la contamination des sols et le dépôt de fèces de carnivores.

Dans le cas des potagers, il est possible de supposer qu'une large part de l'ADN détecté provient d'œufs infectants car l'arrosage régulier du sol au printemps et en été (période critique pour les œufs car à risque de dessiccation) leur assure de bonnes conditions de survie. Il serait cependant très intéressant de pouvoir reprendre le protocole de Lélu et al. (2012) pour quantifier expérimentalement la survie des œufs d'*E. multilocularis* en condition de sol sec et en condition de sol humide, en prélevant des échantillons à intervalles réguliers sur une longue période (au moins deux ans) pour estimer le délai à partir duquel les œufs ne sont plus infectants et celui à partir duquel l'ADN n'est plus détectable. Ce type d'expérimentation est cependant lourd à mettre en place et nécessite l'utilisation de modèle murin, comme c'est le cas pour la technique développée par Federer et al. (2015). La détection d'ARNm, utilisée par Kern et al. (1995) pour analyser la viabilité des formes larvaires (métacestodes), pourrait être envisagée pour tester la viabilité des œufs du parasites, comme cela a été développé pour détecter celle des cystes de *Giardia intestinalis* et des oocystes de *Cryptosporidium spp.* et *T. gondii* (Travaillé et al. 2016). Quoiqu'il en soit, il est certain que l'acquisition de données sur la persistance de l'infectiosité des œufs d'*E. multilocularis* dans le sol serait précieuse pour évaluer l'efficacité de la mise en place de mesures de prévention de la contamination des sols des potagers. En effet, s'il s'avère que le parasite persiste des années dans le sol, les mesures de prévention mises en place ne devraient être considérées comme pleinement efficaces qu'une fois ce délai écoulé, faute de moyen de s'assurer que le terrain n'était pas déjà contaminé auparavant. Ou alors, avant de protéger le bout de terrain destiné aux végétaux consommés crus qui sont en contact avec le sol (fraises par exemple) il faudrait envisager de remplacer la terre présente en surface, comme cela a été fait expérimentalement dans le cas de terrains potagers contaminés par les métaux lourds (Douay et al., 2008). Cette mesure ne serait bien sûr envisageable que sur de petites surfaces en raison des coûts et efforts engendrés.

De façon générale, en faisant état d'une proportion élevée de potagers familiaux situés en zone de haute endémie d'échinococcose alvéolaire dont le sol est contaminé par *E.*

multilocularis, nos résultats attirent l'attention sur le risque d'exposition humaine à ce parasite, lié à l'utilisation des potagers pour la culture de fruits et légumes dont certains sont destinés à être consommés crus. Les études épidémiologiques basées sur le suivi sérologique de la présence d'antigènes dirigés contre *E. multilocularis* ont permis de mettre en évidence que la plupart des personnes qui ont été infectées par les œufs de ce parasite développent une résistance qui leur permet de ne pas présenter ultérieurement les symptômes d'échinococcose alvéolaire (Gottstein et al., 2015b). On peut cependant se poser la question de savoir si cette résistance ne peut pas être mise à mal par une exposition répétée au parasite. La consommation fréquente, sur de longues périodes, des produits frais issus de potagers contaminés induirait alors un risque de développer la maladie plus élevé pour les consommateurs de ces produits – ou tout du moins pour certains d'entre eux – que pour les personnes rarement exposées.

Dans ce contexte, il semble primordial de prévenir autant que possible la contamination initiale des sols des potagers par les fèces de carnivores. Nos résultats concernant la contamination des sols indiquent que les potagers, ou au moins les parties de ces terrains réservées aux fruits et légumes destinés à être consommés crus devraient être des emplacements protégés en tout temps de tout dépôt de fèces. La pose d'une clôture hermétique empêchant l'accès des renards et chiens au potager, le fait de recouvrir d'un grillage les portions de terrain prévues pour la culture de végétaux consommés crus afin d'empêcher les chats d'y déféquer (ou la pose d'un film biodégradable comme actuellement fait pour empêcher la pousse des mauvaises herbes), ainsi que la culture des fraises et herbes aromatiques dans des bacs surélevés inaccessibles aux chiens et renards, devraient être encouragés auprès des particuliers. La mise en place de campagnes d'information ciblées en direction des jardiniers est à envisager (voir exemple en figure IV.C.2), en veillant à fournir un message précis mais non anxiogène (Hegglin et al., 2008).

Références

- Bastien M., Vaniscotte A., Combes B., Umhang G., Raton V., Germain E., Villena I., Aubert D., Boué F. and M-L. Poulle. Fox, cat and dog faeces deposit in kitchen gardens: drivers and patterns of contamination in some rural hot spots of food borne zoonosis transmission. En preparation.
- Blaszowska, J., Kurnatowski, P., Damięcka, P., 2011. Contamination of the soil by eggs of geohelminths in rural areas of Lodz district (Poland). *Helminthologia* 48, 67–76.
- Bojar, H., Kłapeć, T., 2012. Contamination of soil with eggs of geohelminths in recreational areas in the Lublin region of Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 19, 267–270.
- Combes, B., Comte, S., Raton, V., Raoul, F., Boué, F., Umhang, G., Favier, S., Dunoyer, C., Woronoff, N., Giraudoux, P., 2012. Westward Spread of *Echinococcus multilocularis* in Foxes, France, 2005–2010. *Emerging Infectious Diseases* 18, 2059–2062.
- Deplazes, P., Hegglin, D., Gloor, S., Romig, T., 2004. Wilderness in the city: the urbanization of *Echinococcus multilocularis*. *Trends in Parasitology* 20, 77–84.
- Deplazes, P., van Knapen, F., Schweiger, A., Overgaauw, P.A.M., 2011. Role of pet dogs and cats in the transmission of helminthic zoonoses in Europe, with a focus on echinococcosis and toxocarosis. *Veterinary Parasitology* 182, 41–53.
- Douay, F., Roussel, H., Pruvot, C., Waterlot, C., 2008. Impact of a smelter closedown on metal contents of wheat cultivated in the neighbourhood. *Environmental Science and Pollution Research* 15, 162–169.
- Dubná, S., Langrová, I., Jankovská, I., Vadlejš, J., Pekár, S., Nápravník, J., Fechtner, J., 2007. Contamination of soil with *Toxocara* eggs in urban (Prague) and rural areas in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology* 144, 81–86.
- Eckert, J., Deplazes, P., 2004. Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern. *Clinical Microbiology Reviews* 17, 107–135.
- Eckert, J., Deplazes, P., Kern, P., 2011. Alveolar echinococcosis (*Echinococcus multilocularis*) and neotropical forms of Echinococcosis (*Echinococcus vogeli* and *Echinococcus oligarthrus*), in: *Oxford Textbook of Zoonoses Biology, Clinical Practice, and Public Health Control*. pp. 669–699.

- Federer, K., Armua-Fernandez, M.T., Hoby, S., Wenker, C., Deplazes, P., 2015. In vivo viability of *Echinococcus multilocularis* eggs in a rodent model after different thermotreatments. *Experimental Parasitology* 154, 14–19.
- Gawor, J., Borecka, A., Żarnowska, H., Marczyńska, M., Dobosz, S., 2008. Environmental and personal risk factors for toxocariasis in children with diagnosed disease in urban and rural areas of central Poland. *Veterinary Parasitology* 155, 217–222.
- Gottstein, B., Stojkovic, M., Vuitton, D.A., Millon, L., Marcinkute, A., Deplazes, P., 2015a. Threat of alveolar echinococcosis to public health – a challenge for Europe. *Trends in Parasitology* 31, 407–412.
- Gottstein, B., Wang, J., Boubaker, G., Marinova, I., Spiliotis, M., Müller, N., Hemphill, A., 2015b. Susceptibility versus resistance in alveolar echinococcosis (larval infection with *Echinococcus multilocularis*). *Veterinary Parasitology* 213, 103–109.
- Gyang, P.V., Akinwale, O.P., Lee, Y.-L., Chuang, T.-W., Orok, A.B., Ajibaye, O., Liao, C.-W., Chen, P.-C., Chou, C.-M., Huang, Y.-C., Barghouth, U., Fan, C.-K., 2015. Seroprevalence, disease awareness, and risk factors for *Toxocara canis* infection among primary schoolchildren in Makoko, an urban slum community in Nigeria. *Acta Tropica* 146, 135–140.
- Heggin, D., Bontadina, F., Gloor, S., Romig, T., Deplazes, P., Kern, P., 2008. Survey of public knowledge about *Echinococcus multilocularis* in four European countries: Need for proactive information. *BMC Public Health* 8, 247.
- Jarosz, W., Mizgajska-Wiktor, H., Kirwan, P., Konarski, J., Rychlicki, W., Wawrzyniak, G., 2010. Developmental age, physical fitness and *Toxocara* seroprevalence amongst lower-secondary students living in rural areas contaminated with *Toxocara* eggs. *Parasitology* 137, 53–63.
- Kapel, C.M.O., Torgerson, P.R., Thompson, R.C.A., Deplazes, P., 2006. Reproductive potential of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes, dogs, raccoon dogs and cats. *International Journal for Parasitology* 36, 79–86.
- Kern, P., Frosch, P., Helbig, M., Wechsler, J.G., Usadel, S., Beckh, K., Kunz, R., Lucius, R., Frosch, M., 1995. Diagnosis of *Echinococcus multilocularis* infection by reverse-transcription polymerase chain reaction. *Gastroenterology* 109, 596–600.
- Kern, Petra, Ammon, A., Kron, M., Sinn, G., Sander, S., Petersen, L.R., Gaus, W., Kern, Peter, 2004. Risk factors for alveolar echinococcosis in humans. *Emerging infectious diseases* 12, 2088–2093.

- Klapec, T., Borecka, A., 2012. Contamination of vegetables, fruits and soil with geohelminths eggs on organic farms in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 19, 421–425.
- Knapp, J., Combes, B., Umhang, G., Aknouche, S., Millon, L., 2016. Could the domestic cat play a significant role in the transmission of *Echinococcus multilocularis*? A study based on qPCR analysis of cat feces in a rural area in France. *Parasite* 23, 42–53.
- Lélu, M., Villena, I., Darde, M.-L., Aubert, D., Geers, R., Dupuis, E., Marnef, F., Poulle, M.-L., Gotteland, C., Dumetre, A., Gilot-Fromont, E., 2012. Quantitative Estimation of the Viability of *Toxoplasma gondii* Oocysts in Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 5127–5132.
- Lélu, M., Langlais, M., Poulle, M.-L., Gilot-Fromont, E., 2010. Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* along an urban–rural gradient. *Theoretical population biology* 78, 139–147.
- Mizgajska-Wiktor, H., 2005. Recommended method for recovery of *Toxocara* and other geohelminth eggs from soil. *Wiadomości parazytologiczne* 51, 21–22.
- Piarroux, M., Gaudart, J., Bresson-Hadni, S., Bardonnnet, K., Faucher, B., Grenouillet, F., Knapp, J., Dumortier, J., Watelet, J., Gerard, A., others, 2015. Landscape and climatic characteristics associated with human alveolar echinococcosis in France, 1982 to 2007. *Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin* 20.
- Piarroux, M., Piarroux, R., Knapp, J., Bardonnnet, K., Dumortier, J., Watelet, J., Gerard, A., Beytout, J., Abergel, A., Bresson-Hadni, S., Gaudart, J., for the FrancEchino Surveillance Network, 2013. Populations at Risk for Alveolar Echinococcosis, France. *Emerging Infectious Diseases* 19, 721–728.
- Szostakowska, B., Lass, A., Kostyra, K., Pietkiewicz, H., Myjak, P., 2014. First finding of *Echinococcus multilocularis* DNA in soil: Preliminary survey in Varmia-Masuria Province, northeast Poland. *Veterinary Parasitology*.
- Torgerson, P.R., Macpherson, C.N.L., 2011. The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: Global trends. *Veterinary Parasitology* 182, 79–95.
- Travaillé, E., La Carbona, S., Gargala, G., Aubert, D., Guyot, K., Dumètre, A., Villena, I., Houssin, M., 2016. Development of a qRT-PCR method to assess the viability of *Giardia intestinalis* cysts, *Cryptosporidium* spp. and *Toxoplasma gondii* oocysts. *Food Control* 59, 359–365.

- Traversa, D., di Regalbono, A.F., Di Cesare, A., La Torre, F., Drake, J., Pietrobelli, M., 2014. Environmental contamination by canine geohelminths. *Parasites & vectors* 7, 67.
- Umhang, G., Forin-Wiart, M.-A., Hormaz, V., Caillot, C., Boucher, J.-M., Poulle, M.-L., Franck, B., 2015. *Echinococcus multilocularis* detection in the intestines and feces of free-ranging domestic cats (*Felis s. catus*) and European wildcats (*Felis s. silvestris*) from northeastern France. *Veterinary Parasitology* 214, 75–79.
- Umhang, G., Raton, V., Comte, S., Hormaz, V., Boucher, J.-M., Combes, B., Boué, F., 2012. *Echinococcus multilocularis* in dogs from two French endemic areas: No evidence of infection but hazardous deworming practices. *Veterinary Parasitology* 188, 301–305.
- Umhang G., Bastien M., Renault C., Faisse M., Caillot C., Boucher J.-M., Hormaz V., Poulle M.-L. and F. Boué. Development of a flotation/sieving method to detect *Echinococcus multilocularis* eggs by real-time PCR in soil samples. *Soumis à Parasites*.
- Veit, P., Bilger, B., Schad, V., Schäfer, J., Frank, W., Lucius, R., 1995. Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasitology* 110, 79–86.

Tableau IV.C.1 : Distribution des 50 potagers échantillonnés en fonction de la présence/absence de fèces, de l'espèce (ou des espèces) émettrice(s) des fèces et des résultats de la détection de l'ADN d'*E. multilocularis* et *Toxocara* sp. dans les cinq échantillons de sol prélevés par potager.

Nombre de Potagers	Sans fèces	Avec uniquement fèces			renard et chat	Avec fèces		Total
		chat	renard	chien		chien et chat	Chien, chat et renard	
Avec sol négatif	7	4	1	0	8	0	6	26
Avec sol positif <i>E. multilocularis</i>	4	6	2	2	3	1	3	21
Avec sol positif <i>Toxocara</i> spp.	0	2	0	1	3	0	0	6
Avec sol positif <i>E. multilocularis</i> et <i>Toxocara</i> spp.	0	1	0	1	1	0	0	3

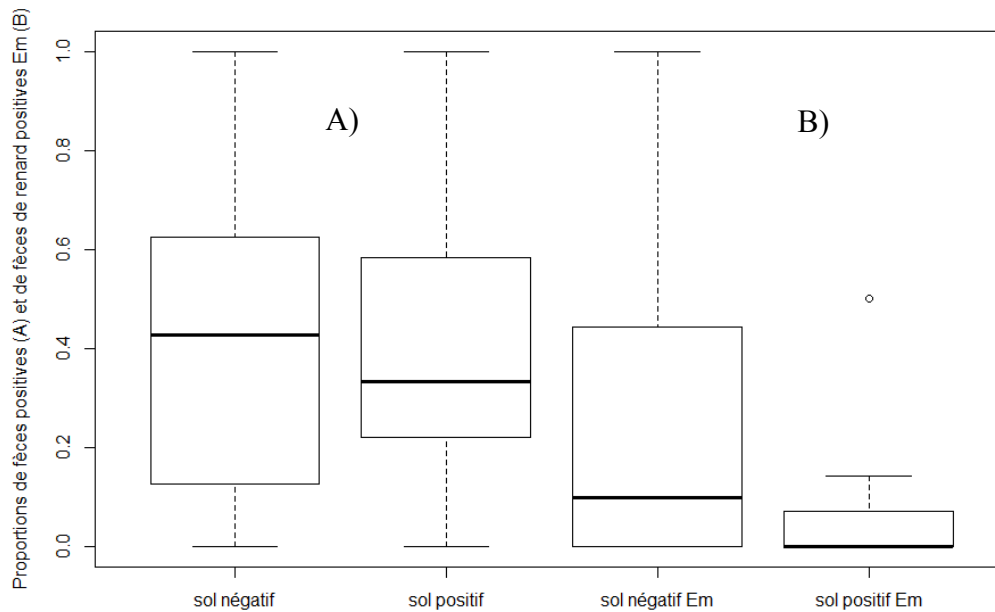


Figure IV.C.1 : Proportions de fèces positives dans les potagers dans lesquels les cinq échantillons de sols étaient négatifs et dans les potagers dans lesquels au moins un des cinq échantillons de sol était positif. (A) par rapport à la détection d'*E. multilocularis* ou *Toxocara* sp. dans toutes les fèces (quel que soit l'émetteur) et dans le sol. (B) par rapport aux fèces de renard positives pour la détection d'*E. multilocularis* (Em) et à la détection de ce parasite dans le sol.

LE CERFE DE BOULT-AUX-BOIS PARTICIPE À UNE ÉTUDE SUR LE SUJET Comment éviter que les fruits et légumes du potager soient contaminés par les parasites des chats, chiens et renards ?

Les chats, chiens et renards peuvent être porteurs de parasites intestinaux dont les œufs sont déposés au sol avec les crottes des animaux parasités. Invisibles à l'œil nu, ces œufs de parasite sont très résistants. Ils peuvent persister sur le sol ou les végétaux longtemps après que la crotte ait disparu. Leur ingestion accidentelle, par exemple en mangeant crus des baies, fraises, pissenlits ou légumes sur lesquels ces œufs auraient été déposés, peut provoquer des zoonoses (maladies transmissibles entre animaux et humains). La présence de crottes de chats, chiens ou renards dans les terrains maraîchers peut donc entraîner un risque d'infestation pour le consommateur. La plus rare, mais aussi la plus grave des zoonoses concernées, est l'échinococcose alvéolaire (appelée aussi « maladie du renard », mais qui peut également être transmise par le chien). Le parasite qui en est responsable est présent dans de nombreux départements français, dont les Ardennes.

Le CERFE, centre de recherche basé à Boult-aux-Bois, en collaboration avec le labora-



L'étude est en cours dans les Ardennes et en Moselle.

toire de Parasitologie de l'Université de Reims, l'Entente de Lutte Interdépartementale contre les Zoonoses (ELIZ), l'Unité de Surveillance Eco-épidémiologie des Animaux Sauvages de Nancy (ANSES) et le Centre de Recherche et d'Observation sur les Carnivores (CROC) conduit une étude d'envergure pour caractériser et prévenir le risque de zoonoses lié à la contamination parasitaire des terrains maraîchers. Depuis février 2014, 200 potagers, répartis sur 9 villages des Ardennes et 10 villages de Moselle, ont été prospectés à six reprises. Plus de 700 crottes de carnivores y ont été collectées. La moitié d'entre elles sont de chats, 30 % sont de renards

et 20 % de chiens. La répartition de ces crottes dans les potagers indique, d'une part, qu'une majorité d'entre eux sont régulièrement fréquentés par les chats et, d'autre part, que de nombreux potagers non clôturés sont régulièrement fréquentés par les renards et les chiens. De plus, les résultats des analyses de biologie moléculaire montrent que près de la moitié des crottes collectées étaient porteuses d'œufs de parasites. Ils mettent également en évidence la présence du parasite responsable de l'échinococcose alvéolaire dans des potagers non clôturés.

Cette étude va se poursuivre jusqu'à la fin 2016 pour compléter ces premiers résultats. Quatre nouvelles sessions de prospection sont encore prévues au cours de l'hiver 2015-2016... ■

**Matthieu BASTIEN
et Marie-Lazarine POULLE
CERFE - tél. 03 24 71 16 07**

Infos sur l'échinococcose alvéolaire :
> anes.fr/fr/content/bulletin-echinote
> e-l-i-z.com



Conseils pratiques

Quelques mesures de précaution relativement simples peuvent être mises en place pour réduire le risque de contamination :

1. Se laver soigneusement les mains après avoir été en contact avec la terre et avant de passer à table ou de porter les mains à la bouche. Faire de même après avoir été en contact avec un chat ou un chien ou après avoir touché un cadavre de renard ;
2. Si possible, clôturer le potager pour le rendre inaccessible aux chiens et aux renards ;
3. Au minimum, clôturer la partie réservée à la culture de fraises, salades et herbes aromatiques ;
4. Faire cuire les fruits et légumes provenant de terrains maraîchers facilement accessibles aux chiens et aux chats (une cuisson, même modérée, suffit pour tuer les œufs de parasites). Au minimum, nettoyer soigneusement sous l'eau courante les fruits et légumes consommés crus pour diminuer le risque ;
5. Administrer quatre fois par an aux chats et chiens un vermifuge contenant du praziquantel (seule molécule efficace contre le parasite responsable de l'échinococcose). Ce type de vermifuge est disponible chez les vétérinaires.
6. Ne pas laisser les chats et chiens déféquer dans le potager. Ne pas épandre la litière des chats dans le potager.

Figure IV.C.2 : Information diffusée en avril 2015 dans le bulletin de la Communauté de communes de l'Argonne Ardennaise, qui regroupe cent communes du sud-est des Ardennes, dont la plupart de celles dans lesquelles des potagers ont été échantillonnés.

V. DISCUSSION GENERALE

A. Estimation du risque d'exposition lié à la contamination parasitaire des potagers

La complexité des cycles de vie des parasites transmissibles par l'alimentation rend difficile l'étude des facteurs impliqués dans la contamination humaine ainsi que l'identification, la prévention et le contrôle des risques associés, d'autant plus que, comme expliqué précédemment, la surveillance des maladies parasitaires est souvent compliquée par les temps d'incubation généralement longs, la nature diffuse des signes cliniques et une méconnaissance de certains symptômes. Le Code Alimentaire (*Codex Alimentarius*), créé par la commission conjointe de l'organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'organisation mondiale de la santé (OMS) en 1963 pour mettre au point des normes alimentaires internationales harmonisées, destinées à protéger la santé des consommateurs et à promouvoir des pratiques loyales en matière de commerce de denrées alimentaires, définit l'analyse du danger des pathogènes lié à l'alimentation comme étant « un processus scientifique regroupant quatre éléments » (WHO, 2003) :

- L'identification du danger : est un processus qualitatif ayant pour objectif l'identification du pathogène et les sources de contamination possibles.
- L'estimation de l'exposition : permet de donner une estimation de l'occurrence et du niveau de contamination de la source de contamination concernée.
- La caractérisation du danger : donne une description des effets résultant de l'ingestion des micro-organismes, sur la santé humaine.
- La caractérisation du risque : est l'association des trois étapes précédentes aboutissant à une estimation de la probabilité et de la sévérité des effets de l'ingestion d'un pathogène dans une population donnée.

Dans le cas de la toxocarose, de l'échinococcose alvéolaire ou de la toxoplasmose, les études sur l'identification et la caractérisation du danger ont déjà permis de mettre en évidence que *Toxocara* spp., *E. multilocularis* et *T. gondii* étaient les agents responsables de ces zoonoses et que leur forme environnementale était la source principale de contamination humaine pour les deux premiers (Overgaauw et Nederland 2008, Eckert *et al.* 2011) et une source de plus en plus importante pour le troisième (Munoz-Zanzi *et al.* 2010). En revanche, très peu d'études sur l'estimation de l'exposition à ces parasites pour l'homme ont été réalisées.

Les fruits et légumes consommés crus et contaminés par les stades libres infectants des parasites, ont notamment été reconnus comme étant une source de contamination pour l'homme (Cook *et al.* 2000, Kern *et al.* 2004). En Europe, seules les études conduites en Pologne ont porté sur la contamination des lieux de culture de ces végétaux, par *T. gondii* (Lass *et al.* 2009), *Toxocara* spp. (Kłapeć and Borecka, 2012) et *E. multilocularis* (Szostakowska *et al.* 2014). Cette thèse apporte donc des éléments dans ce sens en termes de contamination passant par les fruits et légumes provenant de jardins potagers.

Les données collectées renseignent sur l'importance de la contamination des terrains maraichers par des parasites de carnivores, responsables de zoonoses. En effet, dans notre zone d'étude, nous avons mis en évidence la présence des trois parasites, *E. multilocularis*, *Toxocara* spp. et *T. gondii* dans les différents compartiments impliqués dans la réalisation de leur cycle épidémiologique : les fèces des hôtes définitifs collectées dans les jardins potagers, les hôtes intermédiaires présents dans ces jardins et le sol de ces jardins.

Dans les Ardennes, les jardins potagers familiaux se sont révélés être des lieux de dépôt non négligeables de fèces de carnivores contenant les parasites responsables des trois zoonoses (Pouille *et al.* soumis). Nous avons notamment montré que la densité de fèces de renard dans les potagers peut être équivalente à ce que l'on peut retrouver au niveau des lisières et bordures, connues pour être les lieux préférentiels de défécation pour les renards (Bastien *et al.* soumis). De même, la densité de fèces de chat peut être vingt fois plus élevée dans les potagers que hors potagers (Bastien *et al.* soumis). En nous intéressant ensuite à la contamination des rongeurs présents à proximité et à distance des potagers, nous avons vérifié que les densités élevées de fèces de renard et chat estimées dans les potagers étaient bien associées à un fort risque d'exposition des hôtes intermédiaires (Bastien *et al.* soumis). Ainsi, la présence, dans les jardins potagers de rongeurs contaminés par *E. multilocularis* et/ou présentant des anticorps dirigés contre *T. gondii* nous a permis de montrer que le risque de contamination des hôtes intermédiaires était bien présent. Ces résultats confirment donc les études épidémiologiques qui ont identifié le fait d'entretenir un potager comme étant à risque de contamination par les parasites responsables de zoonoses. Cependant, nous avons évalué le risque d'exposition aux parasites en collectant des fèces de chat, chien et renard en hiver uniquement, lorsque le potager n'est pas en période de culture car il aurait été difficile (voire impossible) d'obtenir des jardiniers l'autorisation de parcourir leur potager en tous sens en période de culture et de récolte, de crainte que nous écrasions les semis et végétaux. Le type d'échantillonnage que nous avons conduit peut permettre d'étudier les variations d'une année sur l'autre ou d'un lieu à l'autre

mais ne permet pas d'avoir des informations sur les variations saisonnières du risque d'exposition. Celui-ci pourrait varier au cours des saisons comme le suggère une étude conduite en Argentine et dans laquelle la proportion de sols positifs était plus importante au printemps et à l'automne qu'en été et hiver (Thevenet *et al.* 2004). Pour évaluer plus précisément le risque d'exposition aux parasites transmis par les carnivores dans les jardins potagers, il serait intéressant de reproduire l'étude sur toute l'année afin de prendre en compte les variabilités liées surtout à la survie des œufs ou oocystes mais il faudrait pouvoir garantir aux jardiniers que l'échantillonnage ne perturbera pas le maraichage. De même, la variation saisonnière des prévalences des hôtes intermédiaires pourrait être prise en compte afin de déterminer des périodes de contamination plus à risque que d'autres. En effet, si les carnivores fréquentent principalement les potagers en hiver où les terrains sont moins fréquentés par l'homme, du fait de l'accumulation du dépôt de fèces, l'exposition aux parasites pour l'homme pourrait être plus importante au printemps qu'à l'automne. Contrairement à la prospection des potagers, le piégeage des rongeurs à proximité des cultures peut être envisagé en période de maraichage car il n'implique pas de risque de piétinement et, par ailleurs, les jardiniers sont généralement très favorables à la pose de pièges susceptibles de limiter le nombre de rongeurs qui s'attaquent à leur récolte.

Pour comparer la densité de fèces de chat et renard, nous avons utilisé des données issues d'études antérieures conduites à différentes périodes. Nous avons cherché à limiter le biais lié à une possible variabilité interannuelle de la densité de renards en prenant en compte le nombre de renards chassés par hiver dans la zone d'étude, qui s'est avéré peu variable. Il aurait cependant été préférable de collecter les fèces dans et hors potagers au cours de la même période et de comparer la collecte dans les potagers à celle effectuée le long de transects parcourus sur tous les chemins des mêmes villages. Cette collecte de données n'a pas été possible, par manque de temps et de moyens matériels, dans le cadre de cette thèse mais pourrait être envisagée pour confirmer les résultats que nous avons trouvés concernant les densités de fèces dans et hors potagers.

B. Hétérogénéité du risque d'exposition

L'étude que nous avons conduite a montré que le dépôt de fèces par les carnivores est très hétérogène dans les potagers, puisque 75% des fèces ont été collectées dans moins de 25% des potagers échantillonnés (Pouille *et al.* soumis). Nous avons également mis en évidence que la distribution de fèces contenant de l'ADN de parasites est également très hétérogène à l'échelle régionale puisque les fèces positives pour *E. multilocularis* ont semblé être concentrées au Sud-Est de chacun des deux départements étudiés. De plus, nous avons mis en évidence une auto-corrélation spatiale significative entre les fèces positives pour la présence d'ADN d'*E. multilocularis* trouvées dans les potagers distants de moins de 500m. Ce résultat nourrit l'hypothèse selon laquelle un même renard contaminé pourrait déposer plusieurs fèces contenant la forme libre du cestode, dans un même potager ou dans différents potagers d'un même village.

Lorsque l'on s'intéresse au dépôt de parasites dans l'environnement, estimé par le dépôt de fèces de carnivores, il serait utile de connaître la part de fèces déposées par le même individu. En effet, si un même individu visite régulièrement un même potager au cours de sa vie, la probabilité pour qu'il y dépose une crotte à un moment où il excrète les œufs du parasite est plus élevée que pour un individu qui visite un potager de manière occasionnelle. Les progrès constants dans le domaine de la génétique, et notamment sur le génotypage des individus, devrait permettre de répondre à ces questions. En effet, bien qu'elle n'ait pas encore été développée chez le renard, la reconnaissance individuelle des producteurs de fèces collectées sur le terrain a été développée pour plusieurs espèces de félinés (revue dans Rodgers et Janecka 2013) et de canidés, comme chez les coyotes (Kohn *et al.* 1999, Fedriani et Kohn 2001) ou chez le loup (Creel *et al.* 2003).

C. Facteurs expliquant la présence de fèces de carnivores dans les terrains potagers.

Les données collectées au cours de cette thèse nous ont permis de mettre en évidence des facteurs expliquant la présence de fèces de renard, de chat et de chien dans les potagers. Nous avons caractérisé chacun des potagers par leur superficie et trois groupes de variables :

l'accessibilité, les potentielles ressources et le paysage. L'accès au potager a été défini selon 3 critères : présence d'une clôture continue autour du potager ou de la propriété (clos), absence de toute clôture (ouvert) ou présence d'une clôture discontinue (semi-ouvert). Les densités de fèces collectées ont été comparées entre ces types de clôture. Ensuite, toutes les autres variables ont été incrémentées dans un modèle généralisé à effet mixte (GLMM) afin d'expliquer la présence de fèces de chat dans tous les potagers et celle de fèces de renards dans les potagers non clos.

Nous avons montré que la présence de fèces de renard dans les potagers n'était pas anecdotique puisque ces fèces représentent plus de 30% du nombre total de fèces collectées. Cependant, l'accès aux potagers pour les renards semble limité aux terrains non clôturés. En effet, nous n'avons trouvé que très peu de fèces de renard dans les potagers entourés par une clôture continue sur au moins 1,20m de hauteur. Dans quatre cas sur les cinq où nous avons collecté une crotte de renard dans ce type de potager, nous y avons observé un trou creusé sous la clôture ou une porte restée ouverte.

Dans les potagers ouverts ou semi-ouverts, facilement accessibles aux canidés, nous avons cherché à identifier les facteurs qui pouvaient expliquer la présence de fèces de renard. La difficulté de cette analyse a été de trouver des facteurs homogènes entre chacun des potagers. En effet, chaque potager a une situation et une association de caractéristiques propre et beaucoup de variables ont donc été mesurées en présence/absence dans un rayon de 100m autour du potager pour construire un modèle statistique expliquant le nombre de fèces collectées. Ainsi, les potagers qui semblent attirer plus particulièrement les renards sont ceux autour desquels sont plantés plus de dix arbres fruitiers et ceux dans lesquels des indices de présence d'*A. terrestris* ont été notés. En revanche, contrairement à ce que nous supposions, la présence de poulailler ou de tas de compost à proximité ne semble pas expliquer la présence de fèces de renard dans les potagers. Cette analyse pourrait être affinée en prenant en compte la distance du poulailler au potager ou en détaillant les caractéristiques du compost présent : est-il enterré ? S'agit-il d'un bac surélevé ouvert ? Contient-il uniquement des restes alimentaires ? Contient-il un mélange de restes alimentaires et de déjections animales ?

Près de 60% des fèces collectées dans les potagers étaient des fèces de chat, ce qui peut s'expliquer par la densité relativement élevée de chats (comparativement à celles de chiens et de renards), par leur attirance pour les sols meubles des potagers dans lesquels ils peuvent facilement enterrer leurs fèces et par leur facilité à franchir les clôtures qui fait que tous les

potagers leur sont accessibles. Notre analyse a mis en évidence que, contrairement à ce que nous avons observé pour les fèces de renard, la présence de fèces de chat dans les potagers n'était pas liée à la présence/absence de ressources alimentaires à proximité. Il est notamment intéressant de constater que, bien que les campagnols *A. terrestris* et *Microtus* sp. constituent les principales proies des chats sur notre terrain d'étude (Forin-Wiart 2014), les indices de leur présence ne constituent pas une variable explicative du nombre de fèces de chat trouvées dans les potagers, qui sont probablement uniquement utilisés comme lieux de défécation par les chats.

Détenir un chien a été identifié comme un facteur augmentant le risque de développer une échinococcose alvéolaire (Kern *et al.* 2004). Dans notre étude, l'ADN d'*E. multilocularis* n'a été détecté dans aucune des 100 fèces de chien collectées dans les potagers des Ardennes et de Moselle. Ce résultat peut sembler rassurant mais ne doit pas faire oublier qu'il suffit probablement d'un seul excrément contaminé pour contaminer un terrain. La prudence reste donc de mise, d'autant plus que nous avons constaté que certains propriétaires de chiens utilisent leur jardin clôturé (comprenant une partie pelouse, fleurs ornementales et une partie potager) comme enclos pour leur chien, sans se douter du fait que les excréments déposés par ce dernier dans la partie réservée à la culture des fruits et légumes peut être synonyme, pour eux, d'un risque d'exposition aux parasites.

D. Contamination du sol en lien avec la collecte de fèces.

Dans le dernier chapitre de cette thèse, après avoir mis au point une méthode sensible pour détecter les œufs d'*E. multilocularis* et de *Toxocara* spp. dans le sol (bien que moins sensible pour ce dernier), nous avons montré que le passage des œufs, de l'excrément à la terre se faisait relativement rapidement puisque la proportion de sols positifs sous les fèces ne différait pas selon que les fèces étaient fraîches ou anciennes. Ce résultat indique que, même en enlevant l'excrément rapidement après son dépôt comme préconisé par certaines études pour réduire la contamination par *Toxocara* spp. dans les parcs publics (Deplazes *et al.* 2011, Morgan *et al.* 2013), une partie des œufs est déjà passée dans le sol. Malgré le fait que cela puisse réduire la contamination du sol (Morgan *et al.* 2013), ce comportement ne permet donc pas de l'éviter complètement et il vaudrait donc mieux préconiser de prévenir tout dépôt de fèces contaminées

dans les potagers où l'homme pourrait avoir des contacts répétés avec le parasite présent et donc serait plus susceptible de se contaminer.

Nous avons montré que la présence d'au moins un échantillon de sol positif dans un potager n'était pas lié au nombre de fèces collectées dans les potagers, ce qui montre, une fois de plus, que seul le fait d'interdire complètement l'accès des renards et chiens au potager semble efficace pour prévenir la contamination des sols par leurs parasites (interdire l'accès des potagers aux chats serait également très souhaitable mais difficile, voire impossible, à réaliser). L'accumulation des dépôts de parasites sur le sol des potagers et la persistance des œufs dans l'environnement peut expliquer le fait que nous ayons trouvé des échantillons de sol positifs dans des potagers dans lesquels nous n'avons pourtant trouvé aucun excrément de carnivores lors de nos huit prospections conduites au cours de deux hivers successifs. Les mécanismes d'accumulation de fèces, de survie des œufs de parasite et de leur possible dispersion n'ont pas été directement analysés dans cette étude mais ils participent à l'explication de la fréquence et de la distribution spatiale de la contamination des sols observées dans les potagers échantillonnés dans les Ardennes. Le climat dans cette région est caractérisé par des précipitations importantes (entre 900 et 1000mm d'eau à l'année répartis de façon homogène au cours des mois ; source : www.meteofrance.com) et des températures annuelles moyennes autour de 10°C (source : www.meteofrance.com), soient des conditions climatiques favorables à la survie des œufs d'*E. multilocularis* et des oocystes de *T. gondii* (Veit *et al.* 1995, Lélou *et al.* 2010). De plus, pendant l'été, période de l'année la moins favorable à la survie de ces œufs ou oocystes du fait de la plus faible pluviométrie et des températures plus élevées, le sol des jardins potagers est régulièrement arrosé pour maintenir un taux d'humidité suffisant pour la croissance et la survie des végétaux. La survie des œufs ou oocystes y serait donc particulièrement favorisée.

La mise au point de la détection des œufs d'*E. multilocularis* et *Toxocara* spp. ouvre des perspectives intéressantes en termes de compréhension des mécanismes à l'origine du dépôt et de la persistance des œufs des parasites dans le sol ainsi que pour l'étude des variations saisonnières de la contamination. Nous avons ainsi pu montrer que la proportion de sol positifs pour *E. multilocularis* était élevée en janvier au moment de la collecte (42% de potagers positifs). Il serait intéressant d'analyser cette contamination du sol à différentes périodes de l'année pour avoir une indication supplémentaire sur le dépôt des parasites. En effet, si le dépôt de fèces est plus important en hiver, comme supposé du fait de la moindre activité humaine, la contamination des sols des potagers devrait être plus importante au printemps qu'aux autres

périodes de l'année. De plus, une analyse régulière de cette contamination des sols permettrait d'estimer plus précisément la quantité de parasite déposée par unité de temps et donc d'affiner notre estimation de l'exposition aux parasites dans les terrains maraîchers pour l'homme.

E. Prévention de la contamination parasitaire des potagers

La prévention des parasitoses nécessite de travailler sur toutes les phases du cycle de transmission qui peut conduire à la contamination humaine, hôte accidentel du parasite. Il faut donc s'intéresser à l'écologie et au comportement des hôtes, aux conditions environnementales qui influent sur la survie du stade libre mais aussi au comportement humain qui module en grande partie le risque d'exposition (Macpherson 2005). Au cours de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur un compartiment du cycle : les œufs ou oocystes répandus dans l'environnement avec les fèces des hôtes définitifs. Nous avons essayé de caractériser les circonstances qui conduisent à la contamination parasitaire du sol qui sert de réservoir aux parasites. Les données que nous avons collectées indiquent clairement qu'il faut autant que possible interdire totalement l'accès des terrains potagers aux carnivores pour prévenir la contamination de ces terrains qui sont des lieux à risque d'exposition humaine. Cette mesure n'est cependant pas toujours aisée à mettre en pratique et il est donc nécessaire d'envisager des mesures de prévention alternatives ou complémentaires, en s'inspirant et en adaptant les options de contrôle et de prévention de l'échinococcose alvéolaire proposées par Hegglin et Deplazes (2013), telles que présentées dans la figure V.1.

La vermifugation des populations sauvages d'hôtes définitifs contre *E. multilocularis* a été expérimentalement conduite à relativement grande échelle par des campagnes de distribution d'appâts contenant 50mg de praziquantel. Ce type de campagne a conduit à une réduction significative de la prévalence du parasite dans les populations de renards roux au Japon (Tsukada *et al.* 2002), en Allemagne (Tackmann *et al.* 2001, Romig *et al.* 2007), en Slovaquie (Antolova *et al.* 2006) et en Suisse (Hegglin *et al.* 2003). De plus, ce type de campagnes de vermifugation localisées sur des petits espaces à risque serait plus applicables et moins coûteuses que les campagnes conduites à large échelle (Hegglin et Deplazes 2013). Ainsi, on peut se demander s'il ne serait pas envisageable, dans les zones d'endémies d'*E. multilocularis*, de tester le dépôt régulier d'appâts contenant du praziquantel au pourtour des potagers potentiellement fréquentés par les renards (potagers non clôturés, et notamment ceux proches de vergers et où des indices de présence d'*A. terrestris* sont relevés) pour réduire la

contamination des renards les fréquentant et ainsi réduire le dépôt d'œufs de ce parasite. Par ailleurs, en zone d'endémie, la vermifugation régulière des chiens contre *E. multilocularis* est à encourager vivement (Deplazes *et al.* 2011), et mérite d'être couplée avec la vermifugation contre *Toxocara* spp. La forte proportion de fèces de chat positives pour la détection de *Toxocara* spp. que nous avons constatée au cours de l'étude confirme que peu d'entre eux sont vermifugés. Cependant, la difficulté de prévention de la contamination des chats, en milieu rural, vient de la part importante de chats dits « errants », n'ayant pas ou que peu de contacts avec l'homme et n'étant donc pas vermifugés.

Le contrôle des populations de renards par prélèvement direct d'individus (intensification chasse, piégeage ou campagnes ciblées de tirs de nuit) autrefois parfois évoquée comme mesure possible de prévention de la contamination environnementale par *E. multilocularis*, voit aujourd'hui son efficacité remise en cause par des travaux de modélisation (Quintaine 2010) et, surtout, des expérimentations conduites sur le terrain (Conte *et al.* soumis) qui montrent que des efforts de réduction de la densité de population de renards n'entraînent pas de réduction de la prévalence dans les populations régulées. De même, si la prévalence d'*E. multilocularis* dans les populations de renards varie en fonction de la disponibilité de campagnols terrestres, hôte intermédiaire du parasite (Raoul *et al.* 2010), il semble illusoire d'espérer contrôler la population de renards en réduisant les ressources alimentaires. En revanche, les résultats de cette étude montrent qu'il est envisageable et recommandé de limiter la disponibilité ou l'accessibilité à ces ressources à proximité des potagers pour réduire le nombre de renards qui les fréquentent, notamment en effectuant un piégeage de campagnols terrestres en début de printemps, afin de limiter au maximum le nombre de reproducteurs. Il devrait être facile d'encourager les jardiniers à ce type de piégeage (surtout si des aides techniques ou financières leur sont proposées) car les campagnols terrestres sont leur « bête noire » du fait des dommages qu'ils occasionnent aux tubercules et racines d'arbres fruitiers.

Le contrôle des populations d'hôtes intermédiaires n'est pas envisageable à grande échelle mais l'est à l'échelle du potager par le piégeage des campagnols, comme évoqué précédemment. De plus, il est également possible, à l'échelle du potager, d'agir sur l'habitat en nettoyant le potager des mauvaises herbes et en limitant les bordures herbeuses à proximité pour réduire la disponibilité de couvert propice aux campagnols (Guislain *et al.* 2008).

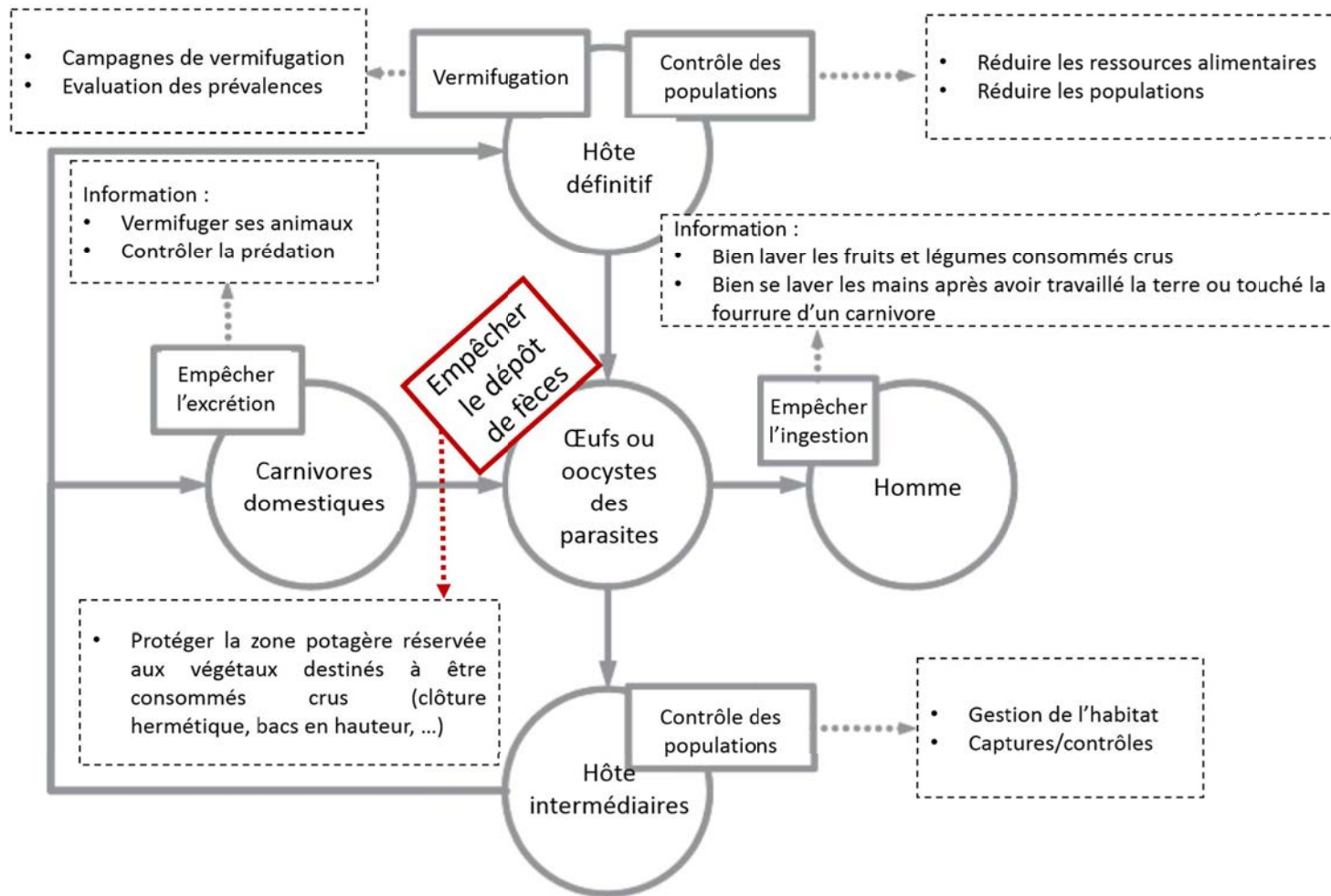


Figure V.1 : Représentation schématique des différentes options de contrôle et de prévention de l'échinococcose alvéolaire, adaptée de Hegglin et Deplazes (2013) pour être applicables à la prévention de la contamination parasitaire des potagers. Les cercles gris représentent les différents compartiments impliqués dans le cycle de vie des parasites. Les rectangles en traits pleins représentent les différents niveaux d'intervention possibles et les rectangles en pointillés représentent les actions possibles.

Prévenir l'ingestion accidentelle des œufs ou oocystes est une mesure très importante. Des mesures d'hygiène simples à mettre en œuvre sont à préconiser au travers de campagnes d'information ciblées : se laver les mains après contact avec le sol et avant de porter les doigts à la bouche, faire cuire les fruits et légumes en contact avec le sol ou laver soigneusement ceux destinés à être consommés crus (Eckert *et al.* 2011).

Protéger de la contamination les terrains destinés à la culture de végétaux consommés crus semble, enfin, une mesure de prévention importante qui, jusqu'à présent, avait été peu étudiée dans la littérature. L'efficacité de la pose d'une clôture pour réduire la contamination du sol par *Toxocara* spp. a été mise en évidence par Blaszkowska *et al.* (2015) qui ont montré que la contamination des aires de jeux encloses est moins importante, bien que non nulle, que celle des aires de jeux non clôturées. De plus, dans cette étude, la contamination des aires de jeux encloses est supposée résulter de leur fréquentation par les chats, la distinction entre *Toxocara canis* et *Toxocara cati* n'ayant pas été faite. De notre côté, nous montrons également qu'une clôture autour du potager limite drastiquement le dépôt de fèces de renard. Nous avons également confirmé que les clôtures n'arrêtent pas les chats mais la pose de grillage au-dessus des portions de potagers réservées aux cultures les plus à risque d'exposition humaine (fraises, salades, herbes aromatiques) peut les empêcher de déféquer dans ces secteurs. La découverte de terre contaminée par les œufs d'*E. multilocularis* dans les potagers enclos indique une contamination possible avant l'installation de la clôture ou une source de contamination autre que par le dépôt de fèces de renard. Le dépôt de fèces de chat pourrait être mis en cause, les récents travaux de Knapp *et al.* (2016) ayant mis en évidence la présence possible d'œufs d'*E. multilocularis* dans ces fèces.

VI. Conclusion et perspectives de l'étude

Les travaux conduits dans le cadre de cette thèse ont permis d'identifier les potagers familiaux et terrains maraichers professionnels du nord-est de la France comme des lieux à risque d'exposition humaine à *E. multilocularis*, *T. gondii* et *Toxocara* spp. L'analyse du dépôt de fèces par les carnivores et de la présence des parasites dans ces fèces et dans le sol nous a permis de proposer les mesures de prévention suivante :

- Clôturer le potager et/ou clôturer ou couvrir les parties du potager réservées pour la culture de fruits et légumes destinés à être mangés crus et vérifier régulièrement qu'il n'y ait pas de trous ou une porte restée ouverte, d'autant plus si le potager est entouré d'arbres fruitiers.
- Empêcher l'accès au potager pour le chien de la maison, même s'il est régulièrement vermifugé.
- Contrôler et réduire un maximum les populations d'*A. terrestris* dans les potagers.
- Eventuellement, envisager la pose régulière d'appâts contenant un vermifuge efficace contre *E. multilocularis* autour du potager.

Cependant, maintenant que ces mesures ont été identifiées, encore faut-il faire accepter les changements de comportement que nécessite leur mise en place par les acteurs des terrains maraichers. Or les jardiniers, comme le reste de la population, sont aujourd'hui submergés par des messages de prévention sanitaire, au point parfois de ne plus savoir quoi faire. Parallèlement, les producteurs subissent un nombre croissant de normes environnementales à respecter et nombre d'entre eux les considèrent comme des contraintes engendrant des coûts supplémentaires à supporter. Il s'agit donc à présent de pouvoir communiquer efficacement sur ces mesures de prévention. Pour ce faire, quatre éléments clefs conditionnent la transmission réussie d'un message à une population cible : le contenu du message qui doit être clair et explicite (Phillips *et al.* 2004, Zald *et al.* 2005), le porteur du message, qui doit être considéré comme légitime (Rao 1994, Hoffman & Ocasio 2001), les canaux de diffusion du message, qui doivent être utilisés par la population cible et, enfin, la cible du message elle-même, qui peut décider d'intégrer le message diffusé, de l'ignorer ou de le déformer (Oliver 1991). Ces éléments ont été intégrés dans le cadre d'une enquête conduite par l'Entente de Lutte Interdépartementale contre les Zoonoses, en partenariat avec le laboratoire REGARDS de l'Université de Reims Champagne Ardenne (Brulé-Gapihan *et al.*, en prep) et préparatoire à la mise en place de campagnes d'information ciblées qui devraient avoir lieu dans les Ardennes et la Moselle, où ont été conduits les travaux de cette thèse.

Cette dernière amène plusieurs questions concernant le risque d'exposition humaine lié à la contamination parasitaire des potagers. En effet, l'analyse des échantillons de sol a révélé que la détection ou non de parasite dans les potagers n'était pas fonction de la présence/absence de fèces dans ces potagers lors de nos prospections. Comme discuté précédemment, cette différence peut venir du fait que la collecte des fèces en hiver uniquement ne nous a pas permis d'estimer le dépôt de fèces réel sur l'ensemble de l'année. Cependant, ce résultat pose aussi des questions concernant la persistance et la dispersion des œufs des parasites. Pour les trois parasites, il serait intéressant de disposer de données concernant le délai entre le dépôt d'une crotte contaminée et l'absence de détection du parasite concerné dans le sol contaminé par ces fèces pour différentes conditions d'humidité du sol. Ce résultat nous permettrait d'affiner notre mesure de prévention relative à la clôture d'un potager en précisant le temps nécessaire depuis le moment où il est clôturé, jusqu'à celui où il serait possible de cultiver les premiers fruits et légumes destinés à être consommés crus, sans risque d'exposition au parasite. A l'aide de la méthode sensible de détection des œufs d'*E. multilocularis*, il devrait être possible de collecter cette information sur quelques potagers témoins en mesurant leur contamination à l'instant t_0 , qui correspondrait à la mise en place de la clôture, puis en mesurant cette contamination à différents temps après l'installation de la clôture jusqu'à ne plus détecter de contamination.

Par ailleurs, il serait également intéressant, toujours dans une optique de prévention, de disposer de données sur la possibilité de dispersion à distance des œufs d'*E. multilocularis*, actuellement non documentée. Bien que plus lourds que les oocystes de *T. gondii*, il est possible qu'ils soient disséminés depuis un point source comme cela a été montré pour ce protozoaire pour lequel les oocystes accumulés dans la neige au cours de l'hiver peuvent se retrouver entraînés des écosystèmes terrestres vers les écosystèmes aquatiques au moment du dégel (Simon *et al.* 2013). Les œufs d'*E. multilocularis* sont peut-être également déplacés s'ils sont présents sur les roues des engins agricoles ou sous les bottes des jardiniers. Il serait donc intéressant de pouvoir évaluer les sources et les distances possibles de dispersion de ces formes environnementales des parasites responsables de zoonoses.

Enfin, la suite de cette thèse serait logiquement d'évaluer la contamination directement des végétaux, comme les salades ou les fraises, présents dans les potagers contenant du sol contaminé. Quelques techniques ont déjà été développées pour permettre de détecter la présence d'œufs ou oocystes sur les végétaux (Kłapeć and Borecka 2012, Lass *et al.* 2012, Federer *et al.* 2016). Ces techniques pourraient donc être mises en application dans les terrains potagers de notre zone d'étude afin d'évaluer la part de végétaux contaminés et mettre ce résultat en relation

avec le niveau de contamination des sols. De plus, les techniques utilisées requièrent un complément d'analyse quant à la viabilité des œufs ou oocystes. Le modèle murin est souvent utilisé pour ce type d'analyses (Lélu *et al.* 2012, Federer *et al.* 2015). Il pourrait être envisagé de développer des méthodes moins lourdes et plus rapides comme la détection d'ARNm déjà développée par Travaillé *et al.* (2016) pour les cystes de *Giardia intestinalis* et les oocystes de *Cryptosporidium* spp. et *T. gondii*.

Les fruits et légumes consommés crus sont une source de contamination par les trois parasites étudiés au cours de cette thèse, de plus en plus reconnue. Cependant, jusqu'à aujourd'hui, très peu d'études se sont intéressées à la contamination de ces végétaux avant récolte. Les axes de recherche développés au cours de cette étude constituent autant de pistes prometteuses quant à la compréhension des circonstances de la contamination parasitaire des potagers comme source d'exposition humaine et au développement des mesures de prévention de ce risque d'exposition.

VII. Références bibliographiques

- Åberg, R., Sjöman, M., Hemminki, K., Pirnes, A., Räsänen, S., Kalanti, A., Pohjanvirta, T., Caccio, S.M., Pihlajasaari, A., Toikkanen, S., 2015. *Cryptosporidium parvum* caused a large outbreak linked to frisée salad in Finland, 2012. *Zoonoses and Public Health* 62, 618–624.
- Abougrain, A.K., Nahaisi, M.H., Madi, N.S., Saied, M.M., Ghenghesh, K.S., 2010. Parasitological contamination in salad vegetables in Tripoli-Libya. *Food control* 21, 760–762.
- Afonso, E., Germain, E., Poulle, M.-L., Ruelle, S., Devillard, S., Say, L., Villena, I., Aubert, D., Gilot-Fromont, E., 2013. Environmental determinants of spatial and temporal variations in the transmission of *Toxoplasma gondii* in its definitive hosts. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 2, 278–285.
- Afonso, E., Lemoine, M., Poulle, M.-L., Ravat, M.-C., Romand, S., Thulliez, P., Villena, I., Aubert, D., Rabilloud, M., Riche, B., Gilot-Fromont, E., 2008. Spatial distribution of soil contamination by *Toxoplasma gondii* in relation to cat defecation behaviour in an urban area. *International Journal for Parasitology* 38, 1017–1023.
- Alum, A., Rubino, J.R., Ijaz, M.K., 2010. The global war against intestinal parasites—should we use a holistic approach? *International Journal of Infectious Diseases* 14, e732–e738.
- Alvarado-Esquivel, C., Estrada-Martínez, S., Liesenfeld, O., 2011. *Toxoplasma gondii* infection in workers occupationally exposed to unwashed raw fruits and vegetables: a case control seroprevalence study. *Parasit Vectors* 4, 235.
- Ammar, A.S., Omar, H.M., 2013. The prevalence of leafy vegetable-borne parasites in Al-Qassim Region, Saudi Arabia. *Journal of Agricultural and Veterinary Sciences* 6.
- Amoah, P., Drechsel, P., Henseler, M., Abaidoo, R.C., 2007. Irrigated urban vegetable production in Ghana: microbiological contamination in farms and markets and associated consumer risk groups. *Journal of Water and Health* 5, 455.
- Antolova, D., Miterpakova, M., Reiterova, K., Dubinský, P., 2006. Influence of anthelmintic baits on the occurrence of causative agents of helminthozoonoses in red foxes (*Vulpes vulpes*). *Helminthologia* 43, 226–231.
- Aubert, D., Villena, I., 2009. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne Region, France. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 290–295.
- Bastien M., Vaniscotte A., Combes B., Umhang G., Germain E., Gouley V., Pierlet A., Quintaine T., Forin-Wiart M-A., Villena I., Aubert D., Boué F. and M-L. Poulle. High

- density of fox and cat faeces in kitchen gardens and resulting rodent exposure to *Echinococcus multilocularis* and *Toxoplasma gondii*. Soumis à Folia Parasitologica.
- Beuchat, L.R., 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection* 4, 413–423.
- Błaszowska, J., Góralaska, K., Wójcik, A., Kurnatowski, P., Szwabe, K., 2015. Presence of *Toxocara* spp. eggs in children's recreation areas with varying degrees of access for animals. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 22, 23–27.
- Błaszowska, J., Kurnatowski, P., Damiecka, P., 2011. Contamination of the soil by eggs of geohelminths in rural areas of Lodz district (Poland). *Helminthologia* 48, 67–76.
- Boyer, K., Hill, D., Mui, E., Wroblewski, K., Karrison, T., Dubey, J.P., Sautter, M., Noble, A.G., Withers, S., Swisher, C., Heydemann, P., Hosten, T., Babiarz, J., Lee, D., Meier, P., McLeod, R., other members of the Toxoplasmosis Study Group, 2011. Unrecognized ingestion of *Toxoplasma gondii* oocysts leads to congenital toxoplasmosis and causes epidemics in North America. *Clinical Infectious Diseases* 53, 1081–1089.
- Bružinskaitė, R., Marcinkutė, A., Strupas, K., Sokolovas, V., Deplazes, P., Mathis, A., Eddi, C., Šarkūnas, M., 2007. Alveolar Echinococcosis, Lithuania. *Emerging Infectious Diseases* 13, 1618–1619.
- Bush, A.O. (Ed.), 2001. Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites. Cambridge University Press, Cambridge, UK ; New York, NY.
- Bussi eras, J., Chermette, R., 1992. Fascicule I: Parasitologie générale. Abr g  de parasitologie v t rinaire. Edition: Alfort.
- Capek, I., Vaillant, V., Mailles, A., De Valk, H., 2006. D finition de priorit s et actions réalisées dans le domaine des zoonoses non alimentaires, 2000-2005. *Bulletin Epid miologique Hebdomadaire* 27–28.
- Chomel, B.B., 2003. Control and prevention of emerging zoonoses. *Journal of Veterinary Medical Education* 30, 145–147.
- Collier, S.A., Stockman, L.J., Hicks, L.A., Garrison, L.E., Zhou, F.J., Beach, M.J., 2012. Direct healthcare costs of selected diseases primarily or partially transmitted by water. *Epidemiology and Infection* 140, 2003–2013.
- Combes, B., Comte, S., Raton, V., Raoul, F., Bou , F., Umhang, G., Favier, S., Dunoyer, C., Woronoff, N., Giraudoux, P., 2012. Westward spread of *Echinococcus multilocularis* in foxes, France, 2005–2010. *Emerging Infectious Diseases* 18, 2059–2062.
- Combes, C., 2001. Les associations du vivant : l'art d'être parasite, Flammarion. ed. Paris.
- Conraths, F.J., Deplazes, P., 2015. *Echinococcus multilocularis*: Epidemiology, surveillance and state-of-the-art diagnostics from a veterinary public health perspective. *Veterinary Parasitology* 213, 149–161.

- Cook, A.J.C., Holliman, R., Gilbert, R.E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P.A., Foulon, W., Semprini, A.E., Dunn, D.T., 2000. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *British Medical Journal* 321, 142–147.
- Conte, S., Umhang, G., Raton, V., Raoul, F., Giraudoux, P., Combes, B., Boué, F. *Echinococcus multilocularis* management by fox culling : an inappropriate paradigm. Soumis à *Journal of Preventive Medicine*.
- Craig, P., 2003. *Echinococcus multilocularis*. *Current Opinion in Infectious Diseases* 16, 437–444.
- Creel, S., Spong, G., Sands, J.L., Rotella, J., Zeigle, J., Joe, L., Murphy, K.M., Smith, D., 2003. Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. *Molecular Ecology* 12, 2003–2009.
- Dabritz, H.A., Conrad, P.A., 2010. Cats and *Toxoplasma* : implications for public health. *Zoonoses and Public Health* 57, 34–52.
- Depaquit, J., Gallego, A., Usseglio, F., Liance, M., Favriel, J.M., 1998. L'échinococcose alvéolaire dans le département français des Ardennes : cas isolés ou nouveau foyer ? *Parasite* 5, 285–287.
- Deplazes, P., van Knapen, F., Schweiger, A., Overgaauw, P.A.M., 2011. Role of pet dogs and cats in the transmission of helminthic zoonoses in Europe, with a focus on echinococcosis and toxocarosis. *Veterinary Parasitology* 182, 41–53.
- Despommier, D., 2003. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 265–272.
- Dixon, B.R., 2009. The role of livestock in the foodborne transmission of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. to humans. *Giardia and Cryptosporidium* from molecules to disease. Centre for Agricultural Bioscience International, Wallingford, UK 107–122.
- Dorny, P., Praet, N., Deckers, N., Gabriel, S., 2009. Emerging food-borne parasites. *Veterinary Parasitology* 163, 196–206.
- Dubey, J.P., 2010. *Toxoplasmosis of animals and humans*. CRC Press, Second.
- Dubey, J.P., Beattie, C.P., 1988. *Toxoplasmosis of animals and man*. CRC Press, Inc.
- Dubná, S., Langrová, I., Jankovská, I., Vadlejch, J., Pekár, S., Nápravník, J., Fechtner, J., 2007. Contamination of soil with *Toxocara* eggs in urban (Prague) and rural areas in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology* 144, 81–86.
- Eckert, J., Deplazes, P., Kern, P., 2011. Alveolar echinococcosis (*Echinococcus multilocularis*) and neotropical forms of Echinococcosis (*Echinococcus vogeli* and *Echinococcus oligarthrus*), in: *Oxford Textbook of Zoonoses Biology, Clinical Practice, and Public Health Control*. pp. 669–699.

- Eckert, J., Schantz, P.M., Gasser, R.B., Torgerson, P.R., Bessonov, A.S., Movsessian, S.O., Thakur, A., Grimm, F., Nikogossian, M.A., 2001. Geographic distribution and prevalence. WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: A Public Health Problem of Global Concern, 101–143.
- Eckert, J., Conraths, F.J., Tackmann, K., 2000. Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? *International Journal for Parasitology* 30, 1283–1294.
- Esch, K.J., Petersen, C.A., 2013. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clinical Microbiology Reviews* 26, 58–85.
- Fallah, A.A., Makhtumi, Y., Pirali-Kheirabadi, K., 2016. Seasonal study of parasitic contamination in fresh salad vegetables marketed in Shahrekord, Iran. *Food Control* 60, 538–542.
- Fallah, A.A., Pirali-Kheirabadi, K., Shirvani, F., Saei-Dehkordi, S.S., 2012. Prevalence of parasitic contamination in vegetables used for raw consumption in Shahrekord, Iran: Influence of season and washing procedure. *Food Control* 25, 617–620.
- Federer, K., Armua-Fernandez, M.T., Gori, F., Hoby, S., Wenker, C., Deplazes, P., 2016. Detection of taeniid (*Taenia* spp., *Echinococcus* spp.) eggs contaminating vegetables and fruits sold in European markets and the risk for metacestode infections in captive primates. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 5, 249–253.
- Federer, K., Armua-Fernandez, M.T., Hoby, S., Wenker, C., Deplazes, P., 2015. In vivo viability of *Echinococcus multilocularis* eggs in a rodent model after different thermo-treatments. *Experimental Parasitology* 154, 14–19.
- Fedriani, J.M., Kohn, M.H., 2001. Genotyping faeces links individuals to their diet. *Ecology Letters* 4, 477–483.
- Finerman, R., Sackett, R., 2003. Using home gardens to decipher health and healing in the Andes. *Medical Anthropology Quarterly* 17, 459–482.
- Fisher, M., 2003. *Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent. *Trends in Parasitology* 19, 167–170.
- Forin-Wiart, M.-A., 2014. Identification des facteurs de variation de la prédation exercée par les chats domestiques (*Felis silvestris catus*) en milieu rural. 268 pages. Thèse de doctorat : Université de Reims.
- Gawor, J., Borecka, A., Żarnowska, H., Marczyńska, M., Dobosz, S., 2008. Environmental and personal risk factors for toxocariasis in children with diagnosed disease in urban and rural areas of central Poland. *Veterinary Parasitology* 155, 217–222.
- Giraudoux, P., Delattre, P., Takahashi, K., Raoul, F., Quéré, J.P., Craig, P., Vuitton, D., Pawlowski, Z., 2002. Transmission ecology of *Echinococcus multilocularis* in wildlife: what can be learned from comparative studies and multiscale approaches?, in:

- Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on Cestode Zoonoses: Echinococcosis and Cysticercosis: An Emergent and Global Problem, Poznan, Poland, 10-13 September 2000. IOS Press, pp. 251–266.
- Gotteland, C., Chaval, Y., Villena, I., Galan, M., Geers, R., Aubert, D., Poulle, M.-L., Charbonnel, N., Gilot-Fromont, E., 2014. Species or local environment, what determines the infection of rodents by *Toxoplasma gondii*? *Parasitology* 141, 259–268.
- Graczyk, T.K., Knight, R., Tamang, L., 2005. Mechanical transmission of human protozoan parasites by insects. *Clinical Microbiology Reviews* 18, 128–132.
- Guerra, D., Hegglin, D., Bacciarini, L., Schnyder, M., Deplazes, P., 2014. Stability of the southern European border of *Echinococcus multilocularis* in the Alps: evidence that *Microtus arvalis* is a limiting factor. *Parasitology* 141, 1593–1602.
- Guillot, J., Bouree, P., 2007. Zoonotic worms from carnivorous pets: risk assessment and prevention. *Bulletin de l'Academie Nationale de Médecine* 191, 67-78-81.
- Guislain, M.-H., Raoul, F., Giraudoux, P., Terrier, M.-E., Froment, G., Ferte, H., Poulle, M.-L., 2008. Ecological and biological factors involved in the transmission of *Echinococcus multilocularis* in the French Ardennes. *Journal of Helminthology* 143–151.
- Guislain, M.H., Raoul, F., Poulle, M.L., Giraudoux, P., 2007. Fox faeces and vole distribution on a local range: ecological data in a parasitological perspective for *Echinococcus multilocularis*. *Parasite* 14, 299–308.
- Harris, L.J., Farber, J.N., Beuchat, L.R., Parish, M.E., Suslow, T.V., Garrett, E.H., Busta, F.F., 2003. Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2, 78–141.
- Hegglin, D., Deplazes, P., 2013. Control of *Echinococcus multilocularis*: Strategies, feasibility and cost–benefit analyses. *International Journal for Parasitology* 43, 327–337.
- Hegglin, D., Bontadina, F., Gloor, S., Romig, T., Deplazes, P., Kern, P., 2008. Survey of public knowledge about *Echinococcus multilocularis* in four European countries: Need for proactive information. *BioMed Central Public Health* 8, 247.
- Hegglin, D., Ward, P.I., Deplazes, P., 2003. Anthelmintic baiting of foxes against urban contamination with *Echinococcus multilocularis*. *Emerging Infectious Diseases* 9, 1266–1272.
- Hide, G., Morley, E.K., Hughes, J.M., Gerwash, O., Elmahaishi, M.S., Elmahaishi, K.H., Thomasson, D., Wright, E.A., Williams, R.H., Murphy, R.G., Smith, J.E., 2009. Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 136, 1877.

- Hofer, S., Gloor, S., Müller, U., Mathis, A., Heggin, D., Deplazes, P., 2000. High prevalence of *Echinococcus multilocularis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) and voles (*Arvicola terrestris*) in the city of Zürich, Switzerland. *Parasitology* 120, 135–142.
- Hoffman, A.J., Ocasio, W., 2001. Not all events are attended equally: Toward a middle-range theory of industry attention to external events. *Organization Science* 12, 414–434.
- Hohweyer, J., Cazeaux, C., Travaillé, E., Languet, E., Dumètre, A., Aubert, D., Terryn, C., Dubey, J.P., Azas, N., Houssin, M., Loïc, F., Villena, I., La Carbona, S., 2016. Simultaneous detection of the protozoan parasites *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* and *Giardia* in food matrices and their persistence on basil leaves. *Food Microbiology* 57, 36–44.
- Holland, C., O’connor, P., Taylor, M.R., Hughes, G., Anthony Girdwood, R.W., Smith, H., 1991. Families, parks, gardens and toxocarasis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 23, 225–231.
- Hudson, P.J., Rizzoli, A.P., Grenfell, B.T., Heesterbeek, H., Dobson, A.P., 2002. The ecology of wildlife diseases. Oxford University Press.
- Jardine, J.E., Dubey, J.P., 2002. Congenital toxoplasmosis in a Indo-Pacific bottlenose dolphin (*Tursiops aduncus*). *Journal of Parasitology* 88, 197–199.
- Jarosz, W., Mizgajska-Wiktor, H., Kirwan, P., Konarski, J., Rychlicki, W., Wawrzyniak, G., 2010. Developmental age, physical fitness and *Toxocara* seroprevalence amongst lower-secondary students living in rural areas contaminated with *Toxocara* eggs. *Parasitology* 137, 53.
- Jones, J.L., Dargelas, V., Roberts, J., Press, C., Remington, J.S., Montoya, J.G., 2009. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 49, 878–884.
- Kapel, C.M.O., Torgerson, P.R., Thompson, R.C.A., Deplazes, P., 2006. Reproductive potential of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes, dogs, raccoon dogs and cats. *International Journal for Parasitology* 36, 79–86.
- Karanis, P., Kourenti, C., Smith, H., 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *Journal of Water and Health* 5, 1–38.
- Karesh, W.B., Dobson, A., Lloyd-Smith, J.O., Lubroth, J., Dixon, M.A., Bennett, M., Aldrich, S., Harrington, T., Formenty, P., Loh, E.H., Machalaba, C.C., Thomas, M.J., Heymann, D.L., 2012. Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. *The Lancet* 380, 1936–1945.
- Kern, P., Ammon, A., Kron, M., Sinn, G., Sander, S., Petersen, L.R., Gaus, W., Kern, P., 2004. Risk factors for alveolar echinococcosis in humans. *Emerging Infectious Diseases* 12.

- Kern, P., Bardonnnet, K., Renner, E., Auer, H., Pawlowski, Z., Ammann, R.W., Vuitton, D.A., Kern, P., European Echinococcosis Registry, 2003. European echinococcosis registry: human alveolar echinococcosis, Europe, 1982-2000. *Emerging Infectious Diseases* 9, 343–349.
- King, L.J., Marano, N., Hughes, J.M., 2004. New partnerships between animal health services and public health agencies. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties* 23, 717.
- Klapeć, T., Borecka, A., 2012. Contamination of vegetables, fruits and soil with geohelminths eggs on organic farms in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 19, 481–485.
- Knapp, J., Combes, B., Umhang, G., Aknouche, S., Millon, L., 2016. Could the domestic cat play a significant role in the transmission of *Echinococcus multilocularis*? A study based on qPCR analysis of cat feces in a rural area in France. *Parasite* 23, 42.
- Kohn, M.H., York, E.C., Kamradt, D.A., Haught, G., Sauvajot, R.M., Wayne, R.K., 1999. Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 266, 657–663.
- Lass, A., Szostakowska, B., Myjak, P., Korzeniewski, K., 2015. The first detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in environmental fruit, vegetable, and mushroom samples using nested PCR. *Parasitology Research* 114, 4023–4029.
- Lass, A., Pietkiewicz, H., Szostakowska, B., Myjak, P., 2012. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 31, 1101–1108.
- Lass, A., Pietkiewicz, H., Modzelewska, E., Dumètre, A., Szostakowska, B., Myjak, P., 2009. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental soil samples using molecular methods. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 28, 599–605.
- Lee, A.C.Y., Schantz, P.M., Kazacos, K.R., Montgomery, S.P., Bowman, D.D., 2010. Epidemiologic and zoonotic aspects of ascarid infections in dogs and cats. *Trends in Parasitology* 26, 155–161.
- Lederberg, J., Shope, R.E., Oaks, S.C. (Eds.), 1992. *Emerging infections: microbial threats to health in the United States*. National Academy Press, Washington, D.C.
- Lélu, M., Villena, I., Darde, M.-L., Aubert, D., Geers, R., Dupuis, E., Marnef, F., Poulle, M.-L., Gotteland, C., Dumetre, A., Gilot-Fromont, E., 2012. Quantitative estimation of the viability of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 5127–5132.
- Lélu, M., Gilot-Fromont, E., Aubert, D., Richaume, A., Afonso, E., Dupuis, E., Gotteland, C., Marnef, F., Poulle, M.-L., Dumètre, A., Thulliez, P., Dardé, M.-L., Villena, I., 2011.

- Development of a sensitive method for *Toxoplasma gondii* oocyst extraction in soil. *Veterinary Parasitology* 183, 59–67.
- Lélu, M., 2010. Etude d'un parasite à cycle complexe, *Toxoplasma gondii* : variabilité du cycle de transmission et dynamique de la phase environnementale. 209 pages. Thèse de doctorat : Université de Reims.
- Lélu, M., Langlais, M., Poulle, M.-L., Gilot-Fromont, E., 2010. Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* along an urban–rural gradient. *Theoretical Population Biology* 78, 139–147.
- Litt, J.S., Soobader, M.-J., Turbin, M.S., Hale, J.W., Buchenau, M., Marshall, J.A., 2011. The influence of social involvement, neighborhood aesthetics, and community garden participation on fruit and vegetable consumption. *American Journal of Public Health* 101, 1466–1473.
- Liu, Q., Wei, F., Gao, S., Jiang, L., Lian, H., Yuan, B., Yuan, Z., Xia, Z., Liu, B., Xu, X., Zhu, X.-Q., 2009. *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in China. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103, 162–166.
- MacDonald, D.W., 1980. Patterns of scent marking with urine and faeces amongst carnivore communities, in: *Symposia of the Zoological Society of London*. p. e139.
- Macpherson, C.N.L., 2013. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance. *International Journal for Parasitology* 43, 999–1008.
- Macpherson, C.N.L., 2005. Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. *International Journal for Parasitology* 35, 1319–1331
- Maikai, B.V., Elisha, I.A., Baba-Onoja, E.B.T., 2012. Contamination of vegetables sold in markets with helminth eggs in Zaria metropolis, Kaduna State, Nigeria. *Food Control* 28, 345–348.
- Marsh, R., 1998. Building on traditional gardening to improve household food security. *Food Nutrition and Agriculture* 4–14.
- Marshall, P.A., Hughes, J.M., Williams, R.H., Smith, J.E., Murphy, R.G., Hide, G., 2004. Detection of high levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in natural urban populations of *Mus domesticus*. *Parasitology* 128, 39–42.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V., 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 5, 607.
- Medema, G.J., Schijven, J.F., 2001. Modelling the sewage discharge and dispersion of *Cryptosporidium* and *Giardia* in surface water. *Water Research* 35, 4307–4316.

- Mikaelian, I., Boisclair, J., Dubey, J.P., Kennedy, S., Martineau, D., 2000. Toxoplasmosis in Beluga Whales (*Delphinapterus leucas*) from the St Lawrence estuary: Two case reports and a serological survey. *Journal of Comparative Pathology* 122, 73–76.
- Milkovic, M., Carbajo, A.E., Rubel, D., 2009. Spatial distribution of canine faeces in Buenos Aires suburbs: implications for public health. *Area* 41, 310–318.
- Miller, M., Conrad, P., James, E.R., Packham, A., Toy-Choutka, S., Murray, M.J., Jessup, D., Grigg, M., 2008. Transplacental toxoplasmosis in a wild southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*). *Veterinary Parasitology* 153, 12–18.
- Miterpáková, M., Dubinsky, P., Reiterová, K., Stanko, M., 2006. Climate and environmental factors influencing *Echinococcus multilocularis* occurrence in the Slovak Republic. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 13, 235–242.
- Mizgajska-Wiktor, H., Jarosz, W., Fogt-Wyrwas, R., Drzewiecka, A., 2017. Distribution and dynamics of soil contamination with *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs in Poland and prevention measures proposed after 20 years of study. *Veterinary Parasitology* 234, 1–9.
- Morgan, E.R., Azam, D., Pegler, K., 2013. Quantifying sources of environmental contamination with *Toxocara* spp. eggs. *Veterinary Parasitology* 193, 390–397.
- Morpeth, S.C., Ramadhani, H.O., Crump, J.A., 2009. Invasive non-typhi *Salmonella* disease in Africa. *Clinical Infectious Diseases* 49, 606–611.
- Muñoz-Zanzi, C.A., Fry, P., Lesina, B., Hill, D., 2010. *Toxoplasma gondii* oocyst-specific antibodies and source of infection. *Emerging Infectious Diseases* 16, 1591–1593.
- Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., der Giessen, J. van, Kruse, H., 2010. Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology* 139, S3–S15.
- Oliver, C., 1991. Strategic responses to institutional processes. *Academy of Management Review* 16, 145–179.
- O’Lorcain, P., 1995. The effects of freezing on the viability of *Toxocara canis* and *T. cati* embryonated eggs. *Journal of Helminthology* 69, 169–171.
- O’Lorcain, P., 1994. Prevalence of *Toxocara canis* ova in public playgrounds in the Dublin area of Ireland. *Journal of Helminthology* 68, 237–241.
- Overgaauw, P.A.M., van Knapen, F., 2013. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Veterinary Parasitology* 193, 398–403.

- Overgaauw, P.A.M., van Zutphen, L., Hoek, D., Yaya, F.O., Roelfsema, J., Pinelli, E., van Knapen, F., Kortbeek, L.M., 2009. Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. *Veterinary Parasitology* 163, 115–122.
- Overgaauw, P.A., Nederland, V., 1997. Aspects of *Toxocara* epidemiology: human toxocarosis. *Critical Reviews in Microbiology* 23, 215–231.
- Overgaauw, P.A., 1996. Effect of a government educational campaign in the Netherlands on awareness of *Toxocara* and toxocarosis. *Preventive Veterinary Medicine* 28, 165–174.
- Parameswaran, N., O’Handley, R.M., Grigg, M.E., Wayne, A., Thompson, R.C.A., 2009. Vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in Australian marsupials. *Parasitology* 136, 939.
- Phillips, N., Lawrence, T.B., Hardy, C., 2004. Discourse and institutions. *Academy of Management Review* 29, 635–652.
- Piarroux, M., Piarroux, R., Knapp, J., Bardonnnet, K., Dumortier, J., Watelet, J., Gerard, A., Beytout, J., Abergel, A., Bresson-Hadni, S., Gaudart, J., for the FrancEchino Surveillance Network, 2013. Populations at Risk for Alveolar Echinococcosis, France. *Emerging Infectious Diseases* 19, 721–728.
- Poulle, M.-L., Bastien, M., Richard, Y., Dupuis E., Aubert D., Villena I., Knapp J. Detection of *Echinococcus multilocularis* and other foodborne parasites in fox, cat and dog feces collected in kitchen gardens from an alveolar echinococcosis endemic area. *Soumis à Veterinary Parasitology*.
- Quintaine, T., 2010. Ecologie de la transmission d’*Echinococcus multilocularis*: Identification des milieux propices et modélisation de l’effet du comportement de l’hôte définitif, *Vulpes vulpes*. 146 pages. Thèse de doctorat : Université de Franche-Comté.
- Rabozzi, G., Bonizzi, L., Crespi, E., Somaruga, C., Sokooti, M., Tabibi, R., Vellere, F., Brambilla, G., Colosio, C., 2012. Emerging zoonoses: the “One Health Approach.” *Safety and Health at Work* 3, 77–83.
- Rao, H., 1994. The social construction of reputation: Certification contests, legitimation, and the survival of organizations in the American automobile industry: 1895–1912. *Strategic Management Journal* 15, 29–44.
- Raoul, F., Hegglin, D., Giraudoux, P., 2015. Trophic ecology, behaviour and host population dynamics in *Echinococcus multilocularis* transmission. *Veterinary Parasitology* 213, 162–171.
- Raoul, F., Deplazes, P., Rieffel, D., Lambert, J.-C., Giraudoux, P., 2010. Predator dietary response to prey density variation and consequences for cestode transmission. *Oecologia* 164, 129–139.

- Raoul, F., Deplazes, P., Nonaka, N., Piarroux, R., Vuitton, D.A., Giraudoux, P., 2001. Assessment of the epidemiological status of *Echinococcus multilocularis* in foxes in France using ELISA coprotests on fox faeces collected in the field. *International Journal for Parasitology* 31, 1579–1588.
- Reperant, L.A., Hegglin, D., Tanner, I., Fischer, C., Deplazes, P., 2009. Rodents as shared indicators for zoonotic parasites of carnivores in urban environments. *Parasitology* 136, 329.
- Reperant, L.A., Hegglin, D., Fischer, C., Kohler, L., Weber, J.-M., Deplazes, P., 2007. Influence of urbanization on the epidemiology of intestinal helminths of the red fox (*Vulpes vulpes*) in Geneva, Switzerland. *Parasitology Research* 101, 605–611.
- Reyes-García, V., Aceituno, L., Vila, S., Calvet-Mir, L., Garnatje, T., Jesch, A., Lastra, J.J., Parada, M., Rigat, M., Vallès, J., Pardo-De-Santayana, M., 2012. Home gardens in three mountain regions of the Iberian Peninsula: Description, motivation for gardening, and gross financial benefits. *Journal of Sustainable Agriculture* 36, 249–270.
- Robertson, L.J., Chalmers, R.M., 2013. Foodborne cryptosporidiosis: is there really more in Nordic countries? *Trends in Parasitology* 29, 3–9.
- Robertson, L.J., van der Giessen, J.W., Batz, M.B., Kojima, M., Cahill, S., 2013. Have foodborne parasites finally become a global concern. *Trends in Parasitology* 29, 101–103.
- Rodgers, T.W., Janečka, J.E., 2013. Applications and techniques for non-invasive faecal genetics research in felid conservation. *European Journal of Wildlife Research* 59, 1–16.
- Romig, T., Bilger, B., Dinkel, A., Merli, M., Thoma, D., Will, R., Mackenstedt, U., Lucius, R., 2007. Impact of praziquantel baiting on intestinal helminths of foxes in southwestern Germany. *Helminthologia* 44, 137–144.
- Rubel, D., Wisnivesky, C., 2005. Magnitude and distribution of canine fecal contamination and helminth eggs in two areas of different urban structure, Greater Buenos Aires, Argentina. *Veterinary Parasitology* 133, 339–347.
- Sanaei, M., Zakilo, M., Tavazoei, Y., Jahanhashemi, H., Shahnazi, M., 2012. Contamination of soil and grass to *Toxocara* spp. eggs in public parks of Qazvin, Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* S1156–S1158.
- Schneider, R., Aspöck, H., Auer, H., 2013. Unexpected increase of alveolar echinococcosis, Austria, 2011. *Emerging Infectious Diseases* 19, 475–477.
- Schweiger, A., Ammann, R.W., Candinas, D., Clavien, P.-A., Eckert, J., Gottstein, B., Halkic, N., Muellhaupt, B., Prinz, B.M., Reichen, J., 2007. Human alveolar echinococcosis after fox population increase, Switzerland. *Emerging Infectious Diseases* 13, 878.

- Shaw, A., 2005. Zoonoses control: a cost-effective opportunity for poverty alleviation, in: The control of neglected zoonotic diseases: A route to poverty alleviation. Report of a joint World Health Organization (WHO)/United Kingdom Department for International Development (DFID)-Animal Health Programme (AHP) Meeting. pp. 20–21.
- Simon, A., Poulin, M., Rousseau, A., Ogden, N., 2013. Fate and transport of *Toxoplasma gondii* oocysts in seasonally snow covered watersheds: A conceptual framework from a melting snowpack to the Canadian Arctic Coasts. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10, 994–1005.
- Slifko, T.R., Smith, H.V., Rose, J.B., 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal for Parasitology* 30, 1379–1393.
- Smolinski, M.S., Hamburg, M.A., Lederberg, J., Institute of Medicine (U.S.) (Eds.), 2003. Microbial threats to health: emergence, detection, and response. National Academies Press, Washington, DC.
- Staubach, C., Thulke, H.-H., Tackmann, K., Hugh-Jones, M., Contraths, F.J., 2001. Geographic information system-aided analysis of factors associated with the spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* infections of foxes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65, 943–948.
- Stieger, C., Hegglin, D., Schwarzenbach, G., Mathis, A., Deplazes, P., 2002. Spatial and temporal aspects of urban transmission of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology* 124, 631–640.
- Szostakowska, B., Lass, A., Kostyra, K., Pietkiewicz, H., Myjak, P., 2014. First finding of *Echinococcus multilocularis* DNA in soil: Preliminary survey in Varmia-Masuria Province, northeast Poland. *Veterinary Parasitology*, 203, 73-79.
- Tackmann, K., Löschner, U., Mix, H., Staubach, C., Thulke, H.-H., Ziller, M., Contraths, F.J., 2001. A field study to control *Echinococcus multilocularis*-infections of the red fox (*Vulpes vulpes*) in an endemic focus. *Epidemiology and Infection* 127, 577–587.
- Takumi, K., de Vries, A., Chu, M.L., Mulder, J., Teunis, P., van der Giessen, J., 2008. Evidence for an increasing presence of *Echinococcus multilocularis* in foxes in The Netherlands. *International Journal for Parasitology* 38, 571–578.
- Tappe, D., Kern, P., Frosch, M., Kern, P., 2010. A hundred years of controversy about the taxonomic status of *Echinococcus* species. *Acta Tropica* 115, 167–174.
- Taylor, L.H., Latham, S.M., Woolhouse, E.J., 2001. Risk factors for human diseases emergence. *The Royal Society* 356, 983–989.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 30, 1217–1258.

- Thevenet, P.S., Ñancufil, A., Oyarzo, C.M., Torrecillas, C., Raso, S., Mellado, I., Flores, M.E., Cordoba, M.G., Minvielle, M.C., Basualdo, J.A., 2004. An eco-epidemiological study of contamination of soil with infective forms of intestinal parasites. *European Journal of Epidemiology* 19, 481–489.
- Toma, B., Thiry, E., 2003. Qu'est-ce qu'une maladie émergente. *Epidemiologie et Santé Animale* 44, 1–11.
- Torgerson, P.R., Macpherson, C.N.L., 2011. The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: Global trends. *Veterinary Parasitology* 182, 79–95.
- Travaillé, E., La Carbona, S., Gargala, G., Aubert, D., Guyot, K., Dumètre, A., Villena, I., Houssin, M., 2016. Development of a qRT-PCR method to assess the viability of *Giardia intestinalis* cysts, *Cryptosporidium* spp. and *Toxoplasma gondii* oocysts. *Food Control* 59, 359–365.
- Traversa, D., di Regalbono, A.F., Di Cesare, A., La Torre, F., Drake, J., Pietrobelli, M., 2014. Environmental contamination by canine geohelminths. *Parasites and Vectors* 7, 67.
- Tsukada, H., Hamazaki, K., Ganzorig, S., Iwaki, T., Konno, K., Lagapa, J.T., Matsuo, K., Ono, A., Shimizu, M., Sakai, H., others, 2002. Potential remedy against *Echinococcus multilocularis* in wild red foxes using baits with anthelmintic distributed around fox breeding dens in Hokkaido, Japan. *Parasitology* 125, 119–129.
- Uga, S., Hoa, N., Noda, S., Moji, K., Cong, L., Aoki, Y., Rai, S., Fujimaki, Y., 2009. Parasite egg contamination of vegetables from a suburban market in Hanoi, Vietnam. *Nepal Medical College journal* 11, 75–78.
- Uga, S., minami, toshikadzu, nagata, kenji, 1996. Defecation habits of cats and dogs and contamination by *toxocara* eggs in public park sandpits. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 54, 122–126.
- Umhang, G., Comte, S., Hormaz, V., Boucher, J.-M., Raton, V., Favier, S., Raoul, F., Giraudoux, P., Combes, B., Boué, F., 2016. Retrospective analyses of fox feces by real-time PCR to identify new endemic areas of *Echinococcus multilocularis* in France. *Parasitology Research* 115, 4437–4441.
- Vásquez Tsuji, O., Martínez Barbabosa, I., Tay Zavala, J., Ruíz Hernández, A., Pérez Torres, A., 1997. Verduras de consumo humano como probable fuente de infección de *Toxocara sp.* para el hombre. *Boletín Chileno de Parasitología* 52, 47–50.
- Veit, P., Bilger, B., Schad, V., Schäfer, J., Frank, W., Lucius, R., 1995. Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasitology* 110, 79–86.
- Vuitton, D.A., Zhou, H., Bresson-Hadni, S., Wang, Q., Piarroux, M., Raoul, F., Giraudoux, P., 2003. Epidemiology of alveolar echinococcosis with particular reference to China and Europe. *Parasitology* 127, S85–S105.

- Williams, R.H., Morley, E.K., Hughes, J.M., Duncanson, P., Terry, R.S., Smith, J.E., Hide, G., 2005. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts. *Parasitology* 130, 301–307.
- World Health Organization (WHO) and Food and Agriculture Organization (FAO), 2012. Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites: report of a Joint FAO/WHO expert meeting, 3-7 September 2012, FAO Headquarters, Rome, Italy.
- World Health Organization (WHO), 2003. Hazard characterization for pathogens in food and water: guidelines. Food and Agriculture Organization.
- Zald, M.N., Morrill, C., Rao, H., 2005. The impact of social movements on organizations. *Social Movements and Organization Theory* 253–279.
- Zibaei, M., Sadjjadi, S.M., Sarkari, B., others, 2007. Prevalence of *Toxocara cati* and other intestinal helminths in stray cats in Shiraz, Iran. *Tropical Biomedicine* 24, 39–43.

Contamination des terrains potagers par *Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii* et *Toxocara* spp., parasites responsables de zoonoses transmissibles par l'alimentation

Les canidés et félinés peuvent être hôtes définitifs d'*Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii* ou *Toxocara* spp., parasites responsables de zoonoses transmissibles par l'alimentation. La consommation crue de fruits et légumes porteurs de leurs œufs ou oocystes peut être source de contamination humaine. Cette étude visait à évaluer et caractériser le risque d'exposition humaine lié au dépôt de fèces de chat, chien et renard dans les terrains potagers localisés en régions d'endémie. Ce dépôt s'est avéré important dans certains potagers des Ardennes. De plus, l'ADN d'*E. multilocularis* et *Toxocara* spp. a été détecté dans 1/3 des fèces collectées et 23% des rongeurs piégés autour des potagers ont été trouvés infectés par au moins un des parasites d'intérêt, confirmant le risque d'exposition des hôtes intermédiaires. Parallèlement, l'identification précise des facteurs responsables du dépôt de fèces de carnivores a été conduite sur 192 potagers familiaux ou professionnels des Ardennes et de la Moselle. Au total, 1016 fèces de carnivores (59% de chat, 31% de renard et 10% de chien) ont été collectées au cours de huit sessions de prospection. Par modélisation, nous avons montré que la présence d'une clôture limite très efficacement le dépôt de fèces de renard, tandis que la présence de rongeurs ou d'arbres fruitiers à proximité le favorise. Enfin, la mise au point d'une méthode sensible a permis la détection de l'ADN d'*E. multilocularis* et *Toxocara* spp. dans 42% et 12% des terrains potagers. Au final, l'exposition humaine aux parasites étudiés semble élevée dans certains potagers. Des mesures de prévention basées sur les résultats de l'étude sont proposées.

Mots clés : parasites transmis par l'alimentation, fèces de carnivore, zoonoses, prévention, risque d'exposition, contamination environnementale

Contamination of kitchen gardens with *Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii* and *Toxocara* spp. food-borne parasites responsible of zoonosis.

Canids and Felids can be definitive hosts of *Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii* and *Toxocara* spp., which are food-borne parasites responsible of zoonoses. The consumption of raw fruit or vegetables carrying their eggs or oocysts can be source of human contamination. This study aimed to assess and characterize the risk of human exposure linked to the faecal deposition by cats, red foxes and dogs in kitchen gardens located in endemic areas. This deposit was found to be important in some kitchen gardens located in the Ardennes region. Furthermore, DNA of *E. multilocularis* and *Toxocara* spp were detected in 1/3 of the collected faeces and 23% of the rodents trapped in kitchen gardens proximity were found infected with at least one of the canids or felids parasites, confirming the risk of intermediate host exposure. Concurrently, the accurate identification of factors responsible for carnivore faeces deposit was conducted from eight prospection sessions of 192 kitchen gardens, family or professional ones, located in the Ardennes and Moselle regions. A total of 1016 carnivore faeces (59% from cats, 31% from foxes and 10% from dogs) were collected. By using models to test the effect of various variables on faeces deposit, we showed that fencing efficiently limits fox faeces deposit whereas presence of rodents or fruit trees in the vicinity increases it. Finally, thanks to the development of a sensitive method, *E. multilocularis* and *Toxocara* spp. DNA was detected in 42% and 12% of the kitchen gardens. In conclusion, the human exposure to canids and felids foodborne parasites seems high in certain kitchen gardens. Prevention methods are proposed based on our results.

Key words : food-borne parasites, carnivore faeces, zoonoses, prevention, exposure risk, environmental contamination

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Eco-épidémiologie

