



## Journée scientifique sur les parasites de poisson

Institut Pasteur de Lille

*Amphithéâtre de l'Institut Biologique de Lille*

Lundi 26 Mai 2014

- 9h30 Accueil des participants
- 10h00 – 10h40 Diversité des parasites de poisson et risque pour la santé  
Les objectifs du réseau Fish-Parasites (ANR-10-ALIA-04)  
*Cécile-Marie Aliouat-Denis (BDPEE – CIIL, Lille)*
- 10h50 – 11h30 Nouvelles idées sur les aspects génétiques, écologiques et épidémiologiques des  
nématodes Anisakidés - *Simonetta Mattiucci (Université La Sapienza, Rome, Italie)*
- 11h40 – 12h00 Stratégie d'échantillonnage et prévalence des parasites dans les poissons collectés  
durant les campagnes en mer - *Véronique Verrez-Bagnis (Ifremer, Nantes)*
- 12h10 – 12h30 Identification moléculaire des *Anisakidae* isolés de poissons.  
*Yuwalee Seesao (BDPEE - CIIL Lille - ANSES Boulogne s/mer)*
- Pause méridienne 12h30 – 14h00*
- 14h00 – 14h20 *Cryptosporidium* dans les poissons - *Gabriela Certad (BDPEE – CIIL, Lille)*
- 14h30 – 14h50 La Diphyllbothriose en 2014.  
*Jean Dupouy-Camet (Université Paris Descartes, hôpital Cochin, Paris)*
- 15h00 – 15h20 Identification moléculaire des *Diphyllbothrium* spp.  
*Hélène Yéra (Université Paris Descartes, hôpital Cochin, Paris)*
- 15h30 – 18h00 Discussion entre les membres du réseau *Fish-Parasites*

## **Diversité des parasites de poisson et risque pour la santé.**

### **Les objectifs du réseau *Fish-Parasites* (ANR-10-ALIA-04).**

**Cécile-Marie ALIOUAT-DENIS** et les membres du réseau *Fish-Parasites*.

*Biologie et Diversité des Pathogènes Eucaryotes Emergents (BDPEE) – Centre d'Immunité et d'Infection de Lille (CIIL) – Université Lille Nord de France.*

Les poissons sont porteurs d'un large panel de parasites taxonomiquement diversifiés qui ont un impact économique ou en santé publique. Comme préambule à cette journée scientifique consacrée aux parasites de poissons, nous donnerons une brève introduction sur la position taxonomique de ces différents groupes de parasites et approfondirons les connaissances pour certains d'entre eux, *Cryptosporidium*, les Microsporidies et les Myxozoaires (ou Myxosporidies). Comme la présence de *Cryptosporidium* spp. dans les poissons sera décrite en détails plus tard dans la journée, l'impact de ces coccidies dans les fruits de mer sera discuté ici. Durant les 15 dernières années, beaucoup d'études ont rapporté la présence de *C. parvum* ou *C. hominis* dans les mollusques bivalves comestibles du monde entier. Mais seules quelques unes ont investigué la capacité des oocystes isolés de fruits de mer à induire la cryptosporidiose dans un modèle mammifère. Une question reste ouverte: les organismes *Cryptosporidium* s'accumulent-ils passivement dans ces mollusques filtreurs ou pénètrent-ils activement dans leurs hôtes bivalves comme une étape obligatoire de leur cycle de vie ?

Les Microsporidies appartiennent au clade des Eumycètes et certaines d'entre elles peuvent être pathogènes pour l'homme comme *Enterocytozoon* spp. ou *Encephalitozoon* spp. Certaines Microsporidies peuvent infecter les poissons. Alors que ces parasites peuvent altérer la chair de poisson en formant des xénomes macroscopiques le long de la colonne vertébrale, (ex. *Spraguea* spp. dans l'espèce *Lophius piscatorius*), ils ne semblent ni responsables de symptômes chez le poisson ni de pathogénicité chez l'homme.

Les Myxosporidies sont des parasites métazoaires proches taxonomiquement des Cnidaires. Parmi les nombreuses espèces infectant les poissons, *Myxobolus cerebralis* est la plus connue car elle est la cause du tournis, maladie qui a tué un grand pourcentage de Salmonidés dans le monde entier avec des pertes économiques conséquentes. D'autres espèces comme *Kudoa* spp. forment des kystes blancs ellipsoïdes qui modifient la texture de la chair de poisson. Des spores de Myxosporidies ont été observées dans des selles humaines. Le lien entre la présence de Myxosporidies et les symptômes cliniques chez l'Homme est discuté.

Pour conclure, une vue d'ensemble des principaux objectifs du réseau *Fish-Parasites* sera présentée ainsi que quelques conseils pratiques pour éviter l'infection parasitaire lorsque l'on mange du poisson.

*Journée scientifique sur les parasites de poisson*

**Nouvelles idées sur les aspects génétiques, écologiques et épidémiologiques des  
nématodes Anisakidés.**

**Simonetta MATTIUCCI**

*Université La Sapienza, Rome, Italie*

**Résumé non disponible.**

## **Stratégie d'échantillonnage et prévalence des parasites dans les poissons collectés durant des campagnes scientifiques.**

Véronique VERREZ-BAGNIS\* et les membres du réseau *Fish-Parasites*.

\*Ifremer, BRM-EMB, Nantes, France.

Certains parasites des poissons marins comme les nématodes (*Anisakidae*) sont des pathogènes zoonotiques qui ont un impact en santé publique. Etant donné l'augmentation de la consommation des produits de la mer en France et particulièrement celle du poisson cru, l'action *Fish-Parasites* a pour but: (i) d'identifier les parasites dans les poissons les plus consommés, (ii) d'explorer le rôle potentiellement structurant de l'espèce hôte, de la géographie et d'autres facteurs dans la distribution des parasites, (iii) de développer des stratégies techniques pour améliorer la détection des parasites dans les filets de poissons, (iv) de créer une plate-forme d'identification des parasites de poisson et (v) de proposer des sessions de formation continue aux professionnels de la filière pêche.

Quinze espèces de poisson ont été sélectionnées sur la base d'une analyse de type *risk ranking* qui a pris en compte les données de consommation françaises, le niveau d'exposition du consommateur et le niveau d'infestation par les Anisakidés (données de la littérature). Les poissons ont été échantillonnés sur des bateaux durant des campagnes scientifiques de pêche ou à terre (criée ou mareyeurs) puis disséqués pour collecter les parasites. Les nématodes ont été identifiés au rang de l'espèce par biologie moléculaire. Toutes les données sur les lieux d'échantillonnage, les poissons et les parasites ont été renseignées dans une base de données PARAFISH développée pour le projet.

Ici, seules les données sur le niveau d'infestation parasitaire des poissons échantillonnés durant les campagnes scientifiques sont décrites. La prévalence des parasites est très dépendante de l'espèce de poisson et de l'aire géographique (mer Méditerranée, océan Atlantique et Manche et mer du Nord). Au total, 505 poissons sur 879 poissons échantillonnés pendant les campagnes scientifiques hébergent au moins un parasite macroscopique (57.5% de prévalence). Les nématodes infestent la cavité corporelle à 40% alors que le foie et les filets sont contaminés à 25% et 21% respectivement.

Etant donné que les Anisakidés isolés de 147 poissons n'ont pas été identifiés au rang de l'espèce, les données montrent que *Anisakis simplex* a été retrouvé au moins dans 455 organes de poissons, et *A. pegreffii* et *Hysterothylacium aduncum* ont été identifiés au moins dans 96 et 91 organes de poissons, respectivement. Seules deux espèces, *A. pegreffii* et *Hysterothylacium aduncum*, ont été isolées de poissons échantillonnés en mer Méditerranée, alors que *A. simplex*, *Contraecum sp* et *H. aduncum* ont été identifiés dans des poissons pêchés en Manche et mer du Nord. Les poissons provenant du Golfe de Gascogne et mer Celtique semblent plus infestés que les poissons provenant d'autres localisations géographiques et les espèces de nématode retrouvées sont principalement *A. simplex*, *A. pegreffii*, *H. aduncum*, *Contraecum sp*, *Pseudoterranova decipiens* et *P. krabbei*.

Les données sur l'identification des espèces de nématodes et sur leur prévalence seront analysées, à partir des poissons collectés à terre et pendant les campagnes scientifiques Ifremer, pour déterminer le rôle potentiellement structurant de certains facteurs sur la distribution des nématodes.

## Identification moléculaire des *Anisakidae* isolés de poissons.

**Yuwalee SEESAO**, Gènes Diffusion (PEGASE-Biosciences) et les membres du réseau *Fish-Parasites*.

*Biologie et Diversité des Pathogènes Eucaryotes Emergents (BDPEE) – Centre d'Immunité et d'Infection de Lille (CIIL)*  
– Université Lille Nord de France - ANSES Boulogne s/mer.

De nombreux parasites infestent fréquemment les poissons comestibles sous toutes les latitudes. Parmi eux, les genres *Anisakis*, *Contracaecum* et *Pseudoterranova*, membres de la famille des *Anisakidae*, sont des nématodes dont les larves sont présentes chez de nombreuses espèces de poissons et céphalopodes. Ces larves peuvent induire chez l'homme des pathologies digestives et/ou allergiques. En France, la consommation des produits de la pêche, surtout crus ou peu cuits, est en augmentation. Ces deux constats nous ont poussés à mieux définir l'impact des parasites de poisson sur la santé des consommateurs et à définir des stratégies de prévention efficaces pour diminuer le risque pour les consommateurs de produits de la mer.

Pour pallier au peu de données recensées sur la distribution des *Anisakidae* dans les poissons en France, l'un des axes de l'action Fish-Parasites (ANR-10-ALIA-004) est de collecter et d'identifier des nématodes Anisakidés à partir de poissons. Le plan d'échantillonnage des espèces de poisson a été établi suite à une analyse de type *risk ranking* exploitant les données de consommation des poissons en France et des données de prévalence des Anisakidés issues de la littérature. L'identification moléculaire de ces parasites est basée sur l'amplification et le séquençage d'un locus génétique polymorphe constitutif du gène *COX2*. Les nématodes de 15 espèces de 1675 poisson provenant de l'Atlantique Nord-Est, du Golfe de Gascogne, de la mer d'Irlande, de la mer Méditerranée, et de la Manche et mer du Nord ont été isolés des filets, de la cavité corporelle, du foie et du tube digestif. Lorsqu'un organe contient onze nématodes ou plus, leurs ADNs sont extraits en *pool*. Une PCR au locus *COX2* nouvellement mise au point nous a permis d'obtenir une librairie de séquences qui a été séquencée à haut-débit (HTS) sur la plateforme PGM Ion Torrent® (Life Technologies). En dessous de onze nématodes par organe, l'identification est réalisée par séquençage Sanger classique au même locus *COX2*. Nous avons mis en place un *pipeline* d'analyse automatisé accessible sous Galaxy. Les séquences nucléotidiques obtenues sont ainsi comparées à une banque de séquences de référence constituée pour les besoins de l'étude à partir des séquences publiques disponibles. L'identification moléculaire permet *in fine* de déterminer les fréquences relatives des taxons de nématodes contaminant un organe donné.

Les résultats préliminaires de prévalence globale des nématodes infestant les 1675 poissons échantillonnés sont les suivants: 46,75% des poissons examinés sont exempts de nématodes, 32,98% des poissons sont infestés par les nématodes dans les viscères, 2,58% portent des nématodes uniquement dans les filets et 17,68% portent des nématodes à la fois dans les filets et les viscères. Le premier *run* HTS a permis d'identifier 8305 nématodes provenant de 92 organes (filet, foie et cavité corporelle) de 11 espèces de poissons. Les nématodes ont été identifiés à 93,8% comme appartenant au genre *Anisakis*. Cependant, 6,2% des séquences restent non identifiées et correspondent potentiellement à de nouveaux sous-types ou de nouvelles espèces.

Ces données de fréquence permettront : (i) d'évaluer la répartition des différentes espèces de parasites dans les organes des poissons et (ii) d'analyser le poids de certaines variables, telles que l'espèce de poisson, sa taille, la zone et la saison de pêche, sur la distribution des Anisakidés dans les poissons afin d'envisager des mesures de prévention.

## **Cryptosporidium dans les poissons.**

**Gabriela Certad** et les membres du réseau *Fish-Parasites*.

*Biologie et Diversité des Pathogènes Eucaryotes Emergents (BDPEE) – Centre d'Immunité et d'Infection de Lille (CIIL) – Université Lille Nord de France*

**Introduction.** Les parasites du genre *Cryptosporidium* sont des protistes intracellulaires *Apicomplexa*. Le genre *Cryptosporidium* comprend des espèces qui infectent l'intestin d'un grand nombre de vertébrés, y compris l'homme. Les espèces du genre *Cryptosporidium* sont la cause d'une zoonose cosmopolite: la cryptosporidiose, maladie opportuniste émergente ayant un impact considérable chez le patient immunodéprimé, chez qui la cryptosporidiose peut devenir chronique voire létale. Le mode de transmission de la cryptosporidiose est oro-fécal, par ingestion d'oocystes présents dans l'eau ou les aliments souillés par des selles ou par contact avec un sujet infecté. L'infection peut toutefois se développer chez les sujets immunocompétents, de façon sporadique ou par épidémies, mais, dans ce cas, les symptômes cliniques sont des diarrhées autorésolutives, généralement sans complication. Chez les poissons, deux espèces, *Cryptosporidium molnari* et *Cryptosporidium scophthalmi*, ont déjà été décrites. Récemment, en Australie, des espèces/génotypes supplémentaires ont été identifiés dans les poissons grâce à des outils moléculaires. L'objectif général de notre étude a visé à évaluer la prévalence de *Cryptosporidium* sp. dans les produits de la pêche en France en incluant des poissons marins et d'eau douce.

**Matériels et méthodes.** Au total, 42 poissons achetés sur le port de pêche de Thonon-les-Bains (France) au bord du lac Léman, en Novembre 2011 (automne) et Avril 2013 (printemps) et 1470 poissons marins (collectés entre 2011 et 2013) ont été analysés pour détecter la présence de *Cryptosporidium* spp. par PCR nichée à partir de grattages gastriques et intestinaux. Le locus ciblé par la PCR nichée est un fragment du gène codant l'ARNr 18S dont les produits amplifiés ont été séquencés puis comparés aux séquences disponibles dans les banques de données publiques (NCBI). Les tissus des muqueuses stomacale et intestinale ont été prélevés pour analyses histologiques.

**Résultats.** Les *Cryptosporidium* spp. ont été détectés dans 15 échantillons de poissons du lac Léman, ce qui représente une prévalence de 33,6% répartie comme suit: 86% (13) d'échantillons positifs pour *C. parvum*, 7% (1) pour *C. molnari* et 7% (1) d'infection mixte à *C. molnari* et *C. parvum*. Pour les poissons marins, les *Cryptosporidium* spp. ont été détectés dans 28 échantillons, ce qui représente une prévalence de 2% répartie comme suit: 25% (7) des échantillons positifs pour *C. parvum* et 75% (21) pour *C. molnari*. Au total, 5 espèces de poissons d'eau douce et 11 espèces de poissons marins ont été identifiées comme de nouveaux hôtes pour *Cryptosporidium*. L'examen histologique de tissus de poissons infectés par *C. parvum* a révélé la présence de différents stades évolutifs du parasite au niveau de la bordure apicale des épithéliums gastrique et intestinal.

**Conclusions.** Dans notre étude, deux espèces de *Cryptosporidium* ont été détectées chez les poissons: (i) *C. molnari* espèce déjà décrite chez des poissons marins mais qui est observée pour la première fois chez des poissons d'eau douce et (ii) *C. parvum*, espèce déjà identifiée chez les poissons mais considérée comme une espèce infectant surtout les mammifères. Nos analyses histologiques montrent la présence de *C. parvum* au niveau des cellules épithéliales du tube digestif ce qui plaide en faveur d'une infection plutôt que d'un portage passif. Le maintien du cycle de *C. parvum* chez les poissons serait un indicateur de pollution fécale du milieu. *Cryptosporidium* est plus fréquemment détecté chez les poissons d'eau douce que chez les poissons marins. Ceci pourrait être expliqué par différents facteurs tels que la contamination du lac par les eaux usées ou les activités d'élevages de bovins à proximité. Ces observations ont un impact potentiel en santé publique vu que *C. parvum* est une espèce zoonotique dont la dispersion par les poissons est facilitée par l'habitat aquatique de l'hôte.

## Prévalence de l'infestation par *Diphyllobothrium latum* dans différentes espèces de poissons provenant de 3 lacs sub-alpins français (2011-2013) et tendance de l'évolution de la parasitose humaine.

Jean DUPOUY-CAMET et les membres du réseau *Fish-Parasites*.

Dpt de Parasitologie, Hôpital Cochin, Université Paris Descartes, 27, Fbrg St-Jacques, 75014 Paris, France.

*Diphyllobothrium latum*, le ténia du poisson, est le plus long vers plat infectant l'homme. Il cause une infection parasitaire appelée diphyllobothriose qui se contracte en mangeant du poisson cru. Des études réalisées il y a 10 ans indiquaient que la diphyllobothriose humaine était émergente ou ré-émergente dans certains pays européens (dans les régions sub-alpines italiennes et françaises) et en particulier autour du lac Léman (Dupouy-Camet & Peduzzi, Eurosurveillance, 2004, 9:31-5). Dans ce lac, des travaux antérieurs de notre équipe (Nicoulaud *et al.*, Parasite, 2005, 12:362-64) ont rapporté une prévalence des larves plérocercoides de 4 à 10 % dans les filets de perches (*Perca fluviatilis*).

Le présent travail a pour but d'évaluer: l'évolution de la prévalence de *D. latum* dans les filets de perches, la prévalence de ce parasite dans différentes espèces de poissons et l'incidence de la parasitose humaine. Les filets de perches et les poissons ont été achetés à des pêcheurs professionnels sur le lac Léman ou obtenus lors de campagnes de pêche scientifiques (J. Guillard, INRA) dans les lacs d'Annecy et du Bourget. Tous les filets de perches (n = 1013) ont été examinés après grattage des filets à l'aide d'un couteau de cuisine ou d'une table de mirage. La plupart des larves plérocercoides ont été identifiées par PCR ciblant les gènes COI ou NADPH comme précédemment décrit (Yera *et al.*, Parasite, 2008, 15:402-7).

Une prévalence globale de 2.2 % a été documentée oscillant entre 0% et 23% selon l'origine géographique et le poids du filet. Une corrélation positive a été trouvée entre le poids du filet de perche et la prévalence des larves plérocercoides. Les dissections de 138 poissons (compris entre 14g et 3000g) appartenant à plusieurs espèces provenant des lacs Léman, d'Annecy ou du Bourget ont été réalisées. Les poissons parasités par *D. latum* n'ont été observés que dans le lac Léman où les larves plérocercoides ont été observées dans les muscles ou dans la cavité générale de 7/7 brochets (*Esox lucius*), 7/24 perches (*Perca fluviatilis*) et 2/7 lottes (*Lotta lotta*). Aucune larve n'a été retrouvée dans les 8 ombles chevaliers (*Salvelinus alpinus*) et les 13 corégones (ou féras, *Coregonus lavaretus*) examinés. Aucune larve de *D. latum* n'a été retrouvée dans aucun des 51 perches, 9 brochets et 5 lottes provenant des lacs du Bourget et d'Annecy. Le plus grand nombre de larves plérocercoides a été trouvé dans un brochet (jusqu'à 18 dans un seul individu). Brochets et lottes, toujours consommés bien cuits, ne représentent pas de risque important de santé publique. Ce n'est pas le cas de la perche qui peut être consommée crue (*carpaccio di persico* ou filets de perche marinés).

Nous avons été témoins d'une diminution de la prévalence des perches parasitées durant les 3 ans de notre étude et en comparaison de la prévalence observée il y a 10 ans. Cette diminution était aussi corrélée à la diminution de l'incidence des cas humains dans la région; seulement 6 cas ont été rapportés pendant les 3 dernières années en comparaison des 44 cas (7,3 cas/an) rapportés dans la même région entre 2002-2007 (Wicht PhD, University of Geneva, 2009). L'information transmise aux consommateurs et aux professionnels peut être à l'origine de cette évolution encourageante.

## Identification moléculaire des *Diphyllbothrium* spp.

Hélène YERA, Malak HAIDAR et les membres du réseau *Fish-Parasites*.

Dpt de Parasitologie, Hôpital Cochin, Université Paris Descartes, 27, Fbrg St-Jacques, 75014 Paris, France.

Nous avons confirmé l'importance du diagnostic moléculaire des espèces du genre *Diphyllbothrium* permettant le diagnostic de diphyllbothriose exotique ou de détecter des genres proches de *Diphyllbothrium*, potentiellement pathogènes chez l'homme (Yera *et al.*, *Parasitology International*, 2013, 62:268-71).

Dans ce travail, nous avons cherché à développer et valider des outils moléculaires nécessaires à l'identification de *D. latum* et à l'étude de sa diversité génétique. Un grand nombre de larves étant à identifier, nous avons développé une méthode qui permet une identification rapide de *D. latum* telle qu'une PCR temps-réel spécifique. Le choix de cette technique est basé sur sa sensibilité (faible quantité de matériel initial), sa rapidité (gain de temps) et sa spécificité. Nous avons donc dessiné une PCR temps-réel spécifique du genre *Diphyllbothrium* en utilisant l'agent intercalant SYBER® Green et l'analyse des courbes de fusion. Les températures de fusion trop proches entre *D. latum* et les autres espèces testées n'ont pas permis l'identification des isolats de *D. latum*. Aussi, nous avons ensuite dessiné une PCR temps-réel spécifique TaqMan® avec une sonde que nous pensions être spécifique de *D. latum*. Malheureusement, cette tentative a aussi conduit à la détection d'autres espèces du genre *Diphyllbothrium*. Finalement, nous avons dessiné une PCR temps-réel spécifique TaqMan® avec des amorces et une sonde spécifiques de *D. latum*. Seuls les isolats de *D. latum* sont détectés. Un plus grand nombre d'isolats doit être analysé afin de confirmer ces derniers résultats.

Nous avons détecté un polymorphisme entre les différents isolats de *D. latum* caractérisés par une variation du nombre de répétitions de 4 à 8 d'une séquence de 36 pb présente dans le génome mitochondrial de *D. latum*. Cinq haplotypes différents sont observés. Le faible nombre d'échantillons testés ne permet pas de tirer des conclusions sur l'épidémiologie ou l'origine géographique des isolats (Haidar *et al.*, données en cours de publication).