

Université de Montréal

**Étude éco-épidémiologique sur l'infection par
Francisella tularensis au Québec**

par

Vanessa Gabriele-Rivet

Département de pathologie et microbiologie vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de M.Sc.

en sciences vétérinaires

option épidémiologie

Décembre 2014

© Vanessa Gabriele-Rivet, 2014

Résumé

Au Canada, *Francisella tularensis*, une bactérie zoonotique causant la tularémie, affecte principalement le lièvre d'Amérique, le rat musqué et le castor. Malgré les nombreuses études sur cette maladie, les connaissances sur l'écologie et les réservoirs naturels de la tularémie demeurent limitées. Une étude transversale a été réalisée afin d'estimer la prévalence d'infection par *F. tularensis* chez le lièvre d'Amérique, le rat musqué et le coyote dans quatre régions du Québec (Canada) et de décrire le risque d'infection d'après des caractéristiques individuelles (âge, sexe et état de chair) et environnementales. D'octobre 2012 à avril 2013, 345 lièvres d'Amérique, 411 rats musqués et 385 coyotes capturés par des trappeurs ont été échantillonnés. Les caractéristiques environnementales autour du site de capture ont été extraites de base de données géographiques. La séroprévalence (test de microagglutination) était de 2.9% chez les coyotes, 0.6% chez les lièvres et 0% chez les rats musqués. Tous les rats musqués et les lièvres étaient négatifs à une réaction en chaîne par polymérase (PCR) en temps réel réalisée à partir d'un pool de foie, rein, rate et poumon; par contre, le type AI a été détecté dans les organes individuels des deux lièvres séropositifs. Des analyses de régression logistique exacte ont démontré que l'âge était un facteur de risque pour la séropositivité du coyote, ainsi que la proportion de forêts et la proportion de l'environnement considéré approprié pour le lièvre autour de la localisation de capture des coyotes. Les résultats de cette étude suggèrent la présence du cycle terrestre dans les régions étudiées.

Mots-clés : Coyote, écologie, *Francisella tularensis*, lièvre d'Amérique, PCR, prévalence, rat musqué, système d'information géographique, test de microagglutination

Abstract

In Canada, *Francisella tularensis*, the zoonotic bacterial agent of tularemia, affects mostly snowshoe hares, muskrats and beavers. Despite numerous studies, knowledge of its ecological occurrence and natural reservoirs is limited. A cross-sectional study was conducted to estimate the prevalence of *F. tularensis* in snowshoe hares, muskrats and coyotes in four regions of Québec, Canada, and to describe the risk of infection in relation to individual host (age, sex and body condition) and environmental characteristics. Between October 2012 and April 2013, 345 snowshoe hares, 411 muskrats and 385 coyotes were captured by trappers. Ecological characteristics of the location of capture were extracted from geographical databases. Prevalence of antibodies against *F. tularensis* (microagglutination test) was 2.9% in coyotes, 0.6% in hares and 0% in muskrats. *F. tularensis* DNA was not detected by real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) in the pools of liver, kidney, lung and spleen from muskrats and hares but *F. tularensis* type AI was detected during testing of individual organs of two seropositive hares. Exact logistic regression analyses showed that age was a significant risk factor for seropositivity of coyotes, as were the proportion of forest and the proportion of area considered suitable for hares in the environment around the location of capture of the coyotes. The results of this study suggest the presence of the terrestrial cycle of *F. tularensis* in the regions studied.

Keywords : Coyote, ecology, *Francisella tularensis*, geographic information system, microagglutination test, muskrat, PCR, prevalence, snowshoe hare, tularaemia

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	vii
Liste des sigles et des abréviations	viii
Remerciements	xi
Introduction	1
Définitions	2
Recension des écrits	3
1. Historique de la découverte de la bactérie.....	3
2. Agent causal et ses principales caractéristiques	4
3. Pathogénèse et lésions pathologiques.....	6
4. Modes de transmission et manifestations cliniques	8
5. Méthodes diagnostiques	10
6. Tularémie chez l'homme.....	13
6.1 Fréquence des cas déclarés au Canada	13
6.2 Études de séroprévalence au Canada.....	14
6.3 Sources probables d'infection	15
6.3.1 Lagomorphes et rongeurs.....	15
6.3.2 Arthropodes	16
6.3.3 Autres espèces animales	17
6.3.4 Consommation d'eau	18
6.4 Traitements	18

7.	Cycle écologique	20
7.1	Hôtes animaux	21
7.1.1	Lagomorphes	21
7.1.2	Rongeurs	25
7.1.3	Carnivores	33
7.1.4	Oiseaux	36
7.1.5	Amibes	37
7.1.6	Arthropodes	38
7.2	Sources potentielles environnementales	42
7.2.1	Eau et sédiments	42
8.	Intégration des éléments prédominants du cycle écologique de <i>F. tularensis</i>	46
	Objectifs	50
	Exposé et analyses des résultats : Eco-epidemiologic study of <i>Francisella tularensis</i>, the agent of tularemia, in Québec*	51
1.	Abstract	52
2.	Introduction	53
3.	Materials and methods.....	55
3.1	Study area	55
3.2	Carcass collection	55
3.3	Carcass examination	56
3.4	Microagglutination and PCR assays.....	56
3.5	Environmental data.....	58
3.6	Statistical analyses.....	59
4.	Results	61
5.	Discussion	63
6.	Acknowledgments	67
7.	Literature cited	68
8.	Tables	73

9. Figures	80
Discussion.....	83
1. Séroprévalences et prévalences	83
1.1 Lièvre d'Amérique.....	83
1.2 Rats musqués	85
1.3 Coyote.....	86
1.4 Variation des prévalences et séroprévalences entre les études	88
2. Modèles de régression logistique exacte	89
2.1 Caractéristiques individuelles	89
2.2 Caractéristiques environnementales	90
2.3 Différents rayons	92
3. Analyses spatiales.....	93
4. Limites de l'étude.....	94
5. Récapitulation des résultats trouvés	98
6. Orientations futures	100
Conclusion	102
Bibliographie	103
Annexe 1. Tableaux détaillant les études réalisées chez le lièvre d'Amérique, le rat musqué et le coyote	xiii
Annexe 2. Documents relatifs à la prise de données par les trappeurs	xxv

Liste des tableaux

Table I. Descriptive statistics of potential risk factors and results from univariate analyses for seropositivity in 383 ^a coyotes trapped between October 2012 and April 2013 in Québec, Canada.....	73
Table II. Prevalence of antibodies (%) against <i>F. tularensis</i> in coyotes, snowshoe hares and muskrats trapped between October 2012 and April 2013 in Québec, Canada ^a	75
Table III. <i>F. tularensis</i> antibody titer results of agglutination tests performed on coyotes, snowshoe hares and muskrats trapped between October 2012 and April 2013 in Québec, Canada.....	76
Table IV. Final multivariable logistic regression for models “I” predicting <i>F. tularensis</i> seropositivity in trapped coyotes at various geographical scales, Québec, Canada.....	77
Table V. Final multivariable logistic regression for models “II” predicting <i>F. tularensis</i> seropositivity in trapped coyotes at various geographical scales, Québec, Canada.....	78
Table VI. Odds ratio estimates of significant risk factors for model “II” obtained from sensitivity analyses for imperfect sensitivity and specificity of serologic tests in determining status of coyotes, Québec, Canada.....	79
Tableau VII. Études chez le lièvre d’Amérique (<i>Lepus americanus</i>).....	xiii
Tableau VIII. Études chez le rat musqué (<i>Ondatra zibethicus</i>).....	xvii
Tableau IX. Études chez le coyote (<i>Canis latrans</i>).....	xxiii

Liste des figures

- Figure 1.** Taux d'incidence annuel moyen de tularémie humaine par million d'habitants par région sociosanitaire (RSS) du Québec, de janvier 2003 à novembre 2011 (source des données : Institut national de santé publique du Québec, 2011). 14
- Figure 2.** Schéma du cycle écologique de la transmission de *F. tularensis* dans l'environnement : une proposition. 46
- Figure 3.** Distribution of coyotes (*Canis latrans*), snowshoe hares (*Lepus americanus*) and muskrats (*Ondatra zibethicus*), collected from October 2012 to April 2013 by trappers from four regions of Québec, Canada (Lambert conic conform projection). 80
- Figure 4.** Distribution of seropositive (*F. tularensis* antibody titers $\geq 1: 64$) and seronegative ($<1: 64$) coyotes from four regions in Québec, Canada. The red star indicates the location of collection of two seropositive hares (Lambert conic conform projection). 81
- Figure 5.** A proposed causal diagram of variables associated with infection of *F. tularensis* in coyotes (*Canis latrans*). 82

Liste des sigles et des abréviations

°C :	Degré Celcius
ADN :	Acide désoxyribonucléique
Aggl :	Test d'agglutination (non spécifié)
Aggl lam :	Test d'agglutination sur lame
Aggl plaque :	Test d'agglutination sur plaque
Aggl tube :	Test d'agglutination en tube
AUC :	Aire sous la courbe (<i>Area under the curve</i>)
CDC :	Centres pour le contrôle et la prévention des maladies (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CI :	Intervalle de confiance (<i>Confidence interval</i>)
Cult :	Culture bactérienne
DNA :	Acide désoxyribonucléique (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ELISA :	Méthode immuno-enzymatique (<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>)
Exam macro :	Examen macroscopique
<i>F. tularensis</i> :	<i>Francisella tularensis</i>
g :	Gramme
GIHS :	Index global de la qualité de l'habitat du lièvre (<i>Global index of habitat suitability</i>)
GPS :	Système de localisation mondial (<i>Global positioning system</i>)
HLHS :	Habitat de qualité élevée pour le lièvre (<i>High level habitat suitability</i>)
HSM :	Modèle d'indice de qualité de l'habitat (<i>Habitat suitability model</i>)
Inocu emb + Cult :	Inoculation d'embryons de poussins et culture subséquente
Inocu labo + Cult :	Inoculation d'animaux de laboratoire et culture subséquente
Inocu labo + Macro :	Inoculation d'animaux de laboratoire et examen macroscopique
kg :	Kilogramme
km :	Kilomètre
lbs :	Livre
LVS :	Souche vaccinale vivante atténuée (<i>Live vaccine strain</i>)

Micro-aggl :	Test de microagglutination
ml :	Millilitre
MLVA :	Analyse de plusieurs locus VNTR (<i>Multiple loci VNTR analysis</i>)
<i>n</i> :	Nombre
OR :	Rapport de cotes (<i>Odds ratio</i>)
PCR :	Réaction en chaîne par polymérase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
R :	Rayon (<i>Radius</i>)
ROC :	Courbe récepteur-opérateur (<i>Receiver-operator characteristic</i>)
RPM :	Rotation par minute (<i>Rotation per minute</i>)
RSS :	Région sociosanitaire
SIEF :	Système d'information écoforestière
UFC :	Unité formant une colonie
VNC :	État viable, mais non-cultivable (<i>Viable but non culturable</i>)
VNTR :	Répétition en tandem polymorphe (<i>Variable number tandem repeat</i>)

À mes parents,

À mes amis.

Remerciements

Mon tout premier remerciement est dédié à ma directrice de recherche, Dre Julie Arsenault, pour m'avoir offert cette opportunité unique d'accomplir un projet d'une telle envergure dans un domaine qui m'intéresse autant. Merci de m'avoir fait confiance tout au long de ce projet et d'avoir toujours cru en mes compétences! Ta grande disponibilité, ton soutien et tes encouragements tout au long de mon cheminement m'ont permis d'avancer et de me surpasser au-delà de mes attentes. Je te serai toujours reconnaissante d'avoir tenu ce rôle dans mon développement professionnel et personnel. Finalement, merci de m'avoir été un modèle exemplaire et de m'avoir transmis la passion pour l'épidémiologie.

J'aimerais également remercier vivement mon co-directeur, Dr Nick Ogden, pour m'avoir partagé ses connaissances, pour m'avoir fait part de ses conseils judicieux tant appréciés et pour sa grande disponibilité et sa bonne humeur.

Je désire transmettre mes remerciements aux chercheurs du Laboratoire national de microbiologie à Winnipeg, Kym Antonation, Cindi Corbett, Antonia Dibernardo et Robbin Lindsay, pour leur participation active à ce projet. Even though we did not have the opportunity to meet except through emails, it was a great pleasure to work with you.

Mes remerciements vont aussi à Patrick Leighton, pour son implication scientifique et ses commentaires toujours pertinents. Je suis également reconnaissante auprès d'Ariane Massé pour ses nombreux conseils qui ont su me guider tout au long de mon parcours, pour son aide inestimable et son dévouement manifeste à ce projet.

J'ajoute aussi un remerciement spécial à Pierre Canac-Marquis pour m'avoir guidée lors de mes premiers pas dans le monde du trappage et pour son aide précieuse dans la collecte des

échantillons. Je désire également remercier Andres Ivan Ramirez, Josée Guillemette et Jessie Longpré pour leur grande aide apportée dans le travail de laboratoire, ainsi que Sonia Bernier, Huguette Mallet et Thérèse Lanthier pour leur disponibilité et leur patience.

J'aimerais également exprimer ma reconnaissance envers Simon Dufour et Guy Beauchamp pour leur enseignement et leurs conseils judicieux.

Je tiens à remercier spécialement tous les trappeurs ayant participé à ce projet. Sans leur collaboration et leur grand intérêt à contribuer à l'avancement des connaissances scientifiques, ce projet n'aurait jamais été possible.

Je tiens également à remercier l'Agence de la santé publique du Canada, le Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs et le Groupe de recherche en épidémiologie des zoonoses et santé publique (GREZOSP) pour avoir soutenu financièrement ce projet ainsi que le Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT), l'Université de Montréal (Faculté de médecine vétérinaire et la Faculté des études supérieures) et Lucie Besner pour leur généreux appui financier dans la poursuite de mes études.

Finalement, j'aimerais remercier du fond du cœur mes parents pour leur soutien inconditionnel et leurs encouragements constants. L'accomplissement de ce projet de maîtrise leur revient en grande partie. Votre présence à mes côtés a été une source de motivation et de réconfort inestimable.

Merci à tous et toutes!

Introduction

'Few, if any, zoonotic diseases have a broader or more complex host distribution and epizootiology.' (Petersen et Schriefer, 2005)

La tularémie est une maladie zoonotique infectieuse provoquée par la bactérie *Francisella tularensis*. Elle se retrouve à travers l'hémisphère nord, incluant le territoire québécois. Cette maladie revêt une importance particulière pour la santé publique puisqu'il s'agit d'une zoonose. Le lièvre d'Amérique (*Lepus americanus*) et le rat musqué (*Ondatra zibethicus*) sont reconnus comme étant des espèces animales fréquemment affectées par la tularémie au Canada ainsi qu'une source importante d'infection chez l'homme (Wobeser et al., 2009). Le coyote (*Canis latrans*), étant un prédateur du lièvre et du rat musqué, s'expose possiblement à la bactérie via son alimentation et pourrait donc agir comme un indicateur de la circulation de la bactérie dans l'environnement (Gier et al., 1978). Malgré les nombreuses années écoulées depuis la découverte de la bactérie en 1953, ainsi que la grande quantité d'études publiées sur le sujet au cours du dernier siècle, le cycle écologique de *F. tularensis* demeure que partiellement élucidé. Ce projet de recherche a été initié dans le but de mieux comprendre l'écologie de la tularémie au Québec. Ce document met donc l'emphase sur la composante faunique de la tularémie, avec une importance particulière accordée aux trois espèces animales ciblées dans ce projet, soit le lièvre d'Amérique, le rat musqué et le coyote.

Définitions

Afin de mieux orienter la lecture, il importe de définir clairement certains termes utilisés dans ce document. La sensibilité face à un agent pathogène se définit par « *l'aptitude à exprimer cliniquement l'action d'un agent pathogène* » alors que la réceptivité fait référence à « *l'aptitude à permettre le développement ou la multiplication de l'agent pathogène* » (Toma, 1991). Ainsi, pour être une espèce animale sensible, l'animal doit avant tout être réceptif vis-à-vis l'agent pathogène en question. Contrairement à une espèce sensible, un animal résistant se dit « *d'un organisme n'exprimant pas de symptôme à la suite de la contamination par un agent pathogène* » (Toma, 1991). Finalement, le terme réservoir est utilisé pour désigner « *tout être vivant ou tout milieu qui héberge pendant une période relativement prolongée, des agents infectieux susceptibles d'être transmis à l'homme ou à l'animal, et qui favorise le développement de ces agents* » (Jammal et al., 1988).

Les premiers écrits portant sur la tularémie comportent certaines lacunes terminologiques limitant leur interprétation. En effet, au début du 20^e siècle, plusieurs auteurs ne font pas la distinction entre l'ordre des Lagomorphes, qui inclut la famille des Léporidés (lièvres et lapins) et des Ochotonidae (pikas), et l'ordre des Rongeurs (Jellison et Parker, 1945; Jellison et al., 1961; Hopla, 1974). De plus, le terme « lapin » est fréquemment utilisé autant pour désigner un lapin qu'un lièvre. Or, la distinction entre ces espèces animales est d'une importance considérable pour notre compréhension des sources d'infection chez l'homme ainsi que le cycle écologique du pathogène.

Recension des écrits

1. Historique de la découverte de la bactérie

En 1911 dans le comté de Tulare en Californie, George McCoy décrit une nouvelle maladie observée en milieu naturel chez des écureuils terrestres de Californie et ressemblant à la peste. Un an plus tard, la bactérie responsable de cette pseudo- peste retrouvée chez les rongeurs est isolée pour la première fois par McCoy et Chapin. Elle est alors nommée *Bacterium tularensis* (McCoy et Chapin, 1912).

Le premier isolat humain est obtenu par Wherry et Lamb en 1914 à Ohio aux États-Unis chez un travailleur de restaurant qui manifestait une conjonctivite sévère. Il s'agit du premier cas humain documenté pour lequel l'agent étiologique, *Bacterium tularensis*, a été confirmé (Weinberg, 2004). Des descriptions compatibles avec cette maladie ont toutefois été rapportées bien avant cette époque, notamment en 1837 par un médecin Japonais et en 1653 en relation avec une maladie autrefois nommée « lemming fever » observée en Norvège (Pearson, 1975; Weinberg, 2004; Sjöstedt, 2007). À partir de 1920, Edward Francis, un bactériologiste américain en santé publique, dédie ses recherches scientifiques à cette maladie qu'il nomme « Tularémie » (Lundström et al., 2011). Tout au long de sa carrière scientifique, Edward Francis contribue à l'avancement des connaissances sur la tularémie et devient le principal chercheur pionnier de l'époque travaillant sur la tularémie. En 1947, l'agent bactérien est renommé *Francisella tularensis* (*F. tularensis*) en l'honneur de ses travaux considérables (Keim et al., 2007).

2. Agent causal et ses principales caractéristiques

Les bactéries du genre *Francisella* sont de très petits cocobacilles à Gram négatif, pléomorphes, non sporulés, immobiles et aérobiques. Cet agent bactérien se caractérise entre autres par une grande quantité de lipides au niveau de la capsule ainsi que la membrane cellulaire (World Health Organization, 2007). En raison de la très faible dose nécessaire pour causer une infection potentiellement létale chez l'homme par voie respiratoire, *F. tularensis* est considéré comme un agent potentiel de bioterrorisme (classe A d'après les centres pour le contrôle et la prévention des maladies aux États-Unis (CDC)) (Thomas et Schaffner, 2010).

Francisella est le seul genre appartenant à la famille *Francisellaceae* et comprend deux espèces distinctes : *Francisella tularensis*, l'agent causal de la tularémie, et *Francisella philomiragia*. L'espèce *F. tularensis* se divise ensuite en quatre sous-espèces actuellement reconnues : *F. tularensis tularensis* (type A), *F. tularensis holarctica* (type B), *F. tularensis mediasiatica* et *F. tularensis novicida* (World Health Organization, 2007). Chacune de ces sous-espèces possède des caractéristiques biochimiques et de virulence différentes (Keim et al., 2007). Les types A et B sont les deux sous-espèces prédominantes à l'origine de maladies humaine et animale. La majorité des cas de tularémie humaine diagnostiqués aux États-Unis semble être attribuée au type A (Staples et al., 2006).

F. tularensis tularensis (type A) est retrouvée presque exclusivement en Amérique du Nord à l'exception d'un seul cas documenté en Europe en 1998 (Guryčová, 1998). Cette sous-espèce peut être davantage divisée en deux sous-populations génétiquement et géographiquement distinctes : Le type AII se retrouve principalement au niveau des régions arides entre les montagnes Rocheuses et les montagnes Sierra Nevada alors que le type AI se retrouve au sein de certains états américains sud-est (Arkansas, Missouri, Oklahoma) ainsi qu'au long de la côte atlantique (Staples et al., 2006). Le type AI se distingue par une virulence beaucoup plus grande que le type AII.

F. tularensis holarctica (type B), la deuxième sous-espèce cliniquement importante, s'observe à travers l'hémisphère nord (Amérique du Nord, Asie et Europe). Cette sous-espèce

bactérienne semble être associée principalement à des cours d'eau (Staples et al., 2006; Keim et al., 2007). Traditionnellement, le type B a toujours été reconnu comme étant une sous-espèce beaucoup moins virulente que le type A. Récemment, il a été rapporté que le type B semble causer une infection plus sévère que le type AII (Staples et al., 2006; Kugeler et al., 2009).

F. tularensis mediasiatica, caractérisée par une virulence modérée similaire au type B, est rarement associée à la tularémie chez l'homme et a été isolée occasionnellement chez des animaux en Asie centrale (Broekhuijsen et al., 2003; World Health Organization, 2007).

F. tularensis novicida et *F. philomiragia* sont des agents moins pathogéniques, rarement isolés, et affectant principalement des individus immunosupprimés. Ces deux bactéries semblent associées à un environnement aquatique (Sjöstedt, 2007).

F. tularensis résiste au froid et à la congélation, puisque la bactérie a été retrouvée dans des échantillons de glace et qu'un taux de recouvrement de 94% a été observé suite à la congélation de tissus d'animaux (Parker et al., 1951; Petersen et al., 2004b). La bactérie peut persister pendant plusieurs semaines dans un environnement humide et froid. La survie de l'organisme a été démontrée notamment dans l'eau, la boue et les carcasses en décomposition. (Parker et al., 1951; Hopla, 1974; Bell, 1979). La bactérie est détruite par certains agents antimicrobiens et désinfectants, dont l'hypochlorite de sodium et les ammoniums quaternaires (Cunha, 2002).

3. Pathogénèse et lésions pathologiques

F. tularensis est une bactérie intracellulaire facultative. Elle possède la capacité à pénétrer et se multiplier à l'intérieur de plusieurs types de cellules chez les mammifères : principalement les cellules phagocytaires, telles que les macrophages, mais aussi certaines cellules non-phagocytaires telles que les hépatocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Sjöstedt, 2006; Keim et al., 2007). Après avoir été ingérée par le macrophage, *F. tularensis* parvient à se libérer du phagosome pour avoir alors accès aux nutriments contenus dans le cytosol qui lui sont nécessaires à sa réplication. Lorsque les nutriments sont épuisés, un mécanisme d'apoptose de la cellule infectée est déclenché. Ce processus permet de libérer un grand nombre de micro-organismes prêts à envahir d'autres macrophages riches en nutriments, sans pour autant provoquer de réponse inflammatoire (Sjöstedt, 2006). De plus, comparativement aux autres bactéries à Gram négatif, *F. tularensis* possède un lipopolysaccharide (LPS) inhabituel, beaucoup moins pyrogénique, qui provoque une faible réponse inflammatoire. Les mécanismes de virulence de *F. tularensis* reposent essentiellement sur l'habileté à s'adapter dans un environnement hostile intracellulaire tout en minimisant l'activation de la réponse de l'hôte (Barker et Klose, 2007). L'immunité cellulaire semble être le principal mécanisme de défense de l'hôte alors que l'immunité humorale joue un rôle limité (Tärnvik, 1989).

L'infection par *F. tularensis* se fait au travers de la peau, intacte ou lésée, ou d'une membrane muqueuse (Francis, 1937). L'inoculation expérimentale de seulement 10 à 50 organismes appartenant à la souche type A par voie sous-cutanée ou aérosol suffit pour causer une infection sévère chez l'homme, alors que l'inoculation de 12 000 bactéries du type B entraîne généralement une infection plutôt bénigne et auto-limitante (McCrumb Jr, 1961; Saslaw et al., 1961; Cross et al., 2007). Après avoir pénétré son hôte, *F. tularensis* se multiplie au site d'inoculation et se dirige vers les nœuds lymphatiques avoisinants. Par la suite, une dispersion hématogène et lymphatique peut occasionner une septicémie ainsi que l'invasion de plusieurs organes tels que le foie, la rate, les reins, les intestins et le système nerveux central (Thomas et Schaffner, 2010).

Chez les animaux, les lésions pathologiques observées dépendent de la sensibilité de l'espèce animale affectée (World Health Organization, 2007). De façon générale, les lésions macroscopiques typiques se caractérisent par la présence de petits points blanchâtres, mesurant 2 mm ou plus de diamètre, distribués à la surface de plusieurs organes cibles. Plus spécifiquement, un animal très sensible présentera, à la nécropsie, un bon état de chair ainsi que des lésions microscopiques suggestives d'une réaction inflammatoire aiguë, c'est-à-dire une nécrose multifocale pouvant être retrouvée principalement sur la rate, le foie, les nœuds lymphatiques, la moelle osseuse et les poumons. En revanche, les lésions observées chez un animal modérément sensible semblent plutôt compatibles avec un processus inflammatoire chronique caractérisé par un mauvais état de chair ainsi que, histologiquement, la présence de granulomes sur une multitude d'organes tels que les nœuds lymphatiques, le foie, la rate, les poumons et les reins. Ces lésions granulomateuses renferment un centre nécrotique et l'accumulation de macrophages, cellules épithélioïdes ou fibroblastes en périphérie de la lésion forme une bordure distincte (Morner et al., 1988; Mörner, 1992; Valli, 2007; Gyuranecz et al., 2010)

Les lésions macroscopiques de la tularémie chez l'homme sont similaires à celles décrites chez les animaux, c'est-à-dire la présence de petits points jaunâtres ou blanchâtres parsemés à la surface de certains organes fréquemment atteints, soit le foie, la rate, les poumons et les nœuds lymphatiques, accompagnée d'une lymphadénite. À l'examen microscopique, on note de petits foyers nécrotiques qui évoluent vers une forme chronique avec un centre caséux bordé par une zone marginale de cellules épithélioïdes. Les granulomes ainsi formés sont très similaires aux lésions observées lors de tuberculose (Goodpasture et House, 1928; Rosai, 2004; Eliasson et al.; Stephen et al., 2006).

4. Modes de transmission et manifestations cliniques

Chez les animaux, tout comme chez les humains, la maladie peut s'acquérir et se manifester de multiples façons (Feldman, 2003). Or, les différentes voies de transmission et expressions cliniques chez les animaux sauvages sont malheureusement peu documentées et varient d'une espèce animale à l'autre. De façon générale, la sévérité des signes cliniques dépend essentiellement de la sensibilité de l'espèce animale infectée, l'infection pouvant être agressive et létale, bénigne et auto-limitante, ou asymptomatique (World Health Organization, 2007).

L'infection à *F. tularensis* chez l'homme peut s'acquérir via cinq voies de transmission : le contact cutané, le contact oculaire, l'ingestion de nourriture ou d'eau contaminée, l'inhalation de gouttelettes d'eau ou de particules contaminées et la transmission par les arthropodes. La période d'incubation varie typiquement entre trois et six jours, pouvant aller jusqu'à deux semaines (Eliasson et al., 2006; Thomas et Schaffner, 2010). Les premières manifestations cliniques de la maladie sont habituellement non-spécifiques, d'apparition soudaine et incluent fièvre, frissons, maux de tête, malaise et douleurs musculaires (Eliasson et al., 2006). Dans la majorité des cas, la tularémie se caractérise par une hypertrophie sévère des nœuds lymphatiques, localisée à proximité de la voie d'entrée de la bactérie (Stephen et al., 2006; Sjöstedt, 2007). Différentes formes cliniques peuvent être observées et dépendent grossièrement de la voie d'acquisition (Bell, 1979). La forme ulcéroglandulaire, la plus fréquente aux États-Unis et en Europe, se manifeste par l'apparition d'un ulcère cutané au site d'entrée de la bactérie (Staples et al., 2006; Sjöstedt, 2007). Cette forme s'observe suite à une infection par contact cutané, principalement lors de la manipulation d'une carcasse animale infectée, ou suite à une morsure ou piqûre d'un arthropode (Thomas et Schaffner, 2010). La forme glandulaire est identique à la forme ulcéroglandulaire, à l'exception de l'absence de lésion cutanée (Dennis et al., 2001). L'introduction de l'organisme par contact oculaire entraîne l'apparition de la forme oculoglandulaire, caractérisée par une conjonctivite unilatérale et douloureuse (Dennis et al., 2001). La forme oropharyngée est habituellement acquise suite à l'ingestion de particules contaminées et se manifeste par une pharyngite ou une amygdalite douloureuse. La forme pulmonaire survient après l'inhalation d'aérosols

contaminés ou suite à la dissémination hémotogène de la bactérie à partir d'une autre forme (McCrum Jr, 1961; Thomas et Schaffner, 2010). Il s'agit d'une manifestation rare, mais potentiellement létale, particulièrement lorsque le type A est en cause. Dans ces cas, le taux de mortalité peut atteindre 60% en l'absence de l'administration d'un traitement adéquat (Dennis et al., 2001; Feldman, 2003; Stephen et al., 2006; Sjöstedt, 2007). Finalement, la forme thyphoïdale est une manifestation atypique, caractérisée par la présence de signes systémiques qui ne sont pas associés à une voie d'entrée particulière, tels qu'une fièvre sévère, des douleurs musculaires, des vomissements et de la diarrhée (Sjöstedt, 2007). Peu importe la voie d'acquisition, la maladie peut progresser vers une pleuropneumonie, une méningite, une méningo-encéphalite, une infection ostéo-articulaire et un choc septique (Feldman, 2003; Maurin et Pelloux, 2014). Une issue fatale est possible suite à la défaillance d'un organe, un syndrome de réponse inflammatoire systémique, une coagulation intravasculaire disséminée ou un syndrome de détresse respiratoire aiguë (Dennis et al., 2001; Stephen et al., 2006).

5. Méthodes diagnostiques

Un diagnostic de tularémie peut être confirmé par l'isolement de *F. tularensis* à partir d'échantillons cliniques tels que du sang ou des tissus (Feldman, 2003). Par contre, son isolement est particulièrement fastidieux compte tenu des conditions singulières requises pour sa culture. Ce microorganisme croît de façon très lente à 35-37°C et nécessite un milieu riche en cystéine, cystine ou toute autre source de sulfhydryle, tel que le milieu Francis, le milieu McCoy et Chapin, la gélose modifiée Thayer-Martin, la gélose enrichie en glucose, cystéine et thiamine, la gélose cœur-cystine ou la gélose chocolat (Morner et Addison, 2001; World Health Organization, 2007). De plus, la culture de *F. tularensis* est difficilement réalisable à partir d'échantillons de tissus provenant d'animaux morts en raison de la prolifération d'*Escherichia coli* ou toutes autres bactéries (Mörner, 1992; Morner et Addison, 2001; Petersen et al., 2004b). *F. tularensis* peut également être isolée par infection expérimentale d'animaux de laboratoire, tels que la souris ou le cochon d'Inde, à partir de tissus ou cultures infectés (Eliasson et al., 2006; World Health Organization, 2007). Lorsqu'un isolat est obtenu, le type A peut être différencié du type B par sa capacité à fermenter le glycérol (Petersen et Schriefer, 2005). En raison de la nature très infectieuse de *F. tularensis*, la culture bactérienne devrait être effectuée uniquement dans des laboratoires d'un niveau de confinement 3. La culture ainsi que l'inoculation animale ne sont donc pas recommandées pour des identifications de routine (Eliasson et al., 2006). L'immunofluorescence est une technique occasionnellement utilisée pour confirmer l'organisme obtenu en culture, ou encore pour identifier directement la bactérie dans les tissus animaux ou humains (Eliasson et al., 2006; World Health Organization, 2007).

La détection d'anticorps spécifiques dirigés contre *F. tularensis* dans le sérum s'effectue principalement par le test d'agglutination en tube, le test de microagglutination ou la méthode immuno-enzymatique (ELISA). Chez l'homme, les anticorps sont détectables deux à trois semaines après l'apparition des signes cliniques (Feldman, 2003). Un délai existe également chez les animaux d'après des études expérimentales réalisées chez quelques espèces animales, quoique peu documenté jusqu'à ce jour (Lundgren et al., 1957; Marchette, 1960; Morner et Sandstedt, 1983). Ainsi, l'utilité des épreuves sérologiques chez des espèces animales

sensibles est probablement limitée, puisque ces animaux peuvent mourir avant le développement d'anticorps (Morner et Addison, 2001). Les immunoglobulines des classes A, G et M peuvent persister pendant plusieurs années dans l'organisme humain; un résultat sérologique positif n'est donc pas systématiquement indicateur d'une infection récente (Syrjälä et al., 1986; Bevanger et al., 1994). Le diagnostic sérologique d'une infection récente chez l'homme est confirmé lorsque le titre d'anticorps est 4 fois plus élevé entre 2 échantillons sanguins prélevés à 2-4 semaines d'écart ou lorsqu'un seul titre d'anticorps obtenu est supérieur à 1:128 pour la microagglutination et 1:160 pour l'agglutination en tube (Dennis et al., 2001; World Health Organization, 2007; Mead et Petersen, 2009). Des réactions croisées avec des anticorps dirigés contre les bactéries *Brucella*, *Yersinia* et *Proteus* sont possibles, particulièrement pour les tests d'agglutination (Porsch-Özcürümez et al., 2004; Sharma et al., 2013). Il a été démontré que la combinaison de l'ELISA et du buvardage de western est une approche diagnostique appropriée (Porsch-Özcürümez et al., 2004). Néanmoins, les épreuves sérologiques ne peuvent pas différencier les sous-espèces de *F. tularensis* en cause (Svensson, 2009).

Plusieurs méthodes par réaction en chaîne de polymérisation (PCR) ont été décrites pour la détection de l'acide désoxyribonucléique (ADN) de *F. tularensis* (World Health Organization, 2007). Les tests PCR démontrent généralement une forte sensibilité, comparativement à la culture bactérienne, et permettent une détection rapide de *F. tularensis* dans les échantillons (Johansson et al., 2004). La PCR multiplexe en temps réel a été récemment développée et se distingue par une sensibilité, spécificité et rapidité supérieures à la PCR conventionnelle (Johansson et al., 2004; Petersen et Schriefer, 2005; World Health Organization, 2007; Mead et Petersen, 2009). Certaines PCR, dont la PCR multiplexe en temps réel, permettent également la quantification ainsi que l'identification de la sous-espèce de *F. tularensis* en cause (World Health Organization, 2007; Abril et al., 2008; Mead et Petersen, 2009). Récemment, le développement d'une nouvelle méthode d'analyse génétique, soit l'analyse de plusieurs locus ayant un nombre variable de séquences répétées en tandem (VTNR – *Variable Number of Tandem Repeat*) (MLVA), permet de faire la distinction entre les souches de *F. tularensis*. Cette technique a le potentiel de retracer l'origine de la souche ou la source

d'une éclosion et offre de nouvelles possibilités pour des études en épidémiologie moléculaire (World Health Organization, 2007).

6. Tularémie chez l'homme

6.1 Fréquence des cas déclarés au Canada

Le premier cas de tularémie chez l'homme au Canada a été diagnostiqué en 1930, près de Timmins en Ontario (McNabb, 1930). Subséquemment, la déclaration des cas de tularémie humaine est devenue obligatoire au Canada de 1930 jusqu'à 1982 (Agence de la santé publique du Canada, 2014). Elle est ensuite redevenue déclarable en 2002, et ce, jusqu'à ce jour. La tularémie est également une maladie à déclaration obligatoire au Québec (Santé et services sociaux Québec, 2014). Entre 1940 et 1981, un total de 289 cas de tularémie chez l'homme a été déclaré au Canada, incluant 12 décès causés par la maladie (Agence de la santé publique du Canada, 2014). De 2003 à 2011, 93 cas humains ont été rapportés au Canada, dont plus de la moitié provenant de la province de Québec (Agence de la santé publique du Canada, 2014). Effectivement, durant cette même période, environ 3 à 10 cas d'infection à *F. tularensis* ont été déclarés par année au Québec, pour un total de 58 cas (Institut national de santé publique du Québec, 2011). Le taux d'incidence annuel moyen de tularémie par million d'habitants au Québec entre 2003 et 2011 est présenté à la figure 1 par région sociosanitaire (RSS). Le taux réel d'infection humaine est fort probablement plus élevé que l'indiquent ces données, puisque celles-ci ne sont pas ajustées pour la sous-déclaration probable des cas atypiques, asymptomatiques ou bénins.

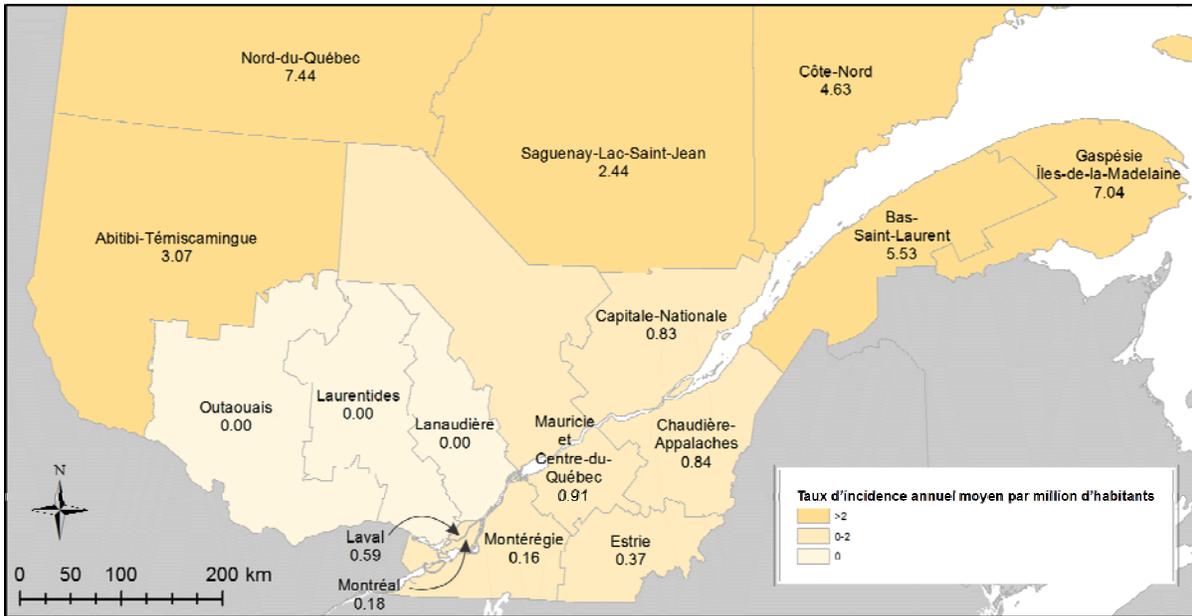


Figure 1. Taux d'incidence annuel moyen de tularémie humaine par million d'habitants par région socio-sanitaire (RSS) du Québec, de janvier 2003 à novembre 2011 (source des données : Institut national de santé publique du Québec, 2011).

6.2 Études de séroprévalence au Canada

À travers les études de séroprévalence, des anticorps dirigés contre *F. tularensis* ont été détectés chez l'homme dans presque toutes les provinces et territoires étudiés au Canada, soit le Québec, la Colombie-Britannique, le Territoire du Nord-Ouest, le Yukon, l'Alberta, la Saskatchewan et l'Ontario. Les séroprévalences rapportées au Canada varient entre 0% et 28.3%. Chez des trappeurs dans la région de la ville de Québec, la séroprévalence a été associée au nombre de rats musqués trappés (Levesque et al., 1995). Selon une étude réalisée chez des résidents du Nunavik au Québec, être âgé de ≥ 50 ans comparativement à 18-29 ans et demeurer dans la région de la baie d'Ungava comparativement à la région d'Hudson sont associés à un risque plus élevé de séropositivité (Messier et al., 2012). Finalement, des analyses statistiques univariées démontrent que la séropositivité est significativement associée aux activités de pêche, de chasse et de trappe au printemps chez un échantillon de trappeurs et chasseurs ainsi que leur conjointe demeurant dans la région de Mistissini, un village cri au Québec (Lévesque et al., 2007). En revanche, aucune association statistiquement significative

n'a été détectée entre la présence d'anticorps contre *F. tularensis* et les activités de trappe et de chasse ou la manipulation de viande crue dans trois études réalisées sur des échantillons aléatoires de la population dans la région du Nord-du-Québec (Campagna et al., 2011; Messier et al., 2012; Sampasa-Kanyinga et al., 2012).

6.3 Sources probables d'infection

Une multitude de sources potentielles d'infection à *F. tularensis* ont été rapportées chez l'homme, qu'elles soient de nature animale ou environnementale. La transmission d'homme à homme n'a toutefois pas été documentée jusqu'à présent (World Health Organization, 2007). Les lagomorphes, les rongeurs sauvages ainsi que les arthropodes sont considérés les principales sources de la tularémie chez l'homme depuis la découverte de la maladie (Francis, 1922). L'importance associée à chaque source d'infection pour l'homme varie de façon spatio-temporelle. Seules les sources les plus fréquemment rapportées seront abordées dans cette section.

6.3.1 Lagomorphes et rongeurs

Aux États-Unis, le lapin à queue blanche (*Sylvilagus floridanus*) est considéré le principal responsable de la transmission de la tularémie à l'homme, particulièrement au début du 20^{ième} siècle, d'où l'appellation très répandue de 'fièvre du lapin' pour désigner la maladie (Francis, 1937; Jellison et Parker, 1945; Mörner, 1992; Telford III et Goethert, 2010). Ainsi, les données rapportées par Jellison en 1961 permettent d'estimer que parmi tous les cas de tularémie humaine rapportés aux États-Unis, 70% sont associés à un contact avec le lapin à queue blanche contre seulement 1% avec le lièvre d'Amérique et 19% avec d'autres espèces de lapins ou de lièvres (Francis, 1937; Jellison et al., 1961). Il est toutefois possible que cette forte association avec le lapin à queue blanche provienne de la popularité à chasser cet animal à cette époque (Yeatter et Thompson, 1952). Selon une étude rétrospective réalisée aux États-Unis entre 1964 et 2004, 49% (65/133) des infections humaines investiguées où la source potentielle a été déterminée étaient causées par un contact direct avec un animal, principalement le lagomorphe (Staples et al., 2006).

Selon une recherche effectuée par Wobeser concernant les éclosions d'infections humaines associées à des lagomorphes et des petits rongeurs sauvages au Canada, les trois sources d'infection les plus fréquentes retrouvées au Canada sont 1) le lièvre d'Amérique (43%, 30/69), 2) le rat musqué (32%, 22/69) et 3) le castor (*Castor canadensis*) (6%, 4/69). Selon l'auteur, la plus forte proportion de cas attribuée aux rats musqués comparativement aux castors peut s'expliquer par le plus grand nombre de trappeurs de rats musqués ou de rats musqués trappés au total. Au Québec, la majorité des cas humains ont été associés au lièvre d'Amérique (24/29), suivi du rat musqué (4/29) et de la marmotte commune (*Marmota monax*) (1/29). Le rat musqué a été associé à la tularémie humaine en Alberta, Saskatchewan, Manitoba, Ontario, Québec et Territoire du Nord-Ouest, alors que le lièvre d'Amérique était une source d'infection à *F. tularensis* à travers toutes les provinces du Canada (Wobeser et al., 2009).

En Eurasie, les petits rongeurs semblent être de grande importance pour la transmission de la tularémie chez l'homme, plus particulièrement le campagnol commun (*Microtus arvalis*) et le grand campagnol (*Arvicola amphibius*) (Karpoff et Antonoff, 1936; Hopla, 1974; Pearson, 1975; Keim et al., 2007). Le lièvre d'Europe (*Lepus europaeus*) et le lièvre du Japon (*Lepus brachyurus*) sont des sources importantes d'infection chez l'homme en Europe centrale et au Japon respectivement (Hopla, 1974; Keim et al., 2007).

6.3.2 Arthropodes

Aux États-Unis, une des sources prédominantes d'infection par *F. tularensis* à l'homme se fait par l'entremise de morsures de tiques, essentiellement *Amblyomma americanum*, *Dermacentor andersoni* et *Dermacentor variabilis* (Keim et al., 2007). Les mouches tabanidés telles que *Chrysops discalis* jouent également un rôle important dans la transmission de l'infection à l'homme dans l'Ouest américain (Jellison, 1950). Selon la même étude rétrospective réalisée aux États-Unis entre 1964 et 2004, 41% (54/133) des infections humaines dont la source potentielle a été déterminée étaient attribués à une transmission par des arthropodes, principalement la tique, et 81% (44/54) des cas attribués aux arthropodes étaient associés au

type A (Staples et al., 2006). De plus, de façon générale aux États-Unis, il a été rapporté que la distribution spatiale des cas humains associés au type AI semble corrélée à celle des tiques *Amblyomma americanum* et *Dermacentor variabilis*, alors que la distribution spatiale des cas humains associés au type AII semble corrélée à la distribution des tiques *Dermacentor andersoni* et la mouche *Chrysops discalis* (Keim et al., 2007; Petersen et al., 2009). En Suède, en Finlande et en Russie, les moustiques, notamment *Aedes cinereus* et *Ochlerotatus excrucians*, semblent être les principaux vecteurs de la tularémie chez l'homme et sont occasionnellement à l'origine d'épidémies massives (>400 cas), alors que certains tabanidés tels que *Chrysops relictus* et *Haematopota pluvialis* ont également été impliqués dans la transmission d'infection à l'homme en Russie (Petersen et al., 2009). Au Canada, quelques cas humains de tularémie causés par des arthropodes ont été rapportés, notamment un cas au Nunavut en 1991 et un cas en Ontario en 1968, desquels les sources de contamination ont été vraisemblablement attribuées à un moustique et une tique respectivement (Evans, 1969; Silverman et al., 1990).

6.3.3 Autres espèces animales

Plusieurs autres espèces animales ont également été source d'infection pour l'homme, mais à une fréquence moindre, incluant les cervidés, les ursidés et les canidés (Karpoff et Antonoff, 1936; Rand, 1949; Morner et Addison, 2001). Pour ce qui est des coyotes, seuls trois cas d'infection humaine liés à un contact avec cette espèce ont été retrouvés dans la littérature, dont un individu ayant subi une morsure d'un jeune coyote en 1925 au Montana et deux individus ayant manipulé une carcasse de coyote en 1929 au Nouveau-Mexique et en 1944 en Colombie-Britannique (Parker et Francis, 1926; Kunkel, 1930; Black et Thomson, 1958). Quelques cas humains de tularémie suggérant une transmission suivant un contact direct avec les oiseaux ont également été rapportés dans la littérature (Kursban et Foshay, 1946; Padeshki et al., 2010).

6.3.4 Consommation d'eau

L'eau a été suggérée comme source de contamination probable pour la première fois par Miller en 1934 en se basant sur les résultats d'une investigation d'écllosion (Karpoff et Antonoff, 1936). Par la suite, de nombreux cas humains ont été reliés à la consommation d'eau contaminée, principalement en Europe, et plus particulièrement en Turquie (Greco et al., 1987; Helvacı et al., 2000; Akalin et al., 2009).

6.4 Traitements

L'infection à *F. tularensis* peut être traitée par une antibiothérapie. La streptomycine et la gentamycine, deux antibiotiques de la classe des aminoglycosides, sont les antibiotiques recommandés pour le traitement des cas sévères de tularémie en Amérique du Nord (Enderlin et al., 1994; World Health Organization, 2007; Boisset et al., 2014). Les fluoroquinolones, tels que la ciprofloxacine, sont utilisées lorsque les signes cliniques de tularémie sont légers à modérés (Boisset et al., 2014). Les agents bactériostatiques peuvent être une alternative, tels que les tétracyclines, mais doivent être utilisés avec précaution en raison du risque accru de récurrences lorsque le traitement est administré sur une période insuffisamment longue (World Health Organization, 2007). Ce dernier traitement (i.e. tétracyclines) est principalement utilisé en Europe, où seul le type B est retrouvé (Eliasson et al., 2006; Svensson, 2009). *F. tularensis* démontre une résistance à plusieurs bêta-lactames, incluant la pénicilline (World Health Organization, 2007; Mead et Petersen, 2009). L'inefficacité de cette classe d'antibiotique provient probablement de la sécrétion de bêta-lactamase par *F. tularensis* et de la mauvaise pénétration de ces antibiotiques à l'intérieur des cellules eucaryotes (Boisset et al., 2014). Suite à l'instauration des traitements aux antibiotiques dans les cas de tularémie, le taux de mortalité associé à la tularémie est passé de 22.9% au Canada et 9.5% aux États-Unis à moins de 5% (Walker et Moore, 1971; Dennis et al., 2001; Maurin et Pelloux, 2014).

Aucun vaccin sécuritaire et efficace n'est actuellement disponible contre la tularémie. La souche vaccinale la plus largement étudiée s'avère être la souche vaccinale vivante atténuée (LVS) qui a été développée à partir d'une souche virulente *F. tularensis* type B provenant de

l'ex-Union Soviétique. Son utilisation n'est toutefois pas autorisée pour usage général. De plus amples recherches sont en cours afin de développer un nouveau vaccin ou de permettre l'autorisation de l'utilisation de la souche vaccinale LVS (Eliasson et al., 2006; World Health Organization, 2007; Mead et Petersen, 2009).

7. Cycle écologique

La tularémie est une maladie qui sévit sous forme d'éclotions récurrentes dans certaines régions. Une grande variation spatiale est observée dans la distribution des cas, où des zones complètement dépourvues de tularémie se situent à proximité de zones endémiques (World Health Organization, 2007). Plusieurs années ou décennies peuvent s'écouler entre les éclotions dans une même localisation et ces événements se manifestent généralement de façon imprévisible. La tularémie possède également le potentiel d'émerger dans de nouveaux territoires géographiques, tel que rencontré notamment dans certaines régions de la Suède et en Espagne récemment (Eliasson et al., 2006).

Ces phénomènes seraient le résultat d'un cycle écologique complexe, caractérisé par une diversité étonnante en termes de voies de transmission et d'hôtes potentiels. En effet, la bactérie a été retrouvée chez un vaste éventail d'hôtes, soit plus de 190 espèces de mammifères, 23 espèces d'oiseaux, 3 espèces d'amphibiens et 88 espèces d'invertébrés (Hopla, 1974; Morner et Addison, 2001; Foley et Nieto, 2010). Il est vraisemblable que plusieurs cycles écologiques de la tularémie coexistent dans la nature et se distinguent par des réservoirs, des modes de transmission, des vecteurs et des hôtes différents (Wobeser et al., 2009). Ainsi, compte tenu des caractéristiques épidémiologiques dissemblables des deux sous-espèces (i.e. type A type B), il a souvent été proposé que celles-ci étaient impliquées dans deux cycles écologiques distincts (Mörner, 1992; Keim et al., 2007; Telford III et Goethert, 2010). Le type A serait principalement impliqué dans un cycle terrestre, où la transmission s'effectue dans un environnement assez sec et implique essentiellement les lagomorphes et les tiques. En revanche, le type B serait plutôt impliqué dans un cycle aquatique; l'infection par le type B est fréquemment reliée à un environnement aquatique, associée principalement à des petits rongeurs et des animaux semi-aquatiques à l'échelle mondiale, ainsi qu'à des moustiques et des tiques en Eurasie. À travers les documents retrouvés dans la littérature, il n'existe toutefois pas de démarcation claire entre ces deux cycles tout comme il est difficile de définir précisément à quel cycle appartient chacun des vecteurs et hôtes potentiels de la bactérie; ainsi, une interaction existe possiblement entre les deux cycles écologiques décrits.

Plus de 100 ans après la première isolation de *F. tularensis*, le cycle écologique de cet agent pathogène demeure mal compris. D'une part, les nombreuses études portant sur l'épidémiologie de la tularémie chez l'homme nous offrent possiblement qu'un aperçu de l'écologie de *F. tularensis* (Telford III et Goethert, 2010). En effet, dans le cycle écologique de *F. tularensis*, l'homme ne serait qu'un hôte accidentel lorsqu'il pénètre les foyers naturels de la bactérie, par exemple lors d'activités agricoles, forestières, de trappe ou de chasse (Pavlovsky et al., 1966; Hopla, 1974; Morner et Addison, 2001). D'autre part, les études spécifiques sur l'écologie de *F. tularensis* n'ont pas permis jusqu'à présent d'apporter des informations suffisantes pour bien comprendre son ou ses cycles écologiques et d'identifier les éléments clés influençant la transmission de *F. tularensis* en nature. Entre autres, l'importance réelle des vecteurs arthropodes, les réservoirs spécifiques à chaque cycle écologique et les déterminants essentiels à la persistance de *F. tularensis* dans l'environnement entre les éclosions n'ont pas été élucidés jusqu'à présent. Au cours des prochaines sections, l'épidémiologie de l'infection chez les principaux hôtes de *F. tularensis* sera présentée. L'emphase sera mise sur les trois espèces animales ciblées dans ce projet, soit le lièvre d'Amérique, le rat musqué et le coyote.

7.1 Hôtes animaux

7.1.1 Lagomorphes

7.1.1.1 Lièvre d'Amérique (*Lepus americanus*)

Cette section traite uniquement des documents qui spécifient clairement le lièvre d'Amérique comme espèce animale en cause.

Voies d'acquisition de la bactérie

Depuis les premiers écrits sur la tularémie, il est généralement considéré que la transmission de l'infection chez le lièvre s'effectue principalement par l'entremise des arthropodes, notamment la tique du lièvre (*Haemaphysalis leporis-palustris*) (Francis, 1937). D'ailleurs,

selon une étude réalisée sur le territoire québécois, tous les lièvres d'Amérique examinés ($n = 52$) étaient infestés par cette tique, avec une abondance moyenne de 220 individus par lièvre (Cayouette, 1993). À l'exception d'une transmission expérimentale via la tique *Dermacentor andersoni*, aucune étude n'a été trouvée dans la littérature permettant d'évaluer l'efficacité de la transmission par les autres voies d'infection possibles chez le lièvre d'Amérique (Spencer et Francis, 1924).

Fréquence de l'infection

Au Canada, au moins sept cas de tularémie ont été diagnostiqués chez le lièvre d'Amérique avant 2009, répartis dans sept provinces (Wobeser et al., 2009). D'après les études réalisées dans certaines régions endémiques au Canada (Tableau VII de l'annexe 1), des anticorps ont été détectés chez un très faible pourcentage de lièvres d'Amérique, avec une séroprévalence de 0.13% en Alberta entre 1961 et 1969 (Hoff et al., 1970), 1.55% en Nouvelle-Écosse entre 1976 et 1978 (Akerman et Embil, 1982), 0% à l'Île-du-Prince-Édouard entre 1976 et 1979 (Akerman et Embil, 1982), 0% au Québec en 1992 (Cayouette, 1993) et 0% en Alberta en 1976 (Zarnke et Yuill, 1981) (Tableau VII de l'annexe 1). Cette dernière étude menée en Alberta a toutefois utilisé un seuil d'anticorps plutôt élevé (1 :400), ce qui peut avoir diminué la sensibilité du test. Mac Lulich (1937) rapporte une séroprévalence relativement plus élevée, soit 14% (4/29) dans différentes régions de l'Ontario entre 1932 et 1935 (Mac Lulich, 1937).

D'autres études ont plutôt été réalisées suite à des éclosions confirmées ou soupçonnées de tularémie (Tableau VII de l'annexe 1). Une séroprévalence de 4% (1/25) a été trouvée chez des lièvres d'Amérique suite à une éclosion chez une population de rats musqués (Ditchfield et al., 1960). De plus, une prévalence très faible a été rapportée chez des lièvres d'Amérique, soit 4.2% (1/24), en Alaska suite à l'observation d'un fort taux de mortalité chez ces lagomorphes (Miller, 1974). Il est par contre difficile d'établir si cette faible prévalence résulte de la difficulté à isoler la bactérie sur des spécimens provenant d'animaux morts ou du réel faible pourcentage de lièvres d'Amérique infectés lorsque la bactérie circule dans l'environnement.

Facteurs de risque de l'infection

Il a été suggéré qu'une forte densité dans la population du lièvre d'Amérique, retrouvée lors du pic de leur cycle d'abondance et associée à une infestation sévère de tiques sur les lièvres, pourrait entraîner un risque accru d'exposition à *F. tularensis* dans cette population (Green et Shillinger, 1932, 1935; Green, 1943; Jellison et al., 1961; Rausch, 1972). Toutefois, aucune donnée concernant l'impact réel de cette variable sur le risque d'infection chez le lièvre d'Amérique n'a été trouvée dans la littérature.

Sensibilité au développement de la maladie

Au début du 20^e siècle, il était généralement présumé que l'introduction de *F. tularensis* dans une population de lièvres d'Amérique entraînerait une éclosion fulgurante et la décimation d'un grand nombre d'individus. En effet, il était alors suggéré que la tularémie serait responsable du déclin observé à tous les 7 à 10 ans de la densité de la population de lièvres d'Amérique (Green et Shillinger, 1935). Toutefois, basés sur plusieurs années d'investigation des cycles d'abondance du lièvre, certains auteurs ont par la suite réfuté cette première hypothèse (Mac Lulich, 1937; Green, 1939). Par ailleurs, Green rapporte la détection d'une éclosion fatale de tularémie au Minnesota chez une population de lapins à queue blanche cohabitant dans le même environnement que des lièvres apparemment sains, dont certains individus étaient séropositifs (Green et Shillinger, 1932, 1935). De plus, aucune lésion macroscopique n'a été observée chez une forte proportion de lièvres d'Amérique infectés d'après la culture bactérienne, alors que le lapin à queue blanche présentait généralement des lésions sévères caractéristiques de la tularémie (Green, 1938; Bell et Green, 1939). Selon l'auteur, ces observations reflètent vraisemblablement une différence en termes de sévérité de la maladie chez ces deux hôtes. Ainsi, suite à la récolte de données sur une période de près de 10 ans, Green avance l'hypothèse que le lièvre d'Amérique serait plutôt résistant à la tularémie et ne manifesterait que très rarement une infection sévère ou mortelle (Green, 1939).

Toutefois, quelques observations vont à l'encontre de la croyance commune que le lièvre soit plutôt résistant. Entre 1935 et 1937, un déclin est observé dans la population de lièvres, attribué au 'shock disease'; *F. tularensis* est alors isolé chez une forte proportion de lièvres

d'Amérique morts et moribonds, présentant des lésions macroscopiques typiques de la tularémie. Il a alors été suggéré qu'une mortalité importante due à la tularémie peut se manifester occasionnellement lorsque le lièvre d'Amérique subit un certain stress (Jellison et al., 1961). *F. tularensis* a également été isolé chez un lièvre d'Amérique suite à l'observation d'un taux élevé de mortalité chez ces lagomorphes en Alaska (Miller, 1974). De plus, l'infection a été détectée chez un lièvre d'Amérique moribond ainsi que des tiques de lièvres prélevés sur des lièvres d'Amérique morts et malades, ce qui suggère que le lièvre peut développer une infection fatale (Parker et al., 1931; Philip et al., 1954) (Tableau VII de l'annexe 1). D'ailleurs, selon deux études expérimentales, l'inoculation de l'agent bactérien provoque une infection sévère et mortelle chez des lièvres d'Amérique (Spencer et Francis, 1924; Miller, 1974). Pour une de ces études, la sévérité d'infection dépendait de la sous-espèce en cause (Miller, 1974), ce qui pourrait possiblement expliquer la variabilité observée par les différents auteurs quant à la sensibilité du lièvre d'Amérique au développement de la maladie.

En conclusion, les données actuellement disponibles ne permettent pas d'établir clairement la sensibilité du lièvre d'Amérique au développement de la maladie.

Voies d'excrétion/contamination de l'environnement

Il est généralement cru que l'infection se transmet principalement du lièvre à la tique et vice versa. La décomposition des carcasses infectées et l'ingestion de lièvres par des prédateurs carnivores semblent également être des voies de transmission possibles. Or, aucune évidence concrète concernant la transmission de l'infection à partir du lièvre n'a été trouvée dans la littérature. En raison des résultats conflictuels concernant la sensibilité du lièvre d'Amérique au développement de la maladie et des informations fragmentaires concernant les voies d'acquisition et de transmission de l'infection chez cette espèce, il est difficile de bien cerner le rôle du lièvre d'Amérique dans le cycle écologique de *F. tularensis*. Certains auteurs avancent que le lièvre d'Amérique pourrait être un réservoir naturel de la bactérie puisque ce dernier est possiblement résistant à la maladie (Akerman et Embil, 1982), quoique les données actuellement disponibles ne peuvent supporter cette hypothèse ou une autre.

7.1.1.2 Autres lagomorphes

L'ordre des lagomorphes inclut les lapins, les lièvres ainsi que les pikas. Les lapins et les lièvres ont été fréquemment impliqués dans des éclosions de tularémie, contrairement aux pikas qui sont probablement d'une importance moindre dans l'écologie de *F. tularensis*. À l'exception du lièvre d'Amérique, les principaux lagomorphes associés à la tularémie sont le lapin à queue blanche et le lièvre de Californie (*Lepus californicus*) aux États-Unis, le lièvre d'Europe et le lièvre variable (*Lepus timidus*) en Europe, ainsi que lièvre du Japon au Japon (Jellison et Parker, 1945; Hopla, 1974). Puisque les lagomorphes ont fréquemment été identifiés comme source d'infection chez l'homme, ces animaux ont toujours été perçus, possiblement à tort, comme étant un élément central dans le cycle écologique de *F. tularensis* (Telford III et Goethert, 2010). Des anticorps ont été détectés à quelques occasions chez des lapins et lièvres sauvages, notamment 6% chez des lapins à queue blanche aux États-Unis et 5.1% chez des Lièvres d'Europe en Hongrie durant une période interépizootique (Lepitzki et al., 1990; Gyuranecz et al., 2011). Par contre, la plupart de ces lagomorphes, tels que le lapin à queue blanche, le lièvre d'Europe et le lièvre variable, sont considérés comme étant très sensibles au développement de la maladie (Rand, 1949; Hopla, 1974; Telford III et Goethert, 2010). Il a été décrit que l'infection par *F. tularensis* chez le lapin à queue blanche engendrerait une maladie très sévère et inévitablement fatale en moins d'une semaine (Green, 1938; Green, 1939). Leur rôle en tant que réservoir naturel, initialement considéré comme un fait, est maintenant fortement remis en question.

7.1.2 Rongeurs

7.1.2.1 Rat musqué (*Ondatra zibethicus*)

Voies d'acquisition de la bactérie

Puisque la bactérie est souvent détectée dans un milieu aquatique où vivent les rats musqués contaminés, plusieurs auteurs émettent l'hypothèse que le rat musqué se contamine par l'eau (Jellison et al., 1942; Parker et al., 1951; Jellison et al., 1961; Young et al., 1969). Lors d'une

étude expérimentale, deux rats musqués ont d'ailleurs été infectés par l'injection d'eau fortement contaminée par *F. tularensis* dans leur gueule (Parker et al., 1951). Hopla (1974) avance que la transmission s'effectue plutôt à partir de l'eau par un contact avec les yeux, les conduits nasaux et la peau. Basés sur des observations lors des éclosions, plusieurs auteurs constatent que les arthropodes ne semblent pas jouer un rôle important dans la transmission de la tularémie chez le rat musqué (Jellison et al., 1961). Ainsi, en 1939, lors d'une investigation d'éclosion chez des rats musqués au Montana, aucune tique, mouche ou ectoparasite hématophage n'a été observé sur tous les castors et les rats musqués examinés. De plus, la grande majorité des mortalités ont eu lieu durant la période de l'année où ces ectoparasites sont presque inexistantes (Jellison et al., 1942). Des observations similaires ont été réalisées par Parker lors d'une éclosion au Montana et en Idaho en 1942 et 1943 (Parker et al., 1951). De la même façon, une épidémie au Vermont en 1968 a eu lieu durant une période d'inactivité des arthropodes au printemps; aucun parasite à l'exception de mites n'a été détecté sur les rats musqués investigués et celles-ci étaient négatives à la culture bactérienne (Young et al., 1969).

Fréquence de l'infection

Au Canada, 12 cas de tularémie ont été rapportés chez le rat musqué avant 2009. Ces cas étaient répartis dans cinq provinces du pays, excluant le Québec (Wobeser et al., 2009). La plupart des études portant sur le risque d'infection chez des rats musqués ont été menées suite à l'observation de mortalités inquiétantes chez des rats musqués ou des castors (Tableau VIII de l'annexe 1). Dans la majorité des cas, seul un très faible nombre d'individus a été testé. À partir des données obtenues lors de ces investigations d'éclosion, nous pouvons constater que toutes les études ($n = 7$) ayant testé des rats musqués trouvés morts ont permis de détecter l'infection, à l'exception d'une investigation d'éclosion en Saskatchewan en 1977 qui a permis d'associer les mortalités observées à la maladie de Tyzzer (Jellison et al., 1942; McDermid, 1946; Jellison et al., 1951; Parker et al., 1951; Banfield, 1954; Langford, 1954; Fyvie et al., 1959; Ditchfield et al., 1960; Wobeser et al., 1978). En revanche, l'infection n'a pas été détectée chez la majorité des rats musqués trappés (en opposition à ceux trouvés morts) lors de ces investigations. En effet, aucun rat musqué trappé n'était positif à la culture bactérienne au Montana en 1939-1940 ($n = 27$) lors d'une épizootie chez des castors (Jellison et al., 1942), au

Wisconsin en 1946 ($n = 6$) lors d'une épizootie chez des rats musqués (McDermid, 1946) et en Utah en 1950 lors d'une épizootie chez des rats musqués ($n = 1$) (Jellison et al., 1951). De plus, les deux seules études à notre connaissance qui ont été réalisées dans des régions endémiques rapportent que tous les rats musqués trappés en Saskatchewan ($n =$ non spécifié) étaient séronégatifs, tout comme les 2304 rats musqués trappés en Allemagne qui étaient négatifs à la PCR et à la culture bactérienne (Dr FA Leighton, communication personnelle, 2014; von Keyserlingk et al., 2011). Néanmoins, suite à l'éclosion chez des trappeurs de rats musqués au Vermont en 1968, *F. tularensis* a été isolé par culture bactérienne chez 5% des rats musqués trappés (4/78), tandis que des anticorps ont été détectés chez 42% des 12 rats musqués testés par agglutination en tube (Young et al., 1969). Puisque trois semaines se sont écoulées entre l'exposition des trappeurs à la bactérie et l'enquête chez les animaux, il est possible que ces résultats sous-estiment la prévalence réelle d'infection de la population initialement exposée.

Facteurs de risque de l'infection

Tout comme pour le lièvre d'Amérique, quelques études suggèrent que la densité animale est un facteur de risque pour les éclosions de tularémie chez le rat musqué. Ainsi, un accroissement important de la population de rats musqués a été suivi, quelques mois plus tard, de mortalités massives chez ces animaux en Ontario en 1955 (Fyvie et al., 1959) et en 1960 (Ditchfield et al., 1960). Au Vermont, en 1968, une abondance de la population de rats musqués a été suivie d'une éclosion chez les trappeurs de rats musqués (Young et al., 1969).

Sensibilité au développement de la maladie

Plusieurs auteurs avancent que le rat musqué est très sensible au développement de la tularémie (Parker et al., 1951; Jellison et al., 1961; Bell et Stewart, 1983; Perron, 1984; World Health Organization, 2007), la maladie évoluant toujours vers la mort de l'animal (Owen, C.R. communication personnelle, cité par Young et al. (1969)) et ce, malgré que l'infection chez le rat musqué semble généralement associée au type B de *F. tularensis* (Jellison et al., 1961; Hopla, 1974; Keim et al., 2007). Selon une investigation d'éclosion, un rat musqué naturellement infecté par *F. tularensis* avait des lésions suggestives d'un processus

inflammatoire aigu, supportant une forte sensibilité chez cette espèce (Labzoffsky et Sprent, 1952). De plus, dans les investigations d'éclosion précédemment décrites, la plupart des rats musqués positifs à la tularémie étaient trouvés morts ou malades alors que les individus trappés étaient majoritairement négatifs, suggérant une forte mortalité chez les rats musqués infectés. L'hypothèse de la grande sensibilité du rat musqué à la maladie est également supportée par plusieurs investigations rapportant une forte mortalité chez les rats musqués lors d'éclosions de tularémie, soit 500 carcasses observées en Utah (Jellison et al., 1951) et plus de mille carcasses lors de l'épizootie au Montana et Idaho en 1942-1943 (Parker et al., 1951) et au Wisconsin en 1946 (McDermid, 1946). À l'opposé, lors de l'éclosion associée au rat musqué au Vermont, aucune mortalité n'a été observée par les trappeurs chez la population de rat musqué. Or, tel que cité par Young (1969), les carcasses de rats musqués ont pu être dissimulées sous l'eau en raison d'une inondation extensive. La détection d'anticorps chez 5 rats musqués sur 12 lors de cette éclosion, combinée aux résultats négatifs à la culture bactérienne chez ces individus, suggère une possible survie suite à l'infection par *F. tularensis*. Toutefois, ces rats musqués séropositifs pourraient représenter un faible pourcentage d'individus ayant survécu à l'infection en raison d'une résistance individuelle.

Voies d'excrétion/contamination de l'environnement

D'après une étude, la bactérie a été détectée dans l'urine, les fèces, la salive et plusieurs organes chez un rat musqué infecté expérimentalement (Parker et al., 1951). Il est donc possible que le rat musqué participe à la dissémination de la bactérie dans l'environnement et la faune sauvage, soit par l'entremise des sécrétions corporelles, la décomposition des carcasses infectées ou leur ingestion par des prédateurs carnivores.

7.1.2.2 Autres rongeurs

Voies d'acquisition de la bactérie

Chez les rongeurs, l'acquisition de l'infection par voie orale, suite à l'ingestion d'eau ou de nourriture contaminée, a été démontrée expérimentalement à maintes reprises (Stagg et al., 1956; Bell et Stewart, 1975, 1983). Le cannibalisme est un comportement parfois observé chez

les rongeurs, autant dans des conditions naturelles ou expérimentales, et serait possiblement une voie importante pour la transmission de l'infection dans la nature (Vest et Marchette, 1958; Jellison et al., 1959; Olsufjev et al., 1984; Petersen et al., 2004a). En plus de la voie de transmission alimentaire, il a été démontré expérimentalement que les petits rongeurs peuvent acquérir l'infection par la voie respiratoire et par l'entremise des arthropodes (Francis, 1922; Owen et Buker, 1956; Stagg et al., 1956). De plus, la transmission de l'infection a été observée lorsque des campagnols infectés étaient mis en contact avec des campagnols sains (Olsufjev et al., 1984).

Fréquence de l'infection

L'infection par *F. tularensis* a été détectée par PCR ou culture bactérienne chez une multitude d'espèces de rongeurs sauvages (Humphreys et Campbell, 1947; Gurycová et al., 2001; Výrosteková et al., 2002; Zhang et al., 2006; Keim et al., 2007; Kaysser et al., 2008). Des anticorps ont été détectés occasionnellement chez des rongeurs, entre autres chez des chiens de prairie (*Cynomys ludovicianus*) et des castors d'Europe (*Castor fiber*) (Morner et Sandstedt, 1983; Petersen et al., 2004a). Outre le rat musqué, les principaux rongeurs impliqués dans des épidémies de tularémie sont les campagnols ainsi que le castor du Canada en Amérique du Nord. Au Canada, la tularémie a été diagnostiquée chez huit espèces de rongeurs, dont la deuxième plus fréquente était le castor après le rat musqué (Wobeser et al., 2009). Le campagnol commun, le grand campagnol et la souris commune (*Mus musculus*) sont trois espèces de rongeurs fréquemment touchées par des infections de tularémie en Eurasie (Hopla, 1974; Keim et al., 2007; Gyuranecz et al., 2011).

Sensibilité au développement de la maladie

La majorité des petits rongeurs, incluant le grand campagnol, la souris commune et le campagnol commun, sont considérés comme des espèces très sensibles au développement de la maladie (Hopla, 1974; World Health Organization, 2007). L'injection sous-cutanée ou intrapéritonéale de seulement une à 10 bactéries pour les souches de *F. tularensis* type B peut causer une infection fatale chez des souris ou campagnols (Owen et Buker, 1956; Tigertt, 1962; Bell et Stewart, 1975, 1983; Olsufjev et al., 1984; Bandouchova et al., 2009). Selon une

étude expérimentale, la dose létale médiane a été calculée à seulement 0.5 unité formant une colonie (UFC) pour la souris commune et 38 UFC pour le campagnol commun (Bandouchova et al., 2009). Lors d'une infection, la bactérie se dissémine à l'intérieur de leurs organes et leur sang, où une charge bactérienne massive peut y être retrouvée (10^4 - 10^{10} UFC/g (Olsufjev et al., 1984; Bandouchova et al., 2009)) et 10^{10} UFC/ml (Thelaus et al., 2013)). Les souris et les campagnols meurent habituellement dans les quelques jours suivant l'infection (Stagg et al., 1956; Bandouchova et al., 2009).

Voies d'excrétion/contamination de l'environnement

Puisqu'il a été démontré expérimentalement que des concentrations très élevées de *F. tularensis* type B peuvent être atteintes dans le sang et les organes de certains rongeurs, la contamination de l'environnement par la décomposition des carcasses semble une hypothèse vraisemblable (Olsufjev et al., 1984; Bandouchova et al., 2009; Thelaus et al., 2013; Rossow et al., 2014). La bactérie était d'ailleurs détectable dans les organes de campagnols communs infectés expérimentalement pour une période allant jusqu'à 6-11 mois (Shlygina et Olsufjev, 1982). Par contre, Parker ne parvient pas à démontrer la contamination du sol, de l'eau ou de la boue entourant des carcasses de cochons d'inde infectés expérimentalement et laissées en place pendant plusieurs semaines suite à leur mort. Les organes de ces cochons d'Inde demeurent toutefois contaminés durant trois à six semaines après la mort de l'animal (Parker et al., 1951).

L'excrétion de la bactérie par voie urinaire chez des rongeurs chroniquement infectés s'avère une seconde voie vraisemblable de contamination de l'environnement. En effet, malgré les études expérimentales suggérant la grande sensibilité des rongeurs à la tularémie, certains auteurs suggèrent que ces animaux, plus spécifiquement les campagnols, peuvent occasionnellement manifester une infection chronique non fatale caractérisée par une néphrite chronique. La détection sporadique d'anticorps chez des rongeurs sauvages (Morner et Sandstedt, 1983; Petersen et al., 2004a), la forte concentration de bactéries présentes dans les reins suite à une infection expérimentale (Bandouchova et al., 2009) ainsi que la détection de la bactérie dans l'urine chez des campagnols et un castor infectés naturellement (Jellison et al.,

1942; Bell et Stewart, 1975) supportent cette hypothèse sous des conditions naturelles. D'après une étude réalisée chez un castor sauvage trouvé mort, *F. tularensis* peut maintenir sa virulence durant une période de 31 jours dans de l'urine préservée à une température de 3-4°C (Jellison et al., 1942). L'excrétion de la bactérie par voie urinaire chez les rongeurs chroniquement infectés s'avère une hypothèse communément rapportée pour expliquer la persistance de la bactérie dans l'environnement durant les périodes inter-épizotiques, plus spécifiquement dans le milieu aquatique. Selon cette théorie, les petits rongeurs seraient donc des réservoirs potentiels de la tularémie. Toutefois, une étude réalisée en Hongrie n'a trouvé aucune preuve de l'infection chez des campagnols communs durant une période interépizotique (Gyuranecz et al., 2011).

Plusieurs études expérimentales ont tenté d'établir les facteurs qui favorisent le déclenchement d'un processus d'infection chronique chez cette espèce. Différentes hypothèses ont été émises, telles qu'abordées dans les prochains paragraphes.

Immunité acquise

Certains auteurs suggèrent que la chronicité de l'infection découlerait d'une immunité acquise en réponse à une exposition initiale à la bactérie. Suite à l'inoculation parentérale d'une souche virulente de *F. tularensis* type B chez des campagnols des prés (*Microtus pennsylvanicus*) immunisés préalablement à l'aide d'un vaccin vivant, quelques individus ont développé une infection chronique accompagnée d'une bactériurie pouvant perdurer jusqu'à quatre semaines, et ce sans association avec la dose de vaccin et la dose de bactéries (Bell et Stewart, 1975). Les résultats de cette expérience sont toutefois difficilement transposables à la réalité retrouvée en nature puisque la souche vivante vaccinale n'y circule pas. De plus, selon quelques études expérimentales, des campagnols exposés à une concentration faible de *F. tularensis* ne semblent pas développer une immunité permettant de combattre l'infection à des doses plus élevées (Bell et Stewart, 1975, 1983).

Voie orale

L'exposition à la bactérie par voie orale, suite à l'ingestion d'eau ou de nourriture contaminée, pourrait favoriser le développement d'une infection chronique chez les petits rongeurs. Ainsi, l'excrétion urinaire de la bactérie a été détectée chez des campagnols des prés jusqu'à deux semaines suivant l'ingestion d'eau contaminée par une souche virulente de *F. tularensis* type B lors de deux études expérimentales (Bell et Stewart, 1975, 1983). Selon une autre étude expérimentale, une infection prolongée avec bactériurie a été démontrée chez 6/33 campagnols communs lors d'une exposition à une souche virulente de *F. tularensis* type B par voie orale (Shlygina et al., 1987). De plus, aucune mortalité et aucune évidence clinique d'infection n'a été observée chez 20/22 rongeurs suite à l'administration expérimentale de nourriture contaminée (Stagg et al., 1956), suggérant possiblement une infection chronique asymptomatique non létale. Ces résultats peuvent toutefois résulter d'une faible dose de la bactérie ingérée.

Cannibalisme

Lors d'une étude expérimentale, l'ingestion de carcasses contaminées a entraîné le développement d'une infection non létale chez 14/433 campagnols communs, dont 8/11 avec bactériurie sur une période allant jusqu'à deux mois (abstract, (Shlygina et Olsuf'ev, 1982)). Dans un même ordre d'idée, Olsufjev (1984) a démontré le développement d'une infection chronique chez 0.5-3.2% des campagnols d'Ondrias (*Microtus rossiaemeridionalis*) ayant consommé des carcasses infectées par différentes souches de *F. tularensis* type B ainsi que 1.9-20.7% des campagnols suite à l'ingestion de nourriture comprenant un mélange de bactéries vivantes et tuées. Lors de cette étude, la bactérie a été détectée dans les fèces d'un campagnol durant 45 jours ainsi que dans l'urine de quelques individus pour une période variant entre 1 mois et 3.5 mois avec une concentration parfois très élevée (10^3 - 10^4 /ml) (Olsufjev et al., 1984). Selon cet auteur, les campagnols pourraient développer une infection chronique dans des conditions naturelles lorsqu'exposés par voie alimentaire à une dose massive d'antigènes tués simultanément à une quantité limitée de bactéries virulentes, tel que retrouvé dans les carcasses animales après quelques cycles de congélation – décongélation.

7.1.3 Carnivores

7.1.3.1 Coyotes (*Canis latrans*)

Voies d'acquisition de la bactérie

Le coyote est un carnivore opportuniste qui possède un régime alimentaire très varié. Il se nourrit notamment de petits mammifères, incluant les rongeurs et les lagomorphes (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2006). Il est donc très probable que le coyote soit exposé à la bactérie notamment via son alimentation (Gier et al., 1978). D'ailleurs, les études expérimentales démontrent que la bactérie peut être transmise par l'ingestion de nourriture contaminée (Parker et Francis, 1926; Lundgren et al., 1957; Marchette, 1960) ainsi que par voie respiratoire (Stagg et al., 1956). De plus, les coyotes peuvent être infestés par une grande variété de tiques, entre autres *Dermacentor*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus* et *Ixodes*, suggérant le potentiel d'acquisition par l'entremise de ces arthropodes (Gier et Ameel, 1959; Gier et al., 1978).

Fréquence de l'infection

Chez le coyote, plusieurs études de séroprévalence ont été menées entre 1951 et 2004 dans différentes régions endémiques des États-Unis (Tableau IX de l'annexe 1). Les séroprévalences rapportées varient de 0% à 32%, à l'exception d'une étude rapportant une séroprévalence très élevée de 88% dans l'état d'Idaho. Par contre, la taille d'échantillon et le test utilisé dans cette dernière étude ne sont pas spécifiés (Knowlton, cité par Gier et al., (1978)). Aucune étude ayant pour objectif de détecter l'agent infectieux par une PCR ou par culture n'a été trouvée dans la littérature sur des coyotes sauvages.

Facteurs de risque de l'infection

Selon certaines études de séroprévalence, l'exposition à la bactérie chez le coyote n'était pas associée à certaines caractéristiques individuelles de l'animal telles que l'âge (Gese et al., 1997; Arjo et al., 2003; Gese et al., 2004) et le sexe (Gese et al., 2004). De plus, aucune

association n'a été trouvée entre la séroprévalence et les régions étudiées lors de deux études (Gese et al., 1997; Arjo et al., 2003) et ce, malgré les grandes différences en terme d'écologie caractérisant les régions pour une de ces études (Arjo et al., 2003). Toutefois, la séroprévalence variait de façon significative annuellement de 1991 à 1993 lors d'une étude au Wyoming (Gese et al., 1997). Les variations temporelles d'exposition à *F. tularensis* peuvent possiblement être associées au cycle d'abondance du lièvre d'Amérique, tel que déjà proposé chez le loup en Alaska (Zarnke et al., 2004).

Sensibilité au développement de la maladie

Tout comme chez le lièvre d'Amérique et le rat musqué, la sensibilité du coyote n'a pas été clairement établie jusqu'à présent. Les études de séroprévalence retrouvées dans la littérature ne spécifient pas le statut de santé des coyotes testés et n'effectuent généralement pas la recherche de l'agent infectieux en parallèle. Il est donc difficile d'établir si les animaux séropositifs manifestaient également une infection aiguë ou s'ils ont simplement été exposés à la bactérie dans le passé. De plus, seules quelques études expérimentales portant sur la sensibilité du coyote ont été retrouvées dans la littérature. Une première étude expérimentale réalisée en 1926 chez 3 coyotes âgés entre 4 et 6 mois rapporte le développement de signes cliniques sévères puis leur mort 13 à 53 jours suivant l'ingestion de carcasses de cochons d'Inde et de lapins infectés. Des anticorps ont été détectés entre une à trois semaines après l'ingestion des carcasses (Parker et Francis, 1926). Dans une seconde étude expérimentale, trois jeunes coyotes mâles exposés à des aérosols contaminés par *F. tularensis* ont survécu à l'infection et ont développé des anticorps au cours des deux premières semaines suivant l'exposition. Un de ces coyotes ne présentait aucun signe de l'infection, alors que les deux autres semblaient plutôt malades durant les quelques premiers jours. En comparaison, l'exposition d'aérosols à une concentration équivalente de *F. tularensis* a entraîné la mort en quatre à cinq jours chez tous les rongeurs testés, suggérant que le coyote est beaucoup moins sensible que les rongeurs (Stagg et al., 1956). Dans une troisième étude expérimentale, aucune manifestation clinique n'a été observée chez 9 coyotes âgés de 14 mois exposés à différentes doses d'une souche virulente de *F. tularensis* par voie orale et sous-cutanée. Des anticorps ont été détectés à partir de 1 à 2 semaines suivant l'exposition et demeurés détectables jusqu'à 78

jours chez un coyote (Lundgren et al., 1957). Lors d'une dernière étude expérimentale, l'inoculation par voie sous-cutanée et l'ingestion de carcasses infectées a été réalisée chez 19 jeunes coyotes âgés entre 1 et 5 mois. Des anticorps ont été détectés chez tous les coyotes étudiés, apparaissant habituellement entre 1-2 semaines suivant l'exposition et persistant jusqu'à 10-12 semaines pour 2 coyotes. Une infection mortelle a été observée chez seulement 2 coyotes âgés de 1-2 mois après l'inoculation sous-cutanée d'une dose massive de *F. tularensis*. Chez les coyotes survivants, l'infection semblait plutôt bénigne (Marchette, 1960). Ainsi, selon les résultats de ces quatre études expérimentales et tel que proposé par certains auteurs, la sensibilité du coyote au développement de la maladie semble varier avec l'âge de l'animal, les jeunes individus étant plus sensibles (Lundgren et al., 1957; Gier et al., 1978). Des observations similaires ont également été documentées chez le chien, où l'inoculation sous-cutanée de *F. tularensis* a entraîné le développement d'une infection beaucoup plus sévère évoluant vers la mort pour quelques individus chez un groupe de chiots, comparativement à des chiens adultes ayant subi le même traitement (Johnson, 1944). Néanmoins, plusieurs auteurs considèrent que le coyote serait un animal relativement résistant à la bactérie et apte à se rétablir de l'infection (Gier et Ameel, 1959; Gese et al., 1997; Gese et al., 2004).

Voies d'excrétion/contamination de l'environnement

Le rôle exact du coyote dans le cycle écologique de la tularémie n'est pas clairement établi. Tel que décrit dans la section 6.3.3, quelques cas humains ont été associés à un contact direct avec un coyote. Par extension, le coyote peut possiblement transmettre l'infection à d'autres animaux. Il n'est pourtant pas clairement établi si le coyote a été impliqué dans ces transmissions chez l'homme uniquement en tant que vecteur mécanique ou encore comme source primaire de la bactérie suite à une infection active. Selon les études expérimentales, les jeunes coyotes participeraient potentiellement à la dissémination de la bactérie dans l'environnement, du moins par la décomposition des carcasses. Effectivement, *F. tularensis* a été isolé à quelques reprises à partir des organes de très jeunes coyotes (1 à 6 mois d'âge) infectés expérimentalement (Parker et Francis, 1926; Marchette, 1960). En revanche, tous les échantillons d'organes, de salive, de sang et de fèces prélevés chez de coyotes âgés de 14 mois

lors d'une étude expérimentale étaient dépourvues de *F. tularensis* à l'exception d'un seul échantillon de sang ainsi que deux échantillons de fèces prélevés quelques heures après l'exposition (Lundgren et al., 1957). Ainsi, chez les adultes, seules les fèces semblent être une source potentielle de dissémination de l'agent pathogène (Lundgren et al., 1957). Puisque *F. tularensis* a été isolé du sang à une seule occasion chez un coyote adulte, la dissémination de la bactérie par l'entremise des arthropodes semble également peu probable (Lundgren et al., 1957).

7.1.3.2 Autres carnivores

Les carnivores sont généralement considérés comme étant des animaux plutôt résistants à la tularémie et ne semblent pas jouer un rôle majeur dans le cycle écologique de la bactérie (Hopla, 1974; Bell, 1979). Des anticorps ont été détectés chez une multitude de carnivores, notamment le loup (Zarnke et al., 2004), le renard (McKeever et al., 1958; McCue et O'Farrell, 1988), le raton-laveur (McKeever et al., 1958; Bischof et Rogers, 2005; Berrada et al., 2006), la moufette (McKeever et al., 1958; Aguirre et al., 1992; Berrada et al., 2006), le chien (Leighton et al., 2001; Berrada et al., 2006), le chat (McKeever et al., 1958; Leighton et al., 2001), l'ours (Binninger et al., 1980; Chomel et al., 1998) et le lynx (McKeever et al., 1958; Biek et al., 2002). Les séroprévalences observées chez les carnivores sont habituellement très élevées ce qui suggère l'habileté à survivre à l'infection pour plusieurs de ces animaux dans des conditions naturelles. Il y a par contre des rapports occasionnels de tularémie fatale chez certains individus. Par exemple, une éclosion de tularémie a été rapportée chez des renards gris au Minnesota en 1933 causant une infection fatale chez au moins sept individus (Schlotthauer et al., 1935).

7.1.4 Oiseaux

Des cas d'infections naturelles ou expérimentales par *F. tularensis* ont été documentés chez plusieurs espèces aviaires (Green et Shillinger, 1932; Green, 1943; Thorpe et al., 1965; Mörner et Mattsson, 1983, 1988). La sensibilité au développement de la maladie varie beaucoup d'une espèce aviaire à l'autre, certaines étant très sensibles, telles que le tétra, la

perdrix, alors que d'autres sont plutôt résistantes, telles que le pigeon, le faisan, le poulet domestique, l'autour des palombes, l'épervier, la buse, la corneille et la chouette (Green et Wade, 1928; Marchette, 1960; Mörner et Mattsson, 1988). Il a d'abord été suggéré que les oiseaux jouent un rôle important dans la transmission de la bactérie d'une région à une autre soit par l'entremise de leurs excréments ou le transport des tiques (Moteiunas et al., 1984; Hubálek, 2004; Tärnvik et al., 2004). Or, tel que raisonné par plusieurs auteurs, la dissémination de la bactérie par les oiseaux ne semble pas d'une grande importance dans le cycle écologique, puisque la tularémie n'a pas été retrouvée le long de leur parcours migratoire et ce, jusqu'en hémisphère sud (Hopla, 1974; Tärnvik et al., 2004; Eliasson et al., 2006).

7.1.5 Amibes

Certains protozoaires sont communément retrouvés dans l'environnement, tels *Acanthamoeba* dans le sol et l'eau douce et *Tetrahymena* dans l'eau douce. La capacité de survie et de multiplication de certaines bactéries intra-cellulaires au sein des organismes protozoaires retrouvés en milieu naturel aquatique est généralement acceptée (Fields et al., 1986). Plusieurs études expérimentales ont été réalisées afin d'évaluer si un phénomène similaire pourrait être présent chez *F. tularensis*.

Une étude expérimentale démontre que la souche vaccinale de *F. tularensis* type B peut effectivement survivre et se multiplier à l'intérieur d'*Acanthamoeba castellanii* (Abd et al., 2003). En revanche, le nombre de cellules d'*Acanthamoeba castellanii* diminue parallèlement, ce qui suggère que l'infection par *F. tularensis* affecte la survie des amibes (Abd et al., 2003). *Tetrahymena pyriformis* parvient également à ingérer *F. tularensis* expérimentalement, mais le nombre de bactéries diminue progressivement suite à l'ingestion (Konstantinova et al., 1999). Selon une autre étude expérimentale, la croissance de *F. tularensis* est favorisée, durant les 16 premiers jours seulement, dans un milieu aquatique (eau de lac) riche en nutriments et en protozoaires (Thelaus et al., 2009). Par ailleurs, une étude démontre que les souches virulentes de *F. tularensis* peuvent survivre à l'intérieur des kystes de protozoaires jusqu'à

trois semaines post-infection, et ce dans un milieu ne contenant pas les nutriments nécessaires à la croissance de l'agent bactérien (El-Etr et al., 2009).

Des résultats expérimentaux suggèrent que les mécanismes de virulence de *F. tularensis* jouent un rôle dans la capacité à survivre suite à l'ingestion par les protozoaires, tels qu'observé chez *Legionella* (Fields et al., 1986). En effet, une résistance accrue à la dégradation par le protozoaire *Tetrahymena pyriformis* chez *F. tularensis* type B a été observée comparativement à la souche *F. tularensis* type AII et la souche vaccinale atténuée (Thelaus et al., 2009). De la même manière, El-Etr démontre que l'efficacité à adhérer, pénétrer et se répliquer à l'intérieur d'*Acanthamoeba castellanii* est inférieure pour les souches non-pathogéniques de *F. tularensis* (El-Etr et al., 2009).

Palmieri découvre que les températures approchant le point de congélation entraînent un désenkystement d'*Acanthamoeba* spp. En d'autres mots, l'amibe sous forme kystique résistante et dormante se transforme en trophozoïte actif. Le trophozoïte ainsi engendré entre en état de frénésie alimentaire, favorisant ainsi l'ingestion d'organismes tels que *F. tularensis* (Palmieri et Elswaifi, 2009). De plus, selon les résultats d'El-Etr (2009), l'enkystement rapide du protozoaire *Acanthamoeba castellanii* suite à l'infection de *F. tularensis* est essentiel à la survie à long terme de la bactérie à l'intérieur de son prédateur.

7.1.6 Arthropodes

La transmission de *F. tularensis* par l'entremise des arthropodes a été notée quelques années après la découverte de la bactérie, soit en 1919 en Utah par Edward Francis chez un patient qui présentait des signes compatibles avec la forme de tularémie ulcéro-glandulaire. Suite à cette découverte, la transmission de l'infection aux animaux via les arthropodes a également été démontrée expérimentalement à plusieurs reprises (Francis, 1922; Philip, 1932; Petrov, 1960; Gordon et al., 1983; Reese et al., 2011). Une grande variété d'arthropodes ont été retrouvés naturellement infectés par *F. tularensis*, incluant une multitude d'espèces de tiques, des moustiques, des tabanidés, des mites, des puces, des poux et des punaises de lit (Hopla, 1974; Petersen et al., 2009).

7.1.6.1 Tiques

Fréquence de l'infection

La prévalence d'infection chez les tiques est très faible dans la plupart des études réalisées dans des régions endémiques. En 1992, aucun des 56 échantillons de tiques de lièvres, prélevées directement de lièvres d'Amérique, n'était positive à la culture bactérienne dans quatre régions du Québec (Cayouette, 1993). De 1994 à 1997, en Autriche, on rapporte une prévalence d'après la culture bactérienne de 1.3% pour *Dermacentor reticulatus* ($n = 1217$), 0% pour *Ixodes ricinus* ($n = 1977$) et 0% pour *Haemaphysalis concinna* ($n = 49$), toutes récoltées par la technique de la flanelle (Gurycová et al., 2001). Entre 2005 et 2006, l'ADN de *F. tularensis* n'a pas été détecté chez 432 tiques et mouches récoltées de petits rongeurs provenant de 3 régions endémiques de l'Allemagne (Kaysser et al., 2008). Lors d'une période inter-épizootique en 2008 en Hongrie, une prévalence d'après la PCR de 0.42% a été estimée chez des tiques *Haemaphysalis concinna* ($n = 476$) prélevées dans l'environnement, alors que l'ADN n'a pas été détecté chez des tiques *Haemaphysalis concinna* ($n = 28$) et *Ixodes ricinus* ($n = 404$) prélevées sur de petits mammifères ou des tiques *Ixodes ricinus* ($n = 1106$) prélevées de l'environnement (Gyuranecz et al., 2011). À Martha's Vineyard, aux États-Unis, une étude rapporte une prévalence de détection d'ADN à *F. tularensis* type A variant de 1% à 5% chez des tiques *Dermacentor variabilis* provenant de différents sites. Un micro-foyer d'un diamètre de 290 mètres a été détecté, soit un agrégat de tiques *Dermacentor variabilis* ayant un risque plus élevé d'être positives à la PCR relativement aux autres tiques récoltées ailleurs sur le site (risque relatif de 3.3, $P = 0.001$) (Goethert et Telford III, 2009).

Au Canada, *F. tularensis* a été isolé chez des tiques *Dermacentor variabilis*, *Hypselodoris andersoni* et la tique du lièvre, notamment en Ontario, en Alberta, en Saskatchewan et en Colombie-Britannique (Parker et al., 1931; Gibbons, 1939; Bow et Brown, 1943; Ditchfield et al., 1960; Gordon et al., 1983). En Alaska, *F. tularensis* a été isolé de tiques du lièvre ayant été prélevés directement sur des lièvres (Philip et Parker, 1938; Philip et al., 1954; Miller, 1974). Cette espèce de tique se retrouve à travers l'Amérique du Nord et se nourrit principalement à partir de lapins et lièvres (Bishopp et Trembley, 1945).

Sensibilité au développement de la maladie

Plusieurs études expérimentales ont exploré l'effet de *F. tularensis* sur la viabilité de la tique. Dans certains cas, un effet délétère sur le développement de la tique et un taux de mortalité élevé a été observé suivant l'infection à *F. tularensis* chez *Dermacentor variabilis*, *Dermacentor marginatus* et *Rhipicephalus rossicus* (Philip et Jellison, 1934; Petrov, 1960; Jellison, 1974; Reese et al., 2010). Par exemple, Petrov rapporte une survie de 1.3 à 26% chez des tiques *Dermacentor marginatus* infectées comparativement à 98% chez le groupe contrôle. Lors de cette même étude, il a été observé que le pourcentage de mortalité est plus important au stade de nymphe et semble augmenter avec la charge bactérienne à l'intérieur de la nymphe (Petrov, 1960). En revanche, une telle mortalité n'a pas été observée chez certaines espèces de tiques, notamment *Dermacentor variabilis* au stade adulte ainsi que *Amblyomma americanum* (Hopla, 1974; Reese et al., 2011).

Voies d'excrétion et de transmission

Les tiques semblent être d'importants vecteurs biologiques de la tularémie de par leur capacité à transmettre l'infection à d'autres animaux par la morsure (Petersen et al., 2009) et considérant que la multiplication de la bactérie à l'intérieur de la tique a été démontrée expérimentalement à quelques reprises (Hopla, 1955; Petrov, 1960). En plus, l'infection peut vraisemblablement être transmise à partir des excréments de tiques infectées selon quelques études expérimentales (Philip, 1952; Petrov, 1960). Finalement, la tique joue possiblement un rôle dans la persistance naturelle de la bactérie dans l'environnement en raison d'une possible transmission transstadiale et/ou héréditaire (Hopla, 1974; Petersen et al., 2009). Chez la tique, le maintien de l'infection à partir du stade larvaire jusqu'au stade adulte a été démontré dans un contexte expérimental à plusieurs reprises chez une multitude d'espèces, notamment *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor variabilis*, *Amblyomma americanum*, *Dermacentor marginatus* et *Rhipicephalus rossicus* (Hopla, 1955; Reese et al., 2010; Reese et al., 2011) (Spencer et Francis, 1924; Philip et Jellison, 1934; Hopla, 1953; Petrov, 1960). Ce phénomène semble généralement accepté par la communauté scientifique. En revanche, les résultats de plusieurs études expérimentales sont conflictuels quant à l'hypothèse d'une transmission transovarienne. Effectivement, certaines études observent une transmission d'une génération à

l'autre chez quelques espèces de tiques, notamment *Dermacentor variabilis* et *Dermacentor andersoni* (Parker et Spencer, 1926; Philip et Jellison, 1934), alors que d'autres études ne parviennent pas à démontrer cette particularité (Bell, (1945); Petrov (1962) cité par Burgdorfer et Varma, (1967) et Hopla, (1974); Petrov, (1966) cité par Hopla, (1974); Jellison, (1974)). À l'heure actuelle, il n'est pas clairement établi si ces arthropodes constituent un réservoir naturel pour *F. tularensis*.

7.1.6.2 Autres arthropodes

Le rôle des tabanidés dans le cycle écologique de *F. tularensis* semble être limité à une transmission mécanique suivant une contamination des pièces buccales (Petersen et al., 2009). Il est généralement cru que la bactérie ne survit pas sur une longue période de temps à l'intérieur de ces arthropodes (Burgdorfer et Varma, 1967; Petersen et al., 2009). D'ailleurs, selon une étude expérimentale, les bactéries présentes à l'intérieur de la mouche *Chrysops discalis* semblent diminuer graduellement en nombre avec le temps et ne sont plus détectables après 14 jours, suggérant que *F. tularensis* ne se multiplie pas à l'intérieur des mouches. Cette même étude rapporte que la mouche peut contaminer un animal via un repas de sang jusqu'à quatre jours post-infection (Francis et al., 1921). Le repas des tabanidés (*Chrysops* et *Haematopota*) est fréquemment interrompu par l'animal qui réagit suite à la morsure douloureuse de ces arthropodes. Ces derniers chercheront alors activement un nouvel hôte. Cette particularité de se nourrir sur une multitude d'animaux en peu de temps peut alors déclencher une éclosion (Petersen et al., 2009).

Les moustiques sont également considérés comme étant des vecteurs mécaniques de la bactérie, pouvant transmettre l'infection d'un animal à l'autre lors des repas de sang, possiblement par contamination des pièces buccales ou régurgitation (Philip, 1932; Burgdorfer et Varma, 1967). Effectivement, la transmission a été observée expérimentalement lorsqu'un moustique interrompt son repas d'un animal contaminé en état moribond vers un animal sain, ce qui suggère une transmission mécanique de l'infection (Philip, 1932). L'infection peut également se transmettre en écrasant l'insecte sur une peau intacte ou via les fèces du moustique (Philip, 1932). Ces arthropodes semblent pouvoir s'infecter en se nourrissant

d'animaux malades et maintenir l'infection durant une période minimale de deux semaines, mais la transmission subséquente de l'infection à des animaux naïfs n'a toutefois pas été observée selon certaines études expérimentales (Philip, 1932; Thelaus et al., 2013). La multiplication de la bactérie à l'intérieur du moustique et la transmission de l'infection de femelles adultes vers ses œufs n'ont pas été démontrées (Philip, (1932); Petrisheva, (1965) cité par Eliasson et al., (2006); Thelaus et al., (2013)). En revanche, les résultats de deux études expérimentales suggèrent que l'infection est maintenue vraisemblablement chez certains moustiques du stade larvaire au stade adulte (Lundström et al., 2011; Thelaus et al., 2013). À partir de ces résultats, il a été proposé que ces arthropodes acquièrent l'infection au stade larvaire d'un milieu aquatique contaminé et, éventuellement, l'infection peut être transmise par les femelles adultes à des animaux. Puisque les larves de moustiques sont d'importants prédateurs des protozoaires aquatiques (Östman et al., 2008) et que ces derniers peuvent possiblement abriter la bactérie *F. tularensis*, il a été suggéré que les moustiques s'infectent suite à l'ingestion des protozoaires retrouvés dans l'eau (Lundström et al., 2011).

7.2 Sources potentielles environnementales

7.2.1 Eau et sédiments

Fréquence de la contamination

Suite au premier rapport démontrant la présence de la bactérie dans l'eau en 1934 (Karpoff et Antonoff, 1936), de multiples études ont rapporté la contamination d'échantillons d'eau ou de sédiments lors d'investigations d'éclosions animales ou humaines. Au Canada, la présence de *F. tularensis* a été détectée pour la première fois dans les eaux naturelles en 1953 en Alberta lors d'une épizootie chez des castors et des rats musqués (Banfield, 1954; Langford, 1954). La majorité des échantillons d'eau et de boue prélevés dans les eaux naturelles lors d'épizooties chez des rats musqués ont généré des résultats positifs à la culture de *F. tularensis* (Banfield, 1954; Langford, 1954; Fyvie et al., 1959; Ditchfield et al., 1960; Young et al., 1969). De toutes les investigations d'éclosions chez les rats musqués retrouvées dans la littérature et

ayant prélevé des échantillons d'eau (Tableau VIII de l'annexe 1), une seule n'a pas détecté de contamination dans les cours d'eau étudiés, soit en Utah en 1950. Par contre, les échantillons ont été prélevés plusieurs mois après l'éclosion, ce qui pourrait expliquer les résultats négatifs (Jellison et al., 1951).

La présence de la bactérie dans l'eau, principalement *F. tularensis* type B, a été démontrée notamment par PCR, par ELISA et par culture bactérienne suite à l'inoculation d'animaux de laboratoire (Jellison et al., 1942; Parker et al., 1951; Berdal et al., 1996; Kaysser et al., 2008; Broman et al., 2010). Il n'a toutefois pas été possible de cultiver la bactérie directement à partir d'échantillons d'eau (Eliasson et al., 2006; Broman et al., 2010). Cette particularité pourrait être liée à la transformation de la bactérie vers un état viable, mais non-cultivable (VNC), lorsque celle-ci est nichée dans un milieu aquatique. Cet état VNC a été observé et décrit chez de nombreuses espèces bactériennes, caractérisé par l'incapacité à se répliquer suite à un stress. Un tel phénomène a également été rapporté chez *F. tularensis* lors d'études expérimentales. En effet, la bactérie perd la capacité à croître sur gélose après 70 jours dans un milieu aquatique froid dépourvu de sources de carbones (Forsman et al., 2000) et après 5 jours dans une eau de lac riche en nutriments, en coculture avec des protozoaires (Thelaus et al., 2009). Pour expliquer ces derniers résultats, Thelaus émet l'hypothèse que la capacité à se répliquer pourrait être affaiblie lorsque la bactérie quitte son hôte protozoaire. Ainsi, un milieu riche en nutriments et en protozoaires favorise la croissance bactérienne à court terme tel que vu dans la section 7.1.5 'Amibes', mais à long terme la virulence de la bactérie en est compromise. Certains facteurs sont reconnus pour stimuler la réanimation de plusieurs espèces bactériennes en état VNC et ces facteurs diffèrent d'une espèce à l'autre. Après quelques tentatives expérimentales, les facteurs permettant la réanimation de *F. tularensis* n'ont pas été décelés à ce jour (Forsman et al., 2000).

Dans les milieux aquatiques naturellement contaminés, la bactérie peut demeurer détectable pendant de longues périodes d'après les résultats de quelques études. Ainsi, Jellison (Jellison et al., 1942) rapporte que les échantillons d'eau prélevés successivement dans un même étang d'eau ont généré des résultats positifs sur une période de 31 jours. De la même manière, la bactérie a été isolée dans des échantillons d'eau et de boue durant une période de 16 mois dans

un ruisseau du Montana et de 11 mois dans un ruisseau de l'Idaho (Parker et al., 1951). *F. tularensis* type B a également été détectée par PCR à partir d'échantillons d'eau de surface et de sédiments prélevés dans une région endémique en Suède sur une période de trois ans, incluant une année sans aucun cas humain rapporté (Broman et al., 2010). À partir d'échantillons d'eau et de boue naturellement contaminés et réfrigérés à 7°C, la virulence de la bactérie a été maintenue durant une période de 23 jours dans l'eau et de 10 à 14 semaines dans la boue, démontrant la survie possible de la bactérie dans ces types de milieu (Parker et al., 1951).

D'autres études portant sur les substances contenues dans les milieux humides et aquatiques supportent également la possibilité de survie de *F. tularensis* dans ces milieux. D'après une étude expérimentale réalisée par Gibby (1948), des échantillons de boue provenant de rivières et de marécages naturellement contaminés contiennent des substances qui favorisent la croissance bactérienne et stabilisent le pH. De même, la mise en évidence de cystine ou d'autre composé organosulfuré dans des échantillons de boue contaminés prélevés au Montana suggère que la boue représenterait un milieu adéquat pour la prolifération de la bactérie (Parker et al., 1951). En effet, tel que mentionné dans la section 5 'Méthodes diagnostiques', les milieux de culture complexes enrichis en cystine (sulfure) favorisent une excellente croissance bactérienne de *F. tularensis* (World Health Organization, 2007). Ces résultats suggèrent que, même en l'absence d'un hôte à *F. tularensis*, la persistance de la bactérie dans un milieu composé de boue est probable.

Rôle dans la transmission et dispersion environnementale

Les opinions sont partagées quant au rôle définitif du milieu aquatique dans le cycle écologique de *F. tularensis*. La grande fréquence de contamination des cours d'eau simultanément à l'infection des animaux semi-aquatiques suggère une certaine association entre ces deux éléments. Il est toutefois difficile d'établir la direction de la contamination. En effet, les données actuelles dans la littérature ne nous permettent pas de déterminer si la contamination persistante dans le milieu aquatique découle d'un apport récurrent de la bactérie par la faune ou encore d'un maintien constant de la population bactérienne dans les cours

d'eau qui agirait alors comme source d'infection pour les animaux. Tels que vu précédemment, l'excrétion de la bactérie via l'urine des mammifères ou la décomposition des carcasses animales sont des sources potentielles de contamination du milieu aquatique. D'un autre côté, le maintien de la bactérie dans le milieu aquatique pourrait être attribuable à la présence de protozoaires infectés par *F. tularensis* ou simplement la présence de substances favorisant la croissance bactérienne retrouvées dans la boue. Certaines observations vont à l'encontre de la théorie d'une contamination d'origine animale. Par exemple, durant la période d'étude au Montana, aucun mammifère n'a été observé autour du cours d'eau contaminé, suggérant une persistance de la bactérie dans l'eau (Parker et al., 1951). De la même manière, Broman rapporte que tous les rongeurs testés ($n = 7$) à proximité des cours d'eau contaminés en 2004 étaient négatifs. Par ailleurs, Fyvie (1959) avance que si l'eau se contaminait par une source externe locale, les bactéries ainsi introduites se dissiperaient dans la masse d'eau à un point tel où la détection de *F. tularensis* serait irréalisable.

Les cours d'eau peuvent également jouer un rôle dans la dispersion spatiale des foyers d'infection de la tularémie. Ainsi, tel que suggéré par Young, l'observation d'une éclosion chez une population animale donnée près d'un cours d'eau pourrait vraisemblablement prendre origine en amont, notamment suite à la fonte de neige (Young et al., 1969). D'ailleurs, l'épidémie de tularémie observée au Vermont en 1968 le long de trois rivières tributaires du lac Champlain a été suivie de quelques cas humains associés à des rats musqués abattus sur les bords de la rivière Richelieu en avril 1969, au printemps 1978 et en mai 1980 (Gattereau et al., 1970; Ford-Jones et al., 1982). Puisque le Richelieu prend sa source du lac Champlain, plusieurs auteurs émettent l'hypothèse que le lac Champlain, à cette époque, aurait pu correspondre à un réservoir aquatique de *F. tularensis* (Perron, 1984). De plus, lors d'une éclosion chez des castors en Alberta, les cours d'eau positifs à *F. tularensis* prenaient source d'étangs affectés par les mortalités anormales (Banfield, 1954).

8. Intégration des éléments prédominants du cycle écologique de *F. tularensis*

Le schéma récapitulatif suivant expose les éléments prédominants, actuellement argumentés dans la littérature et détaillés dans les sections précédentes, pour décrire l'écologie de *F. tularensis* à travers le cycle aquatique et le cycle terrestre. Il est à noter que ce schéma est basé sur les données actuelles qui sont souvent peu nombreuses ou conflictuelles. Il doit donc être vu comme une proposition et non comme un cadre conceptuel faisant consensus dans la communauté scientifique.

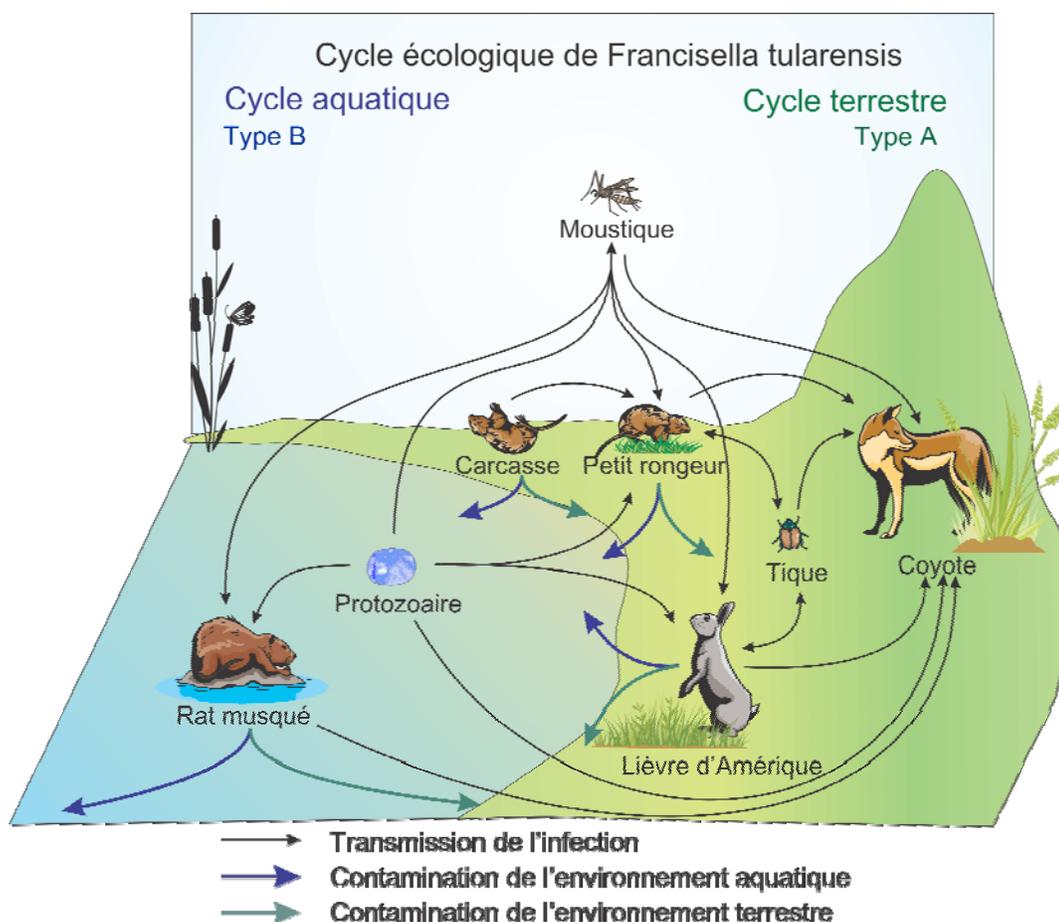


Figure 2. Schéma du cycle écologique de la transmission de *F. tularensis* dans l'environnement : une proposition.

La décomposition des carcasses de petits rongeurs semble être une source de contamination vraisemblable de l'environnement aquatique ou terrestre, mais ne peut expliquer la persistance de la bactérie durant une longue période de temps, à moins d'une fréquence très élevée de mortalités chez ces animaux (Bell et Stewart, 1975). D'un autre côté, l'excrétion de la bactérie via l'urine des rongeurs devenus porteurs chroniques suite à une infection par voie orale, notamment via le cannibalisme, est une hypothèse plausible pour expliquer la contamination du milieu aquatique ou terrestre à long terme. L'accroissement de la population d'une espèce animale sensible ou modérément sensible, tel que les rongeurs ou les lagomorphes, peut favoriser la transmission de l'infection soit par un taux de contact plus élevé entre ces animaux ou l'apparition de conditions de stress au sein de cette même population (Jellison et al., 1959). Certaines espèces de tiques représentent des réservoirs potentiels, dans l'optique où la transmission transovarienne existe réellement dans des conditions naturelles. Hopla propose plutôt le concept d'un réservoir englobant une multitude d'hôtes, c'est-à-dire le complexe formé par un hôte vertébré ainsi qu'un arthropode le parasitant. Notamment, *Dermacentor parumapertus* en association avec le lièvre de Californie, ainsi que la tique du lièvre en association avec le lapin à queue blanche et le lièvre d'Amérique forment deux exemples de réservoirs multi-hôtes potentiels dans le cycle terrestre (Hopla, 1974). De la même manière, Peterson avance que l'interaction entre *Chrysops discalis* et le lièvre, ainsi que l'interaction entre *Haematopota pluvialis* ou *Chrysops relictus* et le grand campagnol peuvent potentiellement jouer un rôle important dans le cycle de transmission de la tularémie chez l'homme (Petersen et al., 2009). Les carnivores, tels que le coyote, s'infectent vraisemblablement via l'ingestion de carcasses contaminées et possiblement via les vecteurs arthropodes. Le rôle des carnivores en tant que disséminateur de la bactérie ne semble toutefois pas important dans le cycle écologique de *F. tularensis*. L'eau pourrait agir comme source d'infection pour les animaux semi-aquatiques ou les animaux terrestres vivant à proximité des cours d'eau et possiblement comme réservoir si les nutriments nécessaires à la survie du pathogène sont présents dans le milieu. L'habileté probable de *F. tularensis* à survivre et se multiplier dans les protozoaires représente également un mécanisme vraisemblable pour la persistance de la contamination dans un milieu essentiellement aquatique entre les éclosions. De plus, la capacité accrue de *F. tularensis* type B à résister à la dégradation suivant l'ingestion par *Tetrahymena pyriformis* supporte l'hypothèse d'un

réservoir aquatique pour le type B (Thelaus et al., 2009). Les larves de moustiques, étant des prédateurs de protozoaires aquatiques, peuvent possiblement être exposées à *F. tularensis* lors de l'ingestion de ces organismes infectés et ensuite transmettre l'infection à différents mammifères (Östman et al., 2008; Lundström et al., 2011; Thelaus et al., 2013). À l'heure actuelle, il n'y a aucune preuve concrète pour supporter l'hypothèse que les mammifères ou les arthropodes forment le réservoir naturel de *F. tularensis* (Tärnvik et al., 2004; World Health Organization, 2007).

La présence d'un lien entre le cycle aquatique et terrestre a été suggérée par plusieurs auteurs, ce qui pourrait mener, occasionnellement, vers le débordement d'une éclosion d'un cycle à l'autre. Par ailleurs, il a été proposé que les animaux semi-aquatiques pourraient se contaminer à partir des animaux terrestres et vice-versa, soit par un contact direct ou par un contact indirect avec du matériel contaminé dans l'environnement (Jellison et al., 1942; Parker et al., 1951). La transmission de l'infection des arthropodes, particulièrement les moustiques, vers les animaux semi-aquatiques ou terrestres représenterait également un lien possible entre les deux cycles écologiques. Thelaus suggère que les moustiques, ayant acquis l'infection du milieu aquatique, ont le potentiel de transmettre éventuellement l'infection à des mammifères terrestres sensibles, ces derniers pouvant alors agir comme amplificateur local de la contamination, accentuée par l'implication des arthropodes. Ces conditions peuvent ainsi provoquer une éclosion massive de courte durée, suivie par une contamination subséquente et progressive de l'environnement par la décomposition des carcasses infectées (Thelaus et al., 2013). Toutefois, puisqu'une grande différence génétique et géographique existe entre *F. tularensis* type A et type B, l'interaction entre les deux cycles est probablement très rare.

À l'aide des approches moléculaires, la distinction génétique et géographique entre *F. tularensis* type A1 et *F. tularensis* type A2 soulève l'hypothèse que ces deux groupes pourraient occuper des niches écologiques distinctes et possiblement suivre des cycles écologiques différents (Keim et al., 2007). Des études récentes permettent même de diviser davantage ces souches en sous-groupes (Birdsell et al., 2014). Un modèle beaucoup plus complexe de l'écologie de *F. tularensis* est donc à envisager, composé de plusieurs cycles. L'emploi des outils diagnostiques moléculaires actuellement disponibles devrait permettre

d'apporter des informations additionnelles pertinentes afin d'ultimement élucider le mystère concernant le ou les cycles de cette maladie zoonotique particulièrement énigmatique.

Objectifs

Ce projet vise à approfondir nos connaissances sur l'écologie de la tularémie au sein de la faune au Québec, qui demeure très peu connue. À partir des résultats obtenus, ce projet pourrait ultimement identifier des pistes pertinentes pour les recherches futures et orienter les efforts de contrôle et de prévention de la tularémie. Les objectifs spécifiques de cette étude sont les suivants :

- 1) Estimer la séroprévalence et la prévalence d'infection à *F. tularensis* chez le lièvre d'Amérique et le rat musqué et la séroprévalence chez le coyote dans quatre régions administratives du Québec, soit l'Abitibi-Témiscamingue, le Bas-Saint-Laurent, l'Estrie et les Chaudières-Appalaches.
- 2) Identifier les facteurs de risque potentiels associés à cette infection, soit des caractéristiques individuelles de l'animal ou environnementales, permettant de mieux comprendre et possiblement reconnaître les cycles écologiques terrestre et aquatique de la tularémie au Québec.
- 3) Décrire la distribution spatiale des individus par l'analyse d'agrégats de cas positifs et/ou séropositifs.

Exposé et analyses des résultats :
**Eco-epidemiologic study of *Francisella tularensis*, the
agent of tularemia, in Québec***

Vanessa Gabriele-Rivet,^{1,2} Nicholas Ogden,^{2,3} Ariane Massé,⁴ Kym Antonation,⁵ Cindi Corbett,⁵ Antonia Dibernardo,⁵ L. Robbin Lindsay,⁵ Patrick A. Leighton^{1,2} and Julie Arsenault^{1,2,6}

¹ Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6

² Groupe de recherche en épidémiologie des zoonoses et santé publique (GREZOSP), 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6

³ Centre for Food-borne, Environmental & Zoonotic Infectious Diseases, Public Health Agency of Canada, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6

⁴ Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs, 880 chemin Sainte-Foy, Québec, Québec, Canada, G1S 4X4

⁵ National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, Canada, R3E 3R2

⁶ Corresponding author

**Article en préparation pour une soumission à Journal of Wildlife Diseases. Les documents relatifs à la collecte des données pour cette étude sont présentés en annexe 2 du présent mémoire.*

1. Abstract

In Canada, *Francisella tularensis*, the zoonotic bacterial agent of tularemia, affects mostly snowshoe hares (*Lepus americanus*), muskrats (*Ondatra zibethicus*) and beavers (*Castor canadensis*). Despite numerous studies, knowledge of its ecological cycle and natural reservoirs is limited. A cross-sectional study was conducted to estimate the prevalence of *F. tularensis* in snowshoe hares, muskrats and coyotes (*Canis latrans*) in four regions of Québec, Canada, and to describe the risk of infection in relation to host and environmental characteristics at multiple spatial scales. Between October 2012 and April 2013, 345 snowshoe hares, 411 muskrats and 385 coyotes were captured by trappers. Blood samples were tested by microagglutination tests (MAT) and DNA extracts of liver, kidney, lung and spleen samples of snowshoe hares and muskrats were tested by real-time PCR. Individual host characteristics, including body condition, age and sex, were evaluated as risk factors of infection, along with ecological characteristics of the location of capture extracted from geographical databases. Prevalence of antibodies against *F. tularensis* was 2.9% (95% CI: 1.2%-4.5%) in coyotes, 0.6% (95% CI: 0.0%-1.4%) in hares and 0% (95% CI: 0.0%-0.9%) in muskrats. *F. tularensis* DNA was not detected by real-time PCR in the pools of four organs from muskrats and hares but *F. tularensis* type AI was detected during testing of the individual organs of two seropositive hares. Exact logistic regression analyses showed that age was a significant predictor of seropositivity of coyotes, as were the proportion of forest and the proportion of area considered suitable habitat for hares in the environment around the location of capture of the coyotes. The results of this study suggest the presence of the terrestrial cycle of *F. tularensis* in the regions studied.

Keywords : Coyote, *Francisella tularensis*, microagglutination test, muskrat, PCR, prevalence, risk factor, snowshoe hare

2. Introduction

Tularemia is a bacterial zoonotic disease caused by *Francisella tularensis*. From 2003 to 2011, 93 human cases were reported in Canada and out of these, more than half were from the province of Québec (Institut national de santé publique du Québec, 2011; Public Health Agency of Canada, 2014). In Canada, human tularemia has been mainly associated with contact with snowshoe hares (*Lepus americanus*) and muskrats (*Ondatra zibethicus*) (Wobeser et al., 2009). Two clinically predominant subspecies are recognized in human cases: Type A, or *Francisella tularensis tularensis*, is confined to North America, and type B, or *Francisella tularensis holartica*, occurs throughout the Northern Hemisphere (Keim et al., 2007). Type A can be further divided into subpopulations, type AI and type AII, characterized by different virulence and distinct geographic divisions, with type AI being more pathogenic and well established in eastern North America (Staples et al., 2006; Molins et al., 2010).

Natural infections have been reported in more than 200 animal species, each manifesting different degrees of susceptibility to the disease (Morner and Addison, 2001). Lagomorphs and rodents are believed to be the main hosts and haematophagous arthropods, notably ticks, can play a substantial role in pathogen transmission (Jellison et al., 1961). Two main ecological cycles have been described (Eliasson et al., 2006; Telford III and Goethert, 2010). The terrestrial cycle, principally associated with type A, involves essentially rabbits, hares and ticks in a dry environment. The aquatic cycle is typically linked to type B, in close association with aquatic environments, and involves predominantly beavers, muskrats and other arvicoline rodents. Exposure to the bacterium is also frequent in carnivores, such as coyotes (*Canis latrans*). Some evidence suggests that these animals would be resistant to the disease (Gier and Ameel, 1959), rendering them a potentially good indicator of the circulation of the bacteria in the environment through the detection of antibodies.

The transmission cycle of *F. tularensis* is complex and still poorly understood, including identifying the primary natural reservoir species and the ecological factors promoting persistence and spread of the bacterium. The present study was undertaken in order to develop a better understanding of the ecology of the infection in wildlife. The objectives were to 1)

estimate the seroprevalence and prevalence of *F. tularensis* infection in snowshoes hares and muskrats and seroprevalence in coyotes in four administrative regions of Québec, Canada, 2) describe the risk of infection regarding host characteristics and environmental features as they relate to the different ecological cycles, and 3) detect spatial clusters of seropositive and PCR positive animals, which may indicate heterogeneities in environmental risk of exposure to this bacterium.

3. Materials and methods

3.1 Study area

This study was conducted in four administrative regions in the province of Québec (Abitibi-Témiscamingue, Bas-Saint-Laurent, Chaudière-Appalaches and Estrie: Figure 3). Coyotes, muskrats and snowshoe hares are trapped extensively in these regions. Abitibi-Témiscamingue is characterised by an abundance of lakes, and is comprised mostly of boreal forest in the north and mixed forest in the south with some agricultural areas. Bas-Saint-Laurent and Chaudière-Appalaches feature coastal plains along the Saint-Lawrence River with low lying agricultural areas, bordered by the Appalachian Mountains to the south. They contain some major rivers with only a few lakes, as well as predominantly coniferous and mixed forest in Bas-Saint-Laurent and broadleaf forest in Chaudière-Appalaches (Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune, 2010a, b, c). Estrie is a small region situated in the Appalachian Mountains, and features 75% forest, principally composed of mixed and broadleaf forest, 17% agricultural area and 3% open water (Conférence régionale des élus de l'Estrie, 2010).

3.2 Carcass collection

A cross-sectional study was conducted between October 2012 and April 2013 involving snowshoe hares, muskrats and coyotes. A target sample size of 100 carcasses per animal species per region was calculated to detect at least one infected animal within each sub-group with 95% confidence assuming a prevalence of at least 3% based on a literature review (Annexe 1). Trappers were recruited on a volunteer basis through local trappers' associations, and all efforts were made to cover the broadest area of each region. Carcasses were collected from regular trapping activities. For coyotes, whenever possible, a sample of blood, the left kidney with surrounding fat, and the mandible were collected by trappers once the animal was skinned; otherwise, the carcass was sent directly to the Université de Montreal for processing. Muskrat carcasses were sent after skinning by trappers, whereas intact snowshoe hare carcasses were sent. Trappers were asked to keep all specimens and carcasses frozen until

shipment to the laboratory. For each carcass collected, trappers recorded the geographical coordinates (using a hand-held Global Positioning System [GPS]) or the closest address from the capture site.

3.3 Carcass examination

All carcasses were kept at approximately 4°C until completely thawed prior to processing. For each animal, a blood sample was collected from the abdominal, thoracic and/or heart cavity and stored at -20°C prior to laboratory analyses. Samples of kidney, liver, lung and spleen were collected from snowshoe hares and muskrats and stored individually in sterile plastic bags at -80°C.

To evaluate the body condition of coyotes, we calculated the kidney fat index as the ratio of the kidney weight with the surrounding fat (including the fibrous capsule) over the kidney weight after trimming surrounding fat, using a 1 g precision scale (Huot et al., 1995; Winstanley et al., 1998). The index was averaged over the two kidneys if both kidneys were collected. For snowshoe hares, we evaluated body condition by a visual evaluation of the quantity of abdominal fat surrounding the kidneys using a scoring system from 0 to 2 (0: emaciated, no fat surrounding the kidney, 1: average, fat partially surrounding the kidney, 2: very good, fat covering the whole kidney). Kidney fat has been shown to provide an index of nutritional status in snowshoe hares (Hodges et al., 2006). The body condition was not evaluated for muskrats because no reliable method was found in the literature.

We classified coyotes as juveniles (<1 year), subadults (1-2 years) or adults (>2 year) according to a cementum age analysis performed on the lower canine at the Matson's Laboratory LLC, Milltown, Montana (Jean et al., 1986).

3.4 Microagglutination and PCR assays

Blood samples were thawed then centrifuged (4000 RPM for 5 minutes). The supernatant was placed in sterile microtubes and shipped on ice to the National Microbiology Laboratory

(NML) in Winnipeg. Upon receipt, sera were re-centrifuged and the supernatants were tested by a microagglutination test (MAT) as previously described (Sato et al., 1990). Briefly, serial dilutions of sera were prepared in U-bottom 96 well microtitre plates (Nunc, Cat. #163320) in buffer containing 1% normal rabbit serum and 0.4% formalin. An equal volume of *F. tularensis* antigen (SCH antigen, CDC Fort Collins) inactivated and stained with safranin was added to each well. Plates were tapped gently to mix and sealed with an adhesive plate cover then incubated at room temperature (20 to 25°C) overnight in an airtight container. Positive reactions resulted in a diffuse, lattice-type sediment while negative reactions produced a dense pellet. The last dilution that did not produce a discernable button was considered the endpoint titre of the serum. Animals with antibody titers $\geq 1:64$ were considered positive (see discussion for the rationale for choosing this cut-off). Additionally, we tested seroreactive coyotes with titers $\geq 1:16$ for the presence of antibodies against *Brucella abortus* by similar agglutination tests. This was done in order to have an idea of the distribution of *B. abortus* antibody titers and possibly rule out a potential cross-reaction between *F. tularensis* and *B. abortus* (Behan and Klein, 1982).

We evaluated snowshoe hares and muskrats for *F. tularensis* infection through real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) testing on a pool of kidney, liver, lung and spleen samples for each animal. In addition, based on serological results, we performed supplementary PCR tests on individual organs of the two seropositive snowshoe hares and 30 hares collected nearest to these animals (Euclidean distance). PCR was also performed on the kidneys of seroreactive coyotes ($n = 46$) with antibody titers $\geq 1:16$ to enhance our chances of detecting positive results. Each of these coyotes was paired with the nearest seronegative coyote whose kidney was also tested for *F. tularensis* infection by PCR.

DNA was extracted from approximately 0.1 cm³ of each sample using DNeasy Blood and Tissue Kits (Qiagen, Hilde Germany) following manufacturer instructions. The DNA was subject to an in-house developed real-time PCR assay targeting *fopA*. Any positive results were confirmed via two other in-house developed targets and subsequently processed for multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) using primers and probes as previously described (Vogler et al. 2009a; Vogler et al. 2009b). Electrophoretic data was

entered into GeneMarker (SoftGenetics) for sizing based on in-house allele panels, visually confirmed, and then added as a character set for analysis into Bionumerics v6.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

3.5 Environmental data

A sufficient number of positive results to perform risk factor analysis was obtained only for coyotes. Circular buffers with radii of 2, 4 and 6 km were defined around each coyote capture site corresponding to three scales of possible home ranges (respectively, 12.5 km², 50 km², 113 km²) (Messier and Barrette, 1982; Crete et al., 2001). The following environmental features found within each buffer were extracted at all scales using ArcGIS version 10.2 (ESRI, Redlands, CA). Vegetation cover was assessed using the Ecoforestry Information System (SIEF) from the Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs of Québec (2013). Wetland and waterbody covers were obtained from Ducks Unlimited (Ducks Unlimited Canada, Québec office, 2009) and CanMap Water (DMTI Spatial inc., Markham, Ontario, 2012) respectively. Five main land cover types were identified: forest, shrubland/grassland, agricultural area, wetland and waterside. For the latter, an external buffer of 10 meters was calculated around each inland waterbody to represent access to the water for the coyote. The proportion of the land cover types was calculated within three spatial scales, using the area of the buffer excluding waterbodies.

The availability of suitable habitat for snowshoe hare within each buffer was assessed using the habitat suitability model (HSM) for this species in Québec (Forêt Modèle Bas-St-Laurent et Université du Québec à Rimouski, 2003). The HSM uses information from the SIEF database to classify forest stands in terms of their capacity to offer forage and cover to snowshoe hares (high=0.75, medium=0.5, low=0.25 and none=0). An area-weighted average of habitat suitability was also calculated for each buffer to give a global index of habitat suitability (GIHS). The proportion of high level habitat suitability (HLHS) and GIHS were calculated for each spatial scale as described for the land cover variables.

For the GPS position of each coyote, mean temperature and precipitation data were obtained from an interpolated grid (from 2002 to 2010) from the National Land and Water Information Service of Canada (McKenney et al., 2011).

3.6 Statistical analyses

We estimated prevalence of PCR-positive and seropositive animals with 95% exact confidence limits for each animal species. Exact logistic regression models, performed in SAS software version 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC), were used to model the serological status of coyotes according to animal-level and environmental characteristics (Table I). The exact logistic regression is recommended for analyzing sparse datasets such as the one used here (Derr, 2000). Based on our proposed causal web diagram (Figure 5), two different models were considered which included variables from individual characteristics, water-related land, climatic conditions, as well as vegetation cover for models “I” and potential hare habitat for models “II”. If the linearity assumption was not respected (Dohoo et al., 2003), continuous variables were categorized using the 25th and 75th percentiles (from the 4 km buffer) as cut-offs. All explanatory variables with P values ≤ 0.20 from univariate analyses were considered eligible for inclusion in the multivariable logistic regression analysis (Table I), with the exception of potential confounders which were included in the full models regardless of the P value. Pairwise Pearson correlations among explanatory variables selected from univariate analyses were calculated on the continuous scale. If a strong correlation ($|r| > 0.7$) was detected, only one variable was included in the full models based on the strongest biological plausibility. The final models were obtained using a backward selection procedure with $P > 0.15$ (exact conditional analysis) as the rejection criterion, allowing for the liberal inclusion of variables. Potential confounding factors were kept in the final models if their removal would change the coefficient of other predictors of interest by more than 30% or if their P was ≤ 0.15 .

The scales of analysis giving the best performing model were identified in models “I” and models “II” by comparing two performance metrics among models: 1) the area under the curve (AUC) of the receiver-operator characteristic (ROC) curve for each model and 2) the

model classification accuracy when using the sensitivity-specificity equivalence point as a cut-off value for classification (Caraguel et al., 2011). Classification statistics were calculated using the ROCR package version 1.0-5 in R (R Development Core Team, R version 3.1.2). For the variables kept in the models “I” and “II” comprising the highest AUC, the impact of the potential imperfect sensitivity of the diagnostic tests on the odds ratio estimates was assessed in deterministic sensitivity analyses performed in two-way contingency tables, keeping specificity at 1.00 or 0.99 (Fox et al., 2014).

Presence of spatial clusters of seropositive coyotes was assessed using the Kulldorff spatial scan test (Bernoulli model) performed in SatScan version 9.2 (Kulldorff, 1997). The significance ($\alpha \leq 0.15$) of clusters was determined through 999 Monte Carlo replicates.

4. Results

A total of 1141 carcasses were collected in the four regions during the trapping season from October 2012 to April 2013, which included 385 coyotes (Female=190, Male=190, Missing=5), 345 snowshoe hares (Female=162, Male=177, Missing=6) and 411 muskrats (Female =199, Male=201, Missing=11) (Figure 3). Body condition of snowshoe hares was distributed as follows: 151 below average, 115 average and 65 very good (Missing=14). Individual characteristics of coyotes are presented in Table I. Missing data were due to lack of assessment, sometimes because of poor conservation or missing parts of carcasses.

Anti-*F. tularensis* antibodies were detected only in 11 coyotes and two hares (Figure 4; Table II and III). In contrast, antibodies against *Brucella abortus* were not detected (titer < 1:20) in the 46 samples of coyotes which had *F. tularensis* antibody titers $\geq 1:16$.

All tested organ pools of muskrats ($n=411$) and snowshoe hares ($n=345$) were PCR-negative, as well as each kidney of the 46 coyotes with antibody titers $\geq 1:16$ and of 46 location-matched seronegative coyotes (i.e. captured on median at 0.24 km (range=0 to 57 km) away from each seroreactive coyote). However, DNA of *F. tularensis* was detected in spleen or lung tissues processed individually (i.e., not pooled) from the two seropositive snowshoe hares collected in Bas-Saint-Laurent. All individual organs of the 30 other hares located closest to these two animals (median at 17 km (range=0 to 28 km)) were PCR-negative. The MLVA patterns of the two positive hares clustered with type AI isolates within the NML in-house database. The two patterns differed by only one of the eleven loci used, locus M03, a marker well-known to mutate rapidly (diversity $D=0.95$) (data not shown).

In the risk factor analysis for seropositivity of coyotes, all continuous variables did not respect the linearity assumption and were therefore categorized. The age, forest, agricultural area, wetland, HLHS and GIHS variables were selected from univariate analyses for at least one spatial scale (Table I).

Collinearity was detected between forest and agricultural area variables, as well as HLHS and GIHS variables. Forest and HLHS were selected for inclusion in the full models. Higher odds of seropositivity were observed in subadult coyotes compared to juveniles in both models “I” and “II” (Tables IV and V), in areas with higher percentage of forest in models “I” (Table IV) and in areas with higher suitability for hare in models “II” (Table V). Temperature was retained as a potential confounder only for the model “II” using a radius of 4 km (Table V).

Very similar results from the AUC and the sensitivity-specificity approach were obtained in models “I” and “II” making it difficult to distinguish the most accurate models (Table IV and V). Furthermore, we could not perform the sensitivity analyses for misclassification on models “I” because of the presence of zero cells. Imperfect sensitivity of the diagnostic test for the model ‘II’ comprising the highest AUC (radius of 4 km) was associated to an underestimation of the odds ratios for age and HLHS by less than 5% for the tested range of value (Table VI).

No spatial clusters of seropositive coyotes were detected ($P>0.54$, Figure 4).

5. Discussion

We found a seroprevalence of 0.6% in snowshoe hares, in agreement with the 0 to 1.6% seroprevalences reported in various provinces of Canada between 1961 and 1992 (Hoff et al., 1970; Zarnke and Yuill, 1981; Akerman and Embil, 1982; Cayouette, 1993). However, higher seroprevalences in snowshoe hares were described in two previous studies in Ontario, one of these following an outbreak in muskrats (Mac Lulich, 1937; Ditchfield et al., 1960). The low seroprevalence frequently seen in snowshoe hares could be driven by a low exposure to *F. tularensis* or a high susceptibility to the disease. While many authors suspect, based upon years of observations, that most snowshoe hares, unlike cottontail rabbits, are not affected by the infection (Green, 1938; Green, 1939; Jellison and Parker, 1945), significant mortality in snowshoe hares has been observed occasionally during outbreaks of tularemia and when animals are experimentally infected (Jellison et al., 1961; Miller, 1974). In our study, the detection of *F. tularensis* DNA in organs from two seropositive snowshoe hares suggests that infected snowshoe hares can develop antibodies and survive infection even with the most virulent type A1 strain.

No evidence of infection was found in muskrats, as in previous studies conducted in endemic areas in Saskatchewan (personal communication Dr FA Leighton) and in Germany (von Keyserlingk et al., 2011). However, a prevalence of 5% by culture and 41% by agglutination tests was reported in muskrats in Vermont following a large outbreak of tularemia in humans (Young et al., 1969). According to many authors, infection in muskrats usually results in sudden death (Jellison et al., 1961; Bell and Stewart, 1983; Perron, 1984; World Health Organization, 2007), which could explain the absence of seropositive muskrats in our study. This is further supported by very high mortality rates in muskrat populations affected by tularemia (McDermid, 1946; Jellison et al., 1951; Parker et al., 1951) along with the fact that infection is usually detected in dead or trapped muskrats following a tularemia outbreak (McDermid, 1946; Jellison et al., 1951; Parker et al., 1951; Labzoffsky and Sprent, 1952; Fyvie et al., 1959; Ditchfield et al., 1960). It is also possible that muskrats were not exposed to *F. tularensis* if the bacteria was not present in the aquatic cycle at the moment and in the area of the study.

We detected anti-*F. tularensis* antibodies in 2.9% of coyotes. In United States, reported seroprevalence values range from 0 to 32% (Thorpe et al., 1965; Trainer and Knowlton, 1968; Gese et al., 1997; Arjo et al., 2003; Gese et al., 2004; Bischof and Rogers, 2005; Chronert, 2007) or occasionally higher (i.e., 88%) (Gier et al., 1978). We did not detect the infection by PCR in the kidneys of all 92 coyotes tested including the 46 seroreactive coyotes; which, to our knowledge, has never been investigated previously in free-ranging coyotes. Although we cannot rule out the presence of the bacteria in other organs of these coyotes, the detection of antibodies coupled with the absence of evidence of infection supports a commonly held belief that coyotes are resistant to tularemia. In fact, apart from very young coyote pups, experimentally infected coyotes recover from infection and, additionally, are not likely to disseminate the bacteria in the environment (Stagg et al., 1956; Lundgren et al., 1957).

Subadult coyotes seemed more at risk of being seropositive than juveniles, whereas an absence of association ($P \geq 0.67$) between age and risk was observed in previous studies (Gese et al., 1997; Arjo et al., 2003; Gese et al., 2004). Experimental infections demonstrate that very young coyotes can occasionally die as a result of infection with *F. tularensis* (Parker and Francis, 1926; Marchette, 1960), which could therefore result in a disproportionate removal of exposed young coyotes compared to subadults. Secondly, subadult coyotes, as inexperienced hunters, may be more likely to feed on dead or dying animals that might be infected with *F. tularensis*. Sex was not associated with seropositivity in coyotes, as previously reported (Gese et al., 2004), neither was the body condition, supporting a subclinical infection or a full recovery following the infection.

The results from models “I” suggest that forests might contain significant ecological characteristics for transmission of the bacteria. Wooded areas are suitable for certain species of ticks in Québec that can be vectors of tularemia, such as the American dog tick (*Dermacentor variabilis*) (Bishopp and Trembley, 1945; Hopla, 1974). Alternatively, models “II” suggest that snowshoe hares might play a significant role in the infection of coyotes, perhaps as a result of the prey-predator relationship. Interestingly, the coyote that was collected closest to the two seropositive hares (16 km away) was seropositive, supporting the

possibility of transmission between these two species. It is known that rabbit ticks (*Haemaphysalis leporispalustris*), a potential vector of *F. tularensis*, are highly host-specific for hares and rabbits (Bishopp and Trembley, 1945; Telford III and Goethert, 2010). According to a study conducted in Québec, all snowshoe hares examined in the summer of 1992 were heavily and exclusively infested with these ticks, suggesting a very high potential for their involvement in *F. tularensis* transmission (Cayouette, 1993). Thus, snowshoe hares associated with rabbit ticks may constitute a potential poly-species reservoir of *F. tularensis*, a concept previously proposed by different authors (Hopla, 1974; Cayouette, 1993).

We failed to detect spatial clusters of seropositive coyotes. This is in contrast with the general belief that tularemia persists in natural foci (Pavlovsky et al., 1966), as supported by studies in which clusters were detected (Goethert and Telford III, 2009; Svensson et al., 2009). However, we cannot rule out the possibility that each positive coyote was linked to separate small natural foci that occurred at various periods in the past or that the geographical location where the coyote was captured does not represent the exact location of exposure to the infection since these animals can roam long distances.

Our study has some limitations inherent in the cross-sectional nature of our research, such as the inability to determine the timing of infection acquisition. Secondly, the lack of statistical power due to low seroprevalence may have limited our chances of detecting significant results in the statistical modeling and spatial analysis. Also, samples were obtained from trapped animals; the exclusion of dead and perhaps moribund animals may have under-estimated the prevalence of infection. Furthermore, blood samples were partially diluted with body fluids and organs were sometimes partially autolysed, which may have reduced the sensitivity of detection tests. Pooling of organs for PCR tests may have decreased the probability of detecting *F. tularensis* DNA as observed for our two seropositive hares, possibly because all organs were not equally infected. However, this potential lack of test sensitivity gave conservative estimates for the risk factors according to simulations and therefore was mostly a concern in prevalence estimation. We used an antibody titre cut-off of $\geq 1:64$, which is lower than the $\geq 1:128$ used to diagnose an active infection in humans. However, while no cut-off has been validated in wildlife species, *F. tularensis* DNA was detected in a hare with an antibody

titer of 1:64, which supported use of 1:64 rather than a higher threshold for detecting serological responses in early infection as well as in recovered animals. This was also supported by the likely absence of cross-reactions with anti-*Brucella* antibody. Finally, this study was essentially exploratory justifying our choice of using a liberal statistical significance ($\alpha \leq 0.15$) for our analysis. Therefore, the associations found in our study must be seen as preliminary and need to be validated by further studies.

Our results collectively suggest that a terrestrial cycle is present in the area studied: positive results in snowshoe hares and coyotes, identification of the strain type AI with forest and a high level of hare habitat suitability as risk factors. This is also supported by a recent report of type AI in 78% of humans and 100% of hare isolates from 1998 to 2011 within Québec (Antonation et al., 2014). Furthermore, we found no evidence of the aquatic cycle with all muskrats testing negative and none of the water-related variables being statistically relevant in our models. Despite our results, the existence of the aquatic cycle in Québec cannot be ruled out. In fact, type B was also isolated in humans in high muskrat density areas in Québec (Antonation et al., 2014). Further studies should be conducted to evaluate the possible existence of the aquatic cycle as well as the role of snowshoe hares and ticks in the terrestrial cycle of *F. tularensis* in Québec. Moreover, the use of trapped coyotes for the surveillance of *F. tularensis* circulation in the environment is an interesting avenue that could be further evaluated.

6. Acknowledgments

Funding for this project was provided by the Public Health Agency of Canada, the Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs, and the Research Group on Epidemiology of Zoonoses and Public Health (GREZOSP) through a financial agreement with the *Institut national de santé publique du Québec* (INSPQ). This work was also made possible through graduate student research awards from the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT), Lucie Besner grant, Université de Montréal (Faculty of veterinary medicine and Faculty of graduate studies) attributed to V. Gabriele-Rivet. Authors are most grateful to Pierre Canac-Marquis, Thérèse Lanthier, Andres Ivan Ramirez, Josée Guillemette, Jessie Longpré, Sonia Bernier, Huguette Mallet, the Matson's Laboratory LLC, the Centre Québécois sur la santé des animaux sauvages, the National Land and Water Information Service of Canada as well as all trappers for their important contribution to the field work.

7. Literature cited

- Akerman MB, Embil JA. 1982. Antibodies to *Francisella tularensis* in the snowshoe hare (*Lepus americanus struthopus*) populations of Nova Scotia and Prince Edward Island and in the moose (*Alces alces americana Clinton*) population of Nova Scotia. *Can J Microbiol* 28(4):403-405.
- Antonation KS, Bekal S, Côté G, Dallaire A, Corbett CR. 2014. Multiple locus variable number tandem repeat analysis of *Francisella tularensis* from Québec, Canada. *Lett Appl Microbiol* Accepted paper.
- Arjo WM, Gese EM, Bromley C, Kozlowski A, Williams ES. 2003. Serologic survey for diseases in free-ranging coyotes (*Canis latrans*) from two ecologically distinct areas of Utah. *J Wildl Dis* 39(2):449-455.
- Behan K, Klein G. 1982. Reduction of *Brucella* species and *Francisella tularensis* cross-reacting agglutinins by dithiothreitol. *J Clin Microbiol* 16(4):756-757.
- Bell J, Stewart S. 1983. Quantum differences in oral susceptibility of voles, *Microtus pennsylvanicus*, to virulent *Francisella tularensis* type B, in drinking water: implications to epidemiology. *Ecol Dis* 2(2):151.
- Bischof R, Rogers DG. 2005. Serologic survey of select infectious diseases in coyotes and raccoons in Nebraska. *J Wildl Dis* 41(4):787-791.
- Bishopp FC, Trembley HL. 1945. Distribution and hosts of certain North American ticks. *J Parasitol* 31(1):1-54.
- Caraguel CG, Stryhn H, Gagné N, Dohoo IR, Hammell KL. 2011. Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: analytical and epidemiologic approaches. *J Vet Diagn Investig* 23(1):2-15.
- Cayouette S. 1993. *Étude éco-morphologique de la tique du lapin Haemaphysalis leporispalustris packard (acari: Ixodae) et de son potentiel comme vecteur de la tularémie chez le lièvre d'Amérique au Québec*. Maîtrise, Sciences de l'environnement, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, 108 pp.
- Chronert JM. 2007. *Ecology of the coyote (Canis latrans) at Wind Cave National Park*. Master of Science, Wildlife and Fisheries Sciences Department, South Dakota State University, South Dakota, 123 pp.
- Conférence régionale des élus de l'Estrie. 2010. *Portrait de la forêt naturelle et des enjeux écologiques de l'Estrie*. 105 pp.
- Crete M, Ouellet J-P, Tremblay J-P, Arsenault R. 2001. Suitability of the forest landscape for coyotes in northeastern North America and its implications for coexistence with other carnivores. *Ecoscience* 8(3):311-319.
- Derr RE. 2000. Performing exact logistic regression with the SAS system. In: *Proceedings of the Proc Twenty-Fifth Annual SAS® Users Group International Conference*, pp. 1-10.

- Ditchfield J, Meads EB, Julian RJ. 1960. Tularemia of muskrats in Eastern Ontario. *Can J Public Health* 51:474-478.
- Dohoo IR, Martin W, Stryhn HE. 2003. *Veterinary epidemiologic research*, Charlottetown, Prince Edward Island, Canada, 706 pp.
- Eliasson H, Broman T, Forsman M, Back E. 2006. Tularemia: Current epidemiology and disease management. *Infect Dis Clin North Am* 20(2):289-311.
- Forêt Modèle Bas-St-Laurent et Université du Québec à Rimouski. 2003. *Indices de qualité d'habitat*. 58 pp.
- Fox M, Fink A, Lash T. 2014. *Applying quantitative bias analysis to epidemiologic data*, <https://sites.google.com/site/biasanalysis/>. Accessed November 2014.
- Fyvie A, Ross WG, Labzoffsky NA. 1959. Tularemia among muskrats on Walpole Island, Lake St. Clair, Ontario. *Can J Comp Med Vet Sci* 23(5):153-156.
- Gese EM, Karki SM, Klavetter ML, Schauster ER, Kitchen AM. 2004. Serologic survey for canine infectious diseases among sympatric swift foxes (*Vulpes velox*) and coyotes (*Canis latrans*) in Southeastern Colorado. *J Wildl Dis* 40(4):741-748.
- Gese EM, Schultz RD, Johnson MR, Williams ES, Crabtree RL, Ruff RL. 1997. Serological survey for diseases in free-ranging coyotes (*Canis latrans*) in Yellowstone National Park, Wyoming. *J Wildl Dis* 33(1):47-56.
- Gier HT, Ameel DJ. 1959. *Parasites and diseases of Kansas coyotes*. Kansas Technical Bulletin 91. Agricultural Experiment Station, Kansas State College of Agriculture and Applied Science, Kansas State University, Manhattan, Kansas, 34 pp.
- Gier HT, Kruckenberg SM, Marler RJ. 1978. Parasites and diseases of coyotes. In: *Coyotes: biology, behavior, and management*, M. Bekoff, (editor). Academic Press, Inc, New York, USA & London, pp. 37-71.
- Goethert HK, Telford III SR. 2009. Nonrandom distribution of vector ticks (*Dermacentor variabilis*) infected by *Francisella tularensis*. *PLoS pathogens* 5(2):e1000319.
- Green RG. 1938. *Gross lesions of tularaemia in cottontail rabbits and snowshoe hares*. Minnesota Wildlife Disease Investigation. Division of Game and Fish, Minnesota Department of Conservation, 2-3 pp.
- Green RG. 1939. Tularaemia, a common disease in wild animals. *The Minnesota conservationist* 67:14-16.
- Hodges KE, Boonstra R, Krebs CJ. 2006. Overwinter mass loss of snowshoe hares in the Yukon: starvation, stress, adaptation or artefact? *J Anim Ecol* 75(1):1-13.
- Hoff GL, Yuill TM, Iversen JO, Hanson RP. 1970. Selected microbial agents in snowshoe hares and other vertebrates of Alberta. *J Wildl Dis* 6(4):472-478.
- Hopla C. 1974. The ecology of tularemia. *Adv Vet Sci Comp Med* 18:25-53.
- Huot J, Poulle M-L, Crete M. 1995. Evaluation of several indices for assessment of coyote (*Canis latrans*) body composition. *Can J Zool* 73(9):1620-1624.

- Institut national de santé publique du Québec. 2011. Statistiques d'analyses du Laboratoire de santé publique du Québec. *Bulletin STATLABO* 10(11):1-12.
- Jean Y, Bergeron J-M, Bisson S, Larocque B. 1986. Relative age determination of coyotes *Canis latrans* from Southern Québec, Canada. *Can Field-Nat* 100(4):483-487.
- Jellison WL, Kohls GM, Philip CB. 1951. Tularemia-muskrats as a source of human infection in Utah. *Rocky Mt Med J* 48(8):594-597.
- Jellison WL, Owen CR, Bell JF, Kohls GM. 1961. Tularemia and animal populations: ecology and epizootiology. *Wildl Dis* 17:1-22.
- Jellison WL, Parker R. 1945. Rodents, rabbits and tularemia in North America: some zoological and epidemiological considerations. *Am J Trop Med Hyg* 1(4):349-362.
- Keim P, Johansson A, Wagner DM. 2007. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Ann N Y Acad Sci* 1105:30-66.
- Kulldorff M. 1997. A spatial scan statistic. *Comm Statist Theory Meth* 26(6):1481-1496.
- Labzoffsky NA, Sprent JFA. 1952. Tularemia among beaver and muskrat in Ontario. *Can J Med Sci* 30:250-255.
- Lundgren DL, Marchette NJ, Smart KL. 1957. Tularemia in the coyote *Canis latrans lestes* Merriam. *J Infect Dis* 101(2):154-157.
- Mac Lulich DA. 1937. Fluctuations in the numbers of varying hare (*Lepus americanus*). *Univ Toronto Stud Biol Ser* 43:1-136.
- Marchette NJ. 1960. *Experimental tularemia in wild animals*. Doctor of Philosophy, Department of Bacteriology, University of Utah, Salt Lake City, 92 pp.
- McDermid AM. 1946. Report on muskrat disease. *Wis Cons Bull* 11(8-9):21-22.
- McKenney DW, Hutchinson MF, Papadopol P, Lawrence K, Pedlar J, Campbell K, Milewska E, Hopkinson RF, Price D, Owen T. 2011. Customized spatial climate models for North America. *Bulletin of the American Meteorological Society* 92(12):1611-1622.
- Messier F, Barrette C. 1982. The social system of the coyote (*Canis latrans*) in a forested habitat. *Can J Zool* 60(7):1743-1753.
- Miller LG. 1974. Further studies on tularemia in Alaska: virulence and biochemical characteristics of indigenous strains. *Can J Microbiol* 20(11):1585-1590.
- Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune. 2010a. *Portrait territorial : Abitibi-Témiscamingue*. Gouvernement du Québec, Québec, Qc, 80 pp.
- Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune. 2010b. *Portrait territorial : Bas-Saint-Laurent*. Gouvernement du Québec, Québec, Qc, 117 pp.
- Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune. 2010c. *Portrait territorial : Chaudière-Appalaches*. Gouvernement du Québec, Québec, Qc, 107 pp.
- Molins CR, Delorey MJ, Yockey BM, Young JW, Sheldon SW, Reese SM, Schriefer ME, Petersen JM. 2010. Virulence differences among *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* clades in mice. *PLoS ONE* 5(4):e10205.

- Morner T, Addison E. 2001. Tularemia. In: *Infectious diseases of wild mammals*, E. S. Williams, AND I. K. Barker, (editors), Iowa State University Press, pp. 303-312.
- Parker R, Francis E. 1926. Susceptibility of the coyote (*Canis testes*) to tularemia. *Public Health Rep* 41(28):1407-1410.
- Parker RR, Steinhilber EA, Kohls GM, Jellison WL. 1951. Contamination of natural waters and mud with *Pasteurella tularensis* and tularemia in beavers and muskrats in the northwestern United States. *Bull Natl Inst Health* 193:1-59.
- Pavlovsky EN, Plous JR FK, Levine ND. 1966. Natural nidity of transmissible diseases. *Am J Med Sci* 252(5):161.
- Perron D. 1984. Tularémie : situation particulière dans la vallée du Richelieu, Québec. *Méd Vét Québec* 14(4):183-185.
- Public Health Agency of Canada. 2014. *Notifiable diseases on-line*, <http://dsol-smed.phac-aspc.gc.ca/dsol-smed/ndis/index-eng.php>. Accessed October 2014.
- R Development Core Team. R version 3.1.2. *R: A language and environment for statistical computing*, <http://www.R-project.org>. Accessed December 2014.
- Sato T, Fujita H, Ohara Y, Homma M. 1990. Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of tularemia. *J Clin Microbiol* 28(10):2372-2374.
- Stagg G, Tanner WS, Lavender J. 1956. Experimental infections of native animals with *Pasteurella tularensis*. *J Infect Dis* 99(1):34-37.
- Staples JE, Kubota KA, Chalcraft LG, Mead PS, Petersen JM. 2006. Epidemiologic and molecular analysis of human tularemia, United States, 1964–2004. *Emerg Infect Dis* 12(7):1113.
- Svensson K, Bäck E, Eliasson H, Berglund L, Granberg M, Karlsson L, Larsson P, Forsman M, Johansson A. 2009. Landscape epidemiology of tularemia outbreaks in Sweden. *Emerg Infect Dis* 15(12):1937-1947.
- Telford III SR, Goethert HK. 2010. Toward an understanding of the perpetuation of the agent of tularemia. *Front Microbiol* 1(150):1-7.
- Thorpe BD, Sidwell R, Johnson D, Smart K, Parker D. 1965. Tularemia in the wildlife and livestock of the Great Salt Lake Desert region, 1951 through 1964. *Am J Trop Med Hyg* 14(4):622-637.
- Trainer DO, Knowlton FF. 1968. Serologic evidence of diseases in Texas coyotes. *J Wildl Manage* 32(4):981-983.
- von Keyserlingk M, Runge M, Braune S. 2011. Tularämie in Niedersachsen: Wissenslücke geschlossen. *Niedersächsischer Jäger* 12(20):20-23.
- Winstanley RK, Saunders G, Buttemer WA. 1998. Indices for predicting total body fat in red foxes from Australia. *J Wildl Manage*:1307-1312.
- Wobeser G, Campbell GD, Dallaire A, McBurney S. 2009. Tularemia, plague, yersiniosis, and Tyzzer's disease in wild rodents and lagomorphs in Canada: a review. *Can Vet J* 50(12):1251-1256.

World Health Organization. 2007. *WHO guidelines on tularaemia*. WHO/CDS/EPR/2007.7. WHO, Geneva, CH, 115 pp.

Young LS, Bicknell DS, Archer BG, Clinton JM, Leavens LJ, Feeley JC. 1969. Tularemia epidemic: Vermont, 1968: forty-seven cases linked to contact with muskrats. *N Engl J Med* 280(23):1253-1260.

Zarnke R, Yuill TM. 1981. Serologic survey for selected microbial agents in mammals from Alberta Canada 1976. *J Wildl Dis* 17(3):453-462.

8. Tables

Table I. Descriptive statistics of potential risk factors and results from univariate analyses for seropositivity in 383^a coyotes trapped between October 2012 and April 2013 in Québec, Canada.

Characteristics	R = 2km			R = 4km			R = 6km		
	n	% pos	<i>P</i> -value	n	% pos	<i>P</i> -value	n	% pos	<i>P</i> -value
Individual characteristics									
Age			0.08			0.08			0.08
Juvenile	245	2.0		245	2.0		245	2.0	
Subadult	95	6.3		95	6.3		95	6.3	
Adult	43	0.0		43	0.0		43	0.0	
Sex ^b			1.00			1.00			1.00
Male	190	3.2		190	3.2		190	3.2	
Female	188	2.7		188	2.7		188	2.7	
Body condition ^b			0.41			0.41			0.41
< 1.5	95	4.2		95	4.2		95	4.2	
1.5-1.8	191	3.1		191	3.1		191	3.1	
>1.8	96	1.0		96	1.0		96	1.0	
Environmental characteristics^c									
Vegetation cover									
Forest (%) ^d			0.01			0.03			0.02
< 35.7	104	0.0		95	0.0		79	0.0	
35.7-71.5	171	2.3		190	2.6		199	2.0	
> 71.5	106	6.6		96	6.3		103	6.8	
Shrubland/grassland (%) ^d			0.58			0.93			0.78
< 2.9	132	3.8		96	2.1		91	3.3	
2.9-5.5	158	3.2		189	3.2		201	2.5	
> 5.5	91	1.1		96	3.1		89	3.4	
Agricultural area (%) ^d			0.01			0.02			0.01
< 8.0	115	7.0		95	7.4		91	7.7	
8.0-42.5	167	1.8		191	1.6		210	1.4	
> 42.5	99	0.0		95	1.1		80	1.3	
Water-related land									
Waterside (%) ^e			0.12			0.72			0.37
< 1.8	102	5.9		96	4.2		95	5.3	
1.8-2.4	149	1.3		190	2.6		217	2.3	
> 2.4	130	2.3		95	2.1		69	1.5	
Wetland (%) ^d			0.36			0.53			0.15
< 0.9	158	4.4		94	3.2		63	4.8	

Characteristics	R = 2km			R = 4km			R = 6km		
	n	% pos	<i>P</i> -value	n	% pos	<i>P</i> -value	n	% pos	<i>P</i> -value
0.9-14.7	130	1.5		193	3.6		195	3.6	
> 14.7	93	2.2		94	1.1		123	0.8	
Suitable habitat for hare									
High level habitat suitability (%) ^f			0.03			0.01			0.09
< 2.3	110	0.9		93	2.2		85	2.4	
2.3-10.8	166	1.8		192	1.0		223	1.8	
> 10.8	105	6.7		96	7.3		73	6.9	
Global habitat suitability ^g			0.03			0.09			0.11
< 9.1	92	0.0		92	1.1		81	1.2	
9.1-21.7	171	2.3		197	2.0		202	2.0	
> 21.7	118	5.9		92	6.5		98	6.1	
Climatic conditions									
Mean annual precipitation (mm) ^h			0.86			0.86			0.86
< 1085	98	2.0		98	2.0		98	2.0	
1085-1226	186	3.2		186	3.2		186	3.2	
> 1226	97	3.1		97	3.1		97	3.1	
Mean annual temperature (°C) ^h			0.16			0.16			0.16
< 2.9	95	1.1		95	1.1		95	1.1	
2.9-4.8	192	4.7		192	4.7		192	4.7	
> 4.8	94	1.1		94	1.1		94	1.1	

^a Two coyotes were not tested by the microagglutination tests.

^b The sex was not determined for 5 coyotes and the body condition for 1 coyote.

^c The location of capture was not provided for two coyotes.

^d Proportion of each land cover types within each home range scale using the area of circular buffers excluding waterbodies for the calculation.

^e Proportion of waterside (10m external buffer around waterbody perimeters) within each home range scale, using the area of circular buffers excluding waterbodies for the calculation.

^f Proportion of high level habitat suitability for hare within each home range scale, using the area of circular buffers excluding waterbodies for the calculation.

^g Addition of the proportion of different potential hare habitat weighted by their index

^h Climatic conditions from 2010 to 2012

Table II. Prevalence of antibodies (%) against *F. tularensis* in coyotes, snowshoe hares and muskrats trapped between October 2012 and April 2013 in Québec, Canada^a.

Regions	Coyote		Snowshoe hare		Muskrat	
	<i>n</i>	Prevalence (95% CI)	<i>n</i>	Prevalence (95% CI)	<i>n</i>	Prevalence (95% CI)
Abitibi-Témiscamingue	75	1.3 (0.0, 3.9)	78	0.0 (0.0, 0.0)	107	0.0 (0.0, 0.0)
Bas-Saint-Laurent	88	4.6 (0.2, 8.9)	90	<0.1 (0.0, 0.1)	89	0.0 (0.0, 0.0)
Chaudière-Appalaches	106	1.9 (0.0, 4.5)	95	0.0 (0.0, 0.0)	101	0.0 (0.0, 0.0)
Estrie	114	3.5 (0.1, 6.9)	74	0.0 (0.0, 0.0)	106	0.0 (0.0, 0.0)
Total	383	2.9 (1.2, 4.5)	337	0.6 (0.0, 1.4)	403	0.0 (0.0, 0.9)

^a In this study, 385 coyotes, 345 snowshoe hares and 411 muskrats were captured. Blood samples could not be collected in 2 coyotes, 8 snowshoe hares and 8 muskrats.

Table III. *F. tularensis* antibody titer results of agglutination tests performed on coyotes, snowshoe hares and muskrats trapped between October 2012 and April 2013 in Québec, Canada.

Antibody titer	Number of animals		
	Coyote	Snowshoe hare	Muskrat
1:256	0	1	0
1:128	5	0	0
1:64	6	1	0
1:32	14	0	0
1:16	21	0	0
1:8	29	4	7
1:4	47	7	20
<1:4	261	324	376
Total	383	337	403

Table IV. Final multivariable logistic regression for models “I” predicting *F. tularensis* seropositivity in trapped coyotes at various geographical scales, Québec, Canada.

Characteristics	Odds ratio			Global <i>P</i> -Value	AUC ^a	Accuracy
	Estimate	(95% CI)	<i>P</i> -value			
<i>Radius=2 km</i>					0.81	0.77
Age				0.07		
Subadult vs Juvenile	3.19	(0.77, 13.89)	0.12			
Subadult vs Adult	4.37	(0.79, Infinity)	0.16			
Juvenile vs Adult	1.37	(0.24, Infinity)	0.79			
Forest (%)				0.01		
> 71.5 vs < 35.7	9.89	(1.89, Infinity)	0.02			
> 71.5 vs 35.7-71.5	3.25	(0.79, 15.80)	0.11			
35.7-71.5 vs < 35.7	2.93	(0.49, Infinity)	0.35			
<i>Radius=4 km</i>					0.79	0.66
Age				0.09		
Subadult vs Juvenile	2.88	(0.70, 12.38)	0.16			
Subadult vs Adult	3.93	(0.71, Infinity)	0.20			
Juvenile vs Adult	1.36	(0.24, Infinity)	0.80			
Forest (%)				0.05		
> 71.5 vs < 35.7	7.64	(1.41, Infinity)	0.04			
> 71.5 vs 35.7-71.5	2.67	(0.65, 11.48)	0.20			
35.7-71.5 vs < 35.7	2.85	(0.51, Infinity)	0.35			
<i>Radius=6 km</i>					0.80	0.77
Age				0.10		
Subadult vs Juvenile	3.21	(0.78, 13.97)	0.16			
Subadult vs Adult	3.98	(0.72, Infinity)	0.20			
Juvenile vs Adult	1.24	(0.22, Infinity)	0.86			
Forest (%)				0.02		
> 71.5 vs < 35.7	7.31	(1.39, Infinity)	0.04			
> 71.5 vs 35.7-71.5	3.78	(0.92, 18.31)	0.07			
35.7-71.5 vs < 35.7	1.86	(0.31, Infinity)	0.60			

^a Area under the curve (AUC) of the receiver-operator characteristic (ROC) curve.

Table V. Final multivariable logistic regression for models “II” predicting *F. tularensis* seropositivity in trapped coyotes at various geographical scales, Québec, Canada.

Characteristics	Odds ratio			Global <i>P</i> -value	AUC ^a	Accuracy
	Estimate	(95% CI)	<i>P</i> -value			
<i>Radius=2 km</i>					0.80	0.76
Age				0.07		
Subadult vs Juvenile	3.45	(0.84, 15.02)	0.09			
Subadult vs Adult	4.21	(0.77, Infinity)	0.18			
Juvenile vs Adult	1.22	(0.22, Infinity)	0.87			
High level habitat suitability (%)				0.03		
> 10.8 vs < 2.3	7.90	(0.98, 364.46)	0.05			
> 10.8 vs 2.3-10.8	4.23	(0.92, 26.44)	0.07			
2.3-10.8 vs < 2.3	1.87	(0.15, 99.78)	1.00			
<i>Radius=4 km</i>					0.84	0.82
Age				0.08		
Subadult vs Juvenile	3.45	(0.83, 15.13)	0.10			
Subadult vs Adult	4.08	(0.74, Infinity)	0.19			
Juvenile vs Adult	1.19	(0.21, Infinity)	0.89			
High level habitat suitability (%)				0.05		
> 10.8 vs 2.3-10.8	6.09	(1.07, 63.89)	0.04			
< 2.3 vs 2.3-10.8	2.88	(0.19, 43.21)	0.59			
> 10.8 vs < 2.3	2.08	(0.31, 24.98)	0.69			
Temperature (°C)				0.44		
2.9-4.8 vs < 2.9	3.79	(0.42, 191.72)	0.40			
2.9-4.8 vs > 4.8	2.97	(0.31, 151.71)	0.60			
> 4.8 vs < 2.9	1.26	(0.02, 102.20)	1.00			
<i>Radius=6 km</i>					0.77	0.65
Age				0.07		
Subadult vs Juvenile	3.43	(0.84, 14.84)	0.09			
Subadult vs Adult	4.26	(0.78, Infinity)	0.17			
Juvenile vs Adult	1.24	(0.22, Infinity)	0.86			
High level habitat suitability (%)				0.08		
> 10.8 vs 2.3-10.8	4.31	(0.89, 22.75)	0.07			
> 10.8 vs < 2.3	3.41	(0.53, 37.69)	0.26			
< 2.3 vs 2.3-10.8	1.26	(0.11, 9.09)	1.00			

^a Area under the curve (AUC) of the receiver-operator characteristic (ROC) curve.

Table VI. Odds ratio estimates of significant risk factors for model “II” obtained from sensitivity analyses for imperfect sensitivity and specificity of serologic tests in determining status of coyotes, Québec, Canada.

Variables	Test Specificity	Test Sensitivity				
		1.00	0.99	0.90	0.80	0.60
Age	1.00	3.24	3.24	3.25	3.27	3.34
	0.99	5.34	5.34	5.37	5.4	5.51
High level habitat suitability	1.00	7.47	7.55	7.53	7.60	7.83
	0.99	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

9. Figures

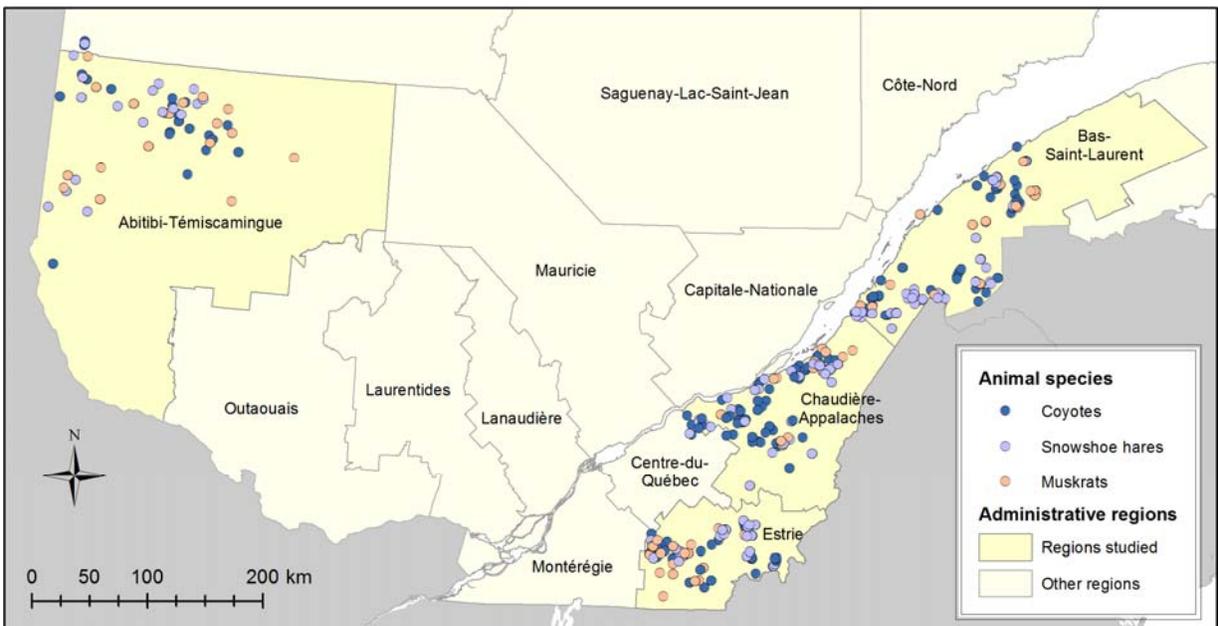


Figure 3. Distribution of coyotes (*Canis latrans*), snowshoe hares (*Lepus americanus*) and muskrats (*Ondatra zibethicus*), collected from October 2012 to April 2013 by trappers from four regions of Québec, Canada (Lambert conic conform projection).

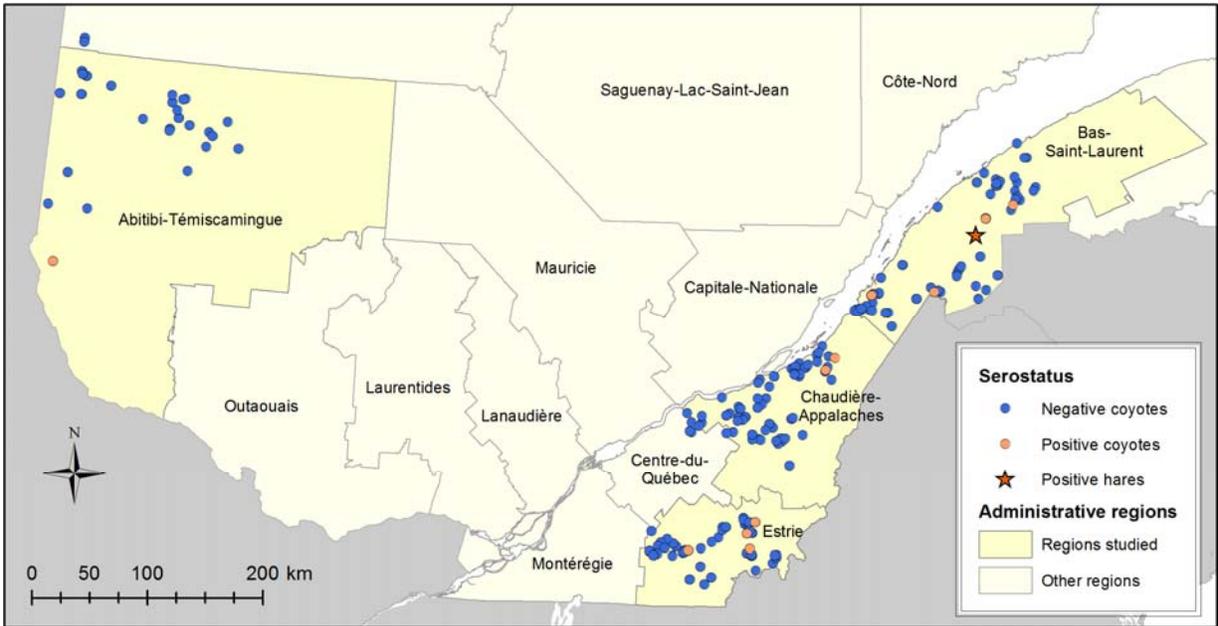


Figure 4. Distribution of seropositive (*F. tularensis* antibody titers $\geq 1:64$) and seronegative ($<1:64$) coyotes from four regions in Québec, Canada. The red star indicates the location of collection of two seropositive hares (Lambert conic conform projection).

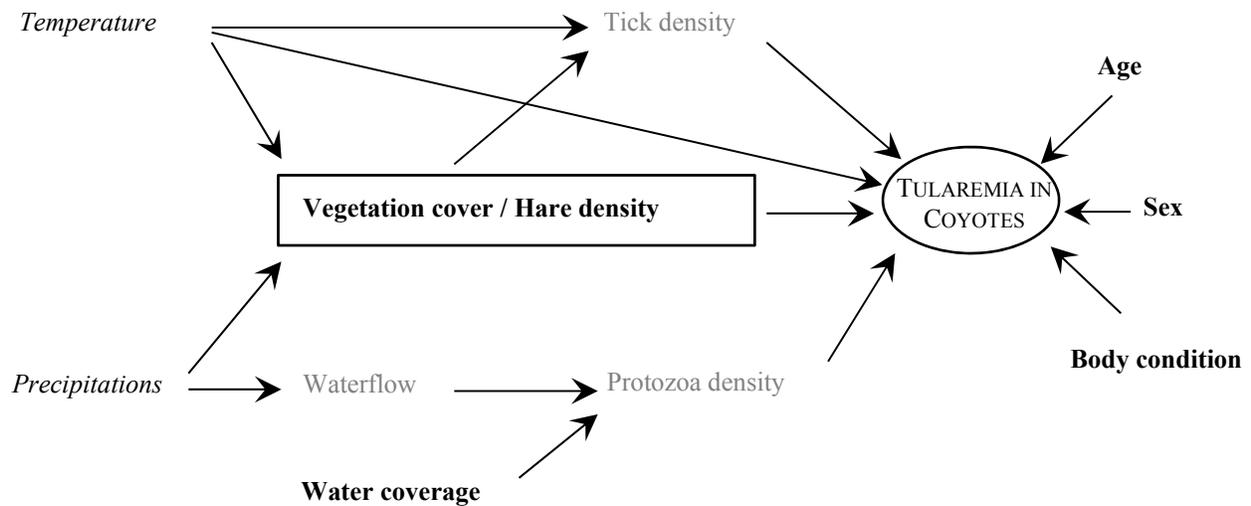


Figure 5. A proposed causal diagram of variables associated with infection of *F. tularensis* in coyotes (*Canis latrans*).

Directional arrows between two variables correspond to the assumed causal effect of one on another. Measured variables in our study are shown in bold in the diagram whereas the outcome, that is the status of infection of coyotes, is circled. Text in light gray represents unmeasured variables. Potential confounders (temperature and precipitation), which are exposures of equal interest, are presented in italics. Environmental characteristics found around the coyote are displayed on the left whereas individual characteristics of coyotes are presented on the right. Habitat suitability model (HSM) for snowshoe hare (*Lepus americanus*) in Québec was used as a proxy for hare density. As suitability for hare is determined by vegetation cover, two different logistic regression models were developed to estimate the total effects of both variables on the outcome.

Discussion

Notre étude visait à estimer la séroprévalence et la prévalence d'infection à *F. tularensis* chez le coyote, le lièvre d'Amérique et le rat musqué dans quatre régions administratives du Québec, d'identifier certains facteurs de risque potentiels associés à cette infection et de décrire la distribution spatiale des individus positifs. Ce projet revêt une importance particulière dans la compréhension de l'écologie de la tularémie au Québec puisqu'aucune étude avec une taille d'échantillon si grande n'a été réalisée chez le lièvre d'Amérique et le rat musqué, deux espèces possiblement centrales dans la transmission de la bactérie au sein de la faune québécoise. De plus, l'identification de facteurs de risque à l'aide de données géospatiales et l'utilisation d'analyses spatiales permettent d'apporter de nouvelles informations qui n'ont jamais été préalablement étudiées au Québec et très peu à l'échelle internationale. Ultiment, ces informations peuvent également approfondir nos connaissances sur le cycle écologique de *F. tularensis*, qui demeure très peu connu, afin d'identifier des pistes pertinentes pour les recherches futures et d'orienter les efforts de contrôle et de prévention de la tularémie. Cette discussion a pour but d'analyser les principaux résultats de notre étude en relation avec les données de la littérature, d'exposer les limites de l'étude et de suggérer des recherches futures potentiellement intéressantes à explorer.

1. Séroprévalences et prévalences

1.1 Lièvre d'Amérique

Une séroprévalence de 0.6% a été détectée chez les lièvres d'Amérique lors de notre étude, ce qui est en accord avec plusieurs études précédentes. Effectivement, des séroprévalences très faibles, variant entre 0 et 1.55%, ont été rapportées au Canada entre 1961 et 1979 (Hoff et al., 1970; Zarnke et Yuill, 1981; Akerman et Embil, 1982). D'ailleurs, lors d'une étude réalisée également au Québec en 1992, la présence d'anticorps n'a pas été détectée chez 41 lièvres d'Amérique testés (Cayouette, 1993). En contrepartie, des séroprévalences plus élevées ont

occasionnellement été rapportées, notamment en Ontario (Mac Lulich, 1937; Ditchfield et al., 1960).

Lors de cette étude, tous les pools des organes de lièvres d'Amérique étaient négatifs à la PCR ($n = 345$). En revanche, l'ADN à *F. tularensis* type A1 a été détecté dans la rate d'un lièvre séropositif et le poumon du deuxième lièvre séropositif. À notre connaissance, ceci représente la première étude explorant la prévalence d'infection à *F. tularensis* chez des lièvres d'Amérique dans une zone endémique. Une étude rapporte toutefois l'isolement de *F. tularensis* chez un lièvre d'Amérique en Alaska parmi 24 individus testés, quoique cette investigation a été réalisée suite à une éclosion caractérisée par une mortalité importante au sein d'une population de lièvres (Miller, 1974).

La sensibilité du lièvre d'Amérique au développement de la tularémie n'est pas bien comprise. Selon l'opinion générale, basée entre autres sur de nombreuses années d'investigations, le lièvre d'Amérique, contrairement au lapin à queue blanche, serait un animal plutôt résistant à la tularémie et les infections mortelles ne seraient qu'occasionnelles (Mac Lulich, 1937; Green, 1938; Bell et Green, 1939; Green, 1939; Rand, 1949; Akerman et Embil, 1982; Cayouette, 1993). En contrepartie, quelques rares observations rapportées dans la littérature contredisent cette idée, telle qu'une forte mortalité observée suite à des éclosions chez des lièvres d'Amérique (Jellison et al., 1961; Miller, 1974), la détection de *F. tularensis* chez un lièvre d'Amérique mort et des tiques collectées sur des lièvres morts ou moribonds (Parker et al., 1931; Philip et al., 1954) ainsi que le développement d'une infection sévère et mortelle chez des lièvres d'Amérique inoculés expérimentalement (Spencer et Francis, 1924; Miller, 1974). Dans la présente étude, la détection de l'ADN du type A1 de *F. tularensis* dans les organes des deux lièvres séropositifs suggère que cette espèce animale peut développer des anticorps et survivre à l'infection, même lorsque celle-ci est causée par la souche la plus virulente de la bactérie. Or, nous n'avons aucune information sur l'état de santé de ces animaux et ne pouvons donc pas exclure la possibilité que ces individus étaient réellement malades.

Les très faibles séroprévalences observées dans les études précédentes ainsi que la nôtre peuvent découler d'une forte mortalité suite à l'infection par *F. tularensis* et/ou d'une faible exposition à la bactérie. Nos résultats suggèrent que le lièvre ne serait pas un animal très sensible ou encore que certains individus dans une population peuvent survivre occasionnellement à l'infection. En considérant les données disponibles dans la littérature qui supportent l'idée du lièvre d'Amérique modérément résistant, l'hypothèse d'une forte mortalité pour expliquer nos résultats ne peut pas être rejetée, mais semble tout de même moins probable. En contrepartie, une faible exposition chez la population de lièvres pourrait découler, entre autres, d'une faible circulation de la bactérie dans l'environnement au moment de l'étude et une certaine période précédant l'étude qui correspond à la durée de la persistance des anticorps. Or, aucune étude n'a été retrouvée dans la littérature permettant d'estimer le délai requis pour que les anticorps deviennent non-déTECTABLES chez le lièvre d'Amérique.

Chez les deux lièvres positifs de notre étude, la souche identifiée possédait un profil génétique (MLVA) très similaire à celui de tous les isolats de lièvres de la collection du Laboratoire national de microbiologie à Winnipeg, Manitoba, Canada. Il s'agit donc d'une accumulation de preuves qui suggère que l'infection chez cette espèce animale semble principalement causée par le type AI au Canada. De plus, la faible diversité génétique entre les isolats suggère que la transmission de la bactérie n'est pas très active au sein de la population et qu'il ne semble pas y avoir eu d'introduction de nouvelles souches de *F. tularensis* dans cette population animale.

1.2 Rats musqués

Les résultats des tests PCR et de microagglutination étaient négatifs pour tous les rats musqués trappés de notre étude. Cette absence de détection de l'infection est en accord avec deux études précédentes réalisées dans des régions endémiques n'ayant trouvé aucun rat musqué positif, soit d'après le test d'agglutination en Saskatchewan ($n =$ non spécifié) (Dr FA Leighton, communication personnelle, 2014) ou selon la PCR et la culture bactérienne en Allemagne ($n = 2304$) (von Keyserlingk et al., 2011). En revanche, une étude rapporte une prévalence de 5% (4/78) par culture bactérienne et 41% (5/12) par tests d'agglutination chez

des rats musqués trappés au Vermont (Young et al., 1969). Par contre, cette investigation a été réalisée suivant une éclosion massive de tularémie impliquant 47 trappeurs de rats musqués.

Selon plusieurs auteurs, les rats musqués sont très sensibles à la tularémie et l'infection progresse rapidement vers une issue fatale (Parker et al., 1951; Jellison et al., 1961; Bell et Stewart, 1983; Perron, 1984; World Health Organization, 2007). D'ailleurs, les populations de rats musqués affectés par la tularémie subissent fréquemment des mortalités massives (McDermid, 1946; Jellison et al., 1951; Parker et al., 1951) et, dans la littérature, la majorité des rats musqués positifs aux tests diagnostiques étaient retrouvés morts ou trappés suivant une éclosion de tularémie (Jellison et al., 1942; McDermid, 1946; Jellison et al., 1951; Parker et al., 1951; Labzoffsky et Sprent, 1952; Banfield, 1954; Fyvie et al., 1959; Ditchfield et al., 1960; Young et al., 1969).

L'absence de détection de l'infection chez les rats musqués de notre étude est en accord avec l'hypothèse que cette espèce animale, lorsqu'exposée à la bactérie, survit rarement à l'infection. Par contre, un taux d'exposition quasi nul à la bactérie dans la population de rats musqués pourrait également expliquer cette absence de résultats positifs. Il est ainsi possible que, durant et une certaine période précédant l'étude, *F. tularensis* n'était pas impliqué dans un cycle aquatique au sein des régions étudiées. Tout comme pour le lièvre d'Amérique, la durée de la persistance des anticorps chez le rat musqué n'a pas été trouvée dans la littérature.

À partir des résultats de notre étude et de la multitude d'observations dans la littérature qui suggèrent que le rat musqué serait très sensible à la tularémie, l'hypothèse que cet animal constitue un réservoir naturel de *F. tularensis* semble peu réaliste.

1.3 Coyote

Des anticorps dirigés contre *F. tularensis* ont été détectés chez 2.9% des coyotes trappés lors de notre étude. D'autres études réalisées aux États-Unis ont rapporté des séroprévalences chez des coyotes qui varient entre 0 et 32% (Thorpe et al., 1965; Trainer et Knowlton, 1968; Gese et al., 1997; Arjo et al., 2003; Gese et al., 2004; Bischof et Rogers, 2005; Chronert, 2007)

alors qu'une séroprévalence très élevée de 88% a été rapporté à Idaho aux États-Unis (Gier et al., 1978).

Dans la présente étude, l'ADN à *F. tularensis* n'a pas été détectée dans les reins des 92 coyotes testés, incluant les coyotes séropositifs. À notre connaissance, il s'agit de la première étude ayant évalué la présence de l'infection à *F. tularensis* chez des coyotes sauvages.

Il est généralement assumé que le coyote, plutôt résistant à la tularémie, ne joue pas un rôle significatif dans le cycle écologique de *F. tularensis* (Gier et Ameel, 1959; Gese et al., 1997; Gese et al., 2004). Quelques études expérimentales suggèrent que les coyotes adultes, contrairement aux coyotes de très bas âge, se rétablissent rapidement suite à l'infection et ne participent pas à la dissémination de la bactérie dans l'environnement (Parker et Francis, 1926; Stagg et al., 1956; Lundgren et al., 1957; Marchette, 1960). L'absence de démonstration d'une infection active chez les coyotes séropositifs de notre étude supporte cette hypothèse. Par contre, il est également possible que la bactérie n'ait pas de tropisme pour le tissu rénal du coyote et qu'une infection active ait été réellement présente dans d'autres organes, mais non détectée.

Au cours de cette étude, cinq coyotes séropositifs provenant de trois régions administratives se trouvaient dans la catégorie « juvéniles » (<1 an) et six coyotes séropositifs dans la catégorie « subadultes » (1-2 ans), alors que tous les coyotes « adultes » (>2 ans) étaient séronégatifs. Puisque les juvéniles ont été exposés à un certain moment à l'intérieur de leur première année d'âge et puisque la période d'étude s'étend de 2012 à 2013, nous pouvons affirmer que l'infection a bel et bien circulé au sein de trois régions administratives dans l'environnement entre 2011 et 2013. En revanche, nous ne pouvons rien déduire concernant la circulation de la bactérie il y a plusieurs années. Il est possible que les coyotes adultes aient été exposés à la bactérie il y a longtemps, mais que les anticorps ne fussent plus détectables au moment de l'étude. Les données actuelles de la littérature ne nous permettent pas d'identifier avec précision et certitude la durée de la persistance des anticorps chez le coyote. Or, une étude expérimentale rapporte la détection des anticorps jusqu'à 78 jours chez un coyote (Titre 1:20) suite à l'exposition à *F. tularensis* et 11 à 13 semaines chez deux coyotes (Titre 1:20 et 1:40)

lors d'une deuxième étude expérimentale (Lundgren et al., 1957; Marchette, 1960). Les titres d'anticorps maximaux observés étaient de 1:640 pour la première étude (test d'agglutination non-spécifié) et 1:80 pour la deuxième étude (test d'agglutination en tube).

1.4 Variation des prévalences et séroprévalences entre les études

La variation des séroprévalences retrouvée dans la littérature, principalement chez le lièvre d'Amérique et le coyote, peut être attribuée à plusieurs facteurs. La comparaison entre les diverses études sérologiques est difficile compte tenu de l'utilisation de tests sérologiques distincts (soit l'agglutination en tube et la microagglutination) ainsi que l'application de différents seuils de titre d'anticorps pour déterminer la séropositivité. De plus, ces résultats divergents peuvent être le reflet d'une variation spatiale ou temporelle d'exposition à la bactérie. La tularémie est reconnue comme étant une maladie qui sévit sous forme d'éclosions sporadiques au sein de foyers naturels bien définis (Eliasson et al., 2006). Ainsi, une étude réalisée dans une zone récemment affectée par une éclosion de tularémie possède une chance plus élevée de détecter des animaux séropositifs ou infectés. De plus, la densité de population de lièvres d'Amérique subit des fluctuations de grande amplitude tous les 10 ans (Krebs, 1996). Quoique jamais démontré, il a été suggéré à plusieurs reprises qu'une forte infestation des tiques sur les lièvres, retrouvée lors du pic du cycle d'abondance du lièvre, pourrait engendrer une amplification dans le risque de transmission de l'infection (Green et Shillinger, 1932, 1935; Jellison et al., 1961; Rausch, 1972). Par extension, puisque le lièvre fait partie de l'alimentation du coyote, l'exposition à la bactérie de ce dernier pourrait également varier temporellement. Cette hypothèse a été préalablement proposée en ce qui concerne la séropositivité du loup pour la tularémie (Zarnke et al., 2004). Une étude démontre d'ailleurs une variation significative de la séropositivité des coyotes entre trois années d'étude successives dans une même région (Gese et al., 1997).

2. Modèles de régression logistique exacte

2.1 Caractéristiques individuelles

Selon nos deux modèles finaux de régression logistique exacte, les sub-adultes semblent être plus à risque d'être séropositifs comparativement aux juvéniles, ce qui est en désaccord avec d'autres études n'ayant pas détecté d'association entre la séropositivité des coyotes et l'âge ($P \geq 0.67$) (Gese et al., 1997; Arjo et al., 2003; Gese et al., 2004). Cette dissemblance peut être le résultat, entre autres, d'une catégorisation différente de l'âge.

Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer le risque accru de séropositivité chez les coyotes subadultes comparativement aux juvéniles observé lors de cette étude. Premièrement, les résultats d'études expérimentales suggèrent que les très jeunes coyotes, comparativement aux adultes, semblent plutôt sensibles à la tularémie et que leur exposition à la bactérie peut occasionnellement entraîner une infection létale (Parker et Francis, 1926; Marchette, 1960). Ainsi, comparativement aux autres catégories d'âge, les juvéniles comprendraient un plus faible nombre de survivants avec anticorps. Deuxièmement, l'exposition à la bactérie est possiblement plus fréquente chez les coyotes subadultes comparativement aux juvéniles. En effet, les coyotes juvéniles sont nourris par les parents alors que les coyotes subadultes, étant pour la plupart des chasseurs inexpérimentés qui ont récemment quitté leurs parents, ont une chance accrue d'ingérer des animaux trouvés morts ou moribonds suite à une infection par *F. tularensis*.

Les autres caractéristiques individuelles étudiées dans notre projet, soit le sexe et l'état de chair, n'étaient pas statistiquement significatives. De la même manière, une autre étude ne trouve aucune association entre la séropositivité des coyotes et le sexe (Gese et al., 2004). Le fait que l'état de chair n'était pas associé à la séropositivité suggère que l'infection n'a pas d'impact majeur sur la santé du coyote, ce qui est en accord avec l'hypothèse que le coyote soit résistant. Ces résultats peuvent également indiquer que le risque d'être exposé à la

bactérie n'est pas plus élevé chez les coyotes 'dominants' avec un bon état de chair et ayant accès à une grande variété de proies.

2.2 Caractéristiques environnementales

Selon les modèles « I » de régression logistique, les coyotes vivant dans un environnement avec une forte densité de forêt (> 71.5%) sont plus à risque d'être séropositifs comparativement à des coyotes vivant dans un environnement avec < 35.7% de forêt. Ces résultats suggèrent que les caractéristiques écologiques retrouvées dans un milieu forestier favorisent la circulation de la bactérie dans la nature. Ainsi, par extension, il est possible que la forêt abrite des espèces animales qui jouent un rôle important dans le cycle écologique de la tularémie, telles que des petits mammifères, des lagomorphes ou les tiques, favorisant ainsi le risque d'exposition du coyote à la bactérie. Par ailleurs, les zones boisées représentent un habitat optimal pour certaines espèces de tiques au Canada qui sont reconnues pour être des vecteurs de la tularémie, notamment *Dermacentor variabilis* (Bishopp et Trembley, 1945; Hopla, 1974). Quelques études ont également démontré des associations entre la présence de milieux boisés appropriés pour la tique et le risque de tularémie chez l'homme, notamment au Sud des États-Unis (Eisen et al., 2008), en Azerbaïdjan (Clark et al., 2012) et en Suède (Desvars et al., 2015). En revanche, la tularémie humaine était également associée à des caractéristiques environnementales aquatiques, soit dans la République Tchèque (Pikula et al., 2003) et en Suède (Palo et al., 2005; Desvars et al., 2015). Or, de tels résultats étaient à prévoir dans ces pays, puisque seul le type B, principalement associé au cycle aquatique, existe en Europe.

Selon les modèles « II », un coyote qui vit dans un milieu avec une forte proportion de l'environnement (> 10.8%) caractérisée par un habitat de qualité élevée pour le lièvre court un plus grand risque d'être séropositif. Ceci suggère que le lièvre d'Amérique participe de façon importante à la contamination du coyote, probablement en raison de la relation proie-prédateur. D'ailleurs, le coyote capturé le plus près des deux lièvres infectés, soit à 16 km de distance, était séropositif, ce qui est en accord avec l'hypothèse d'une transmission de la bactérie du lièvre au coyote. Il est également possible que les résultats de ce modèle reflètent

l'importance du rôle joué par le lièvre d'Amérique dans le cycle écologique de la tularémie, tel qu'un rôle de réservoir naturel. D'ailleurs, une étude détecte une corrélation entre le nombre de cas de tularémie humaine et la densité de population du lièvre d'Europe (*Lepus europaeus*) en République Tchèque. Ces résultats peuvent suggérer que la densité de lièvre influence d'une certaine manière la propagation de la tularémie, quoiqu'il est difficile d'évaluer la circulation de la bactérie dans l'environnement à partir de données humaines (Pikula et al., 2004). En revanche, une deuxième étude démontre une corrélation négative entre la tularémie humaine et la densité du lièvre variable (*Lepus timidus*) en Suède, ce qui pourrait résulter d'une mortalité élevée chez cette espèce de lièvre lorsqu'elle est infectée (Palo et al., 2005). L'inconsistance de ces résultats reflète les différences relativement à la sensibilité des espèces de lièvre ainsi que leur rôle spécifique dans le cycle écologique de la tularémie.

Il est connu que la tique adulte du lièvre, un important vecteur de *F. tularensis*, est extrêmement spécifique aux lièvres et lapins (Bishopp et Trembley, 1945; Jellison et al., 1961; Miller, 1974; Camin et Drenner, 1978). Selon une étude réalisée au Québec en 1992, tous les lièvres d'Amérique examinés étaient sévèrement et exclusivement infestés par la tique du lièvre. Ainsi, cette forte infestation suggère que le potentiel de transmission de l'infection entre ces deux espèces est extrêmement élevé (Cayouette, 1993). De plus, compte tenu du lien intime entre la tique et le lièvre, la distribution de la tique du lièvre doit être très similaire à la distribution du lièvre d'Amérique. De ce fait, à partir des résultats des modèles « II », le rôle possiblement important attribué au lièvre dans le cycle écologique de *F. tularensis* peut aussi être le reflet d'une implication par la tique du lièvre. Tel que précédemment proposé par différents auteurs, le réservoir naturel de *F. tularensis* est possiblement formé par un complexe pluri-hôtes, tels que la tique et son hôte mammifère (Hopla, 1974; Cayouette, 1993). Considérant nos résultats et puisque le lièvre d'Amérique semble être un animal modérément résistant, nous pouvons émettre l'hypothèse que le lièvre d'Amérique en association avec la tique du lièvre constitue ensemble un réservoir potentiel de *F. tularensis* dans le cycle terrestre de la tularémie au Québec.

La température a été retenue comme un facteur confondant potentiel dans le modèle « II » avec un rayon de 4 km. La température a donc possiblement un effet sur la survie de la

bactérie dans l'environnement de même qu'un effet sur le couvert végétal et, indirectement, sur la qualité de l'habitat pour le lièvre. Aucune donnée concernant les facteurs confondants potentiels dans le risque d'infection par *F. tularensis* n'a été trouvée dans la littérature.

2.3 Différents rayons

Les performances des modèles « I » et « II » étaient très similaires pour les trois rayons utilisés, ne permettant pas de les discriminer d'après les critères de performance utilisés. Ces résultats peuvent indiquer que, dans notre échantillon, la densité de forêt et le potentiel pour l'habitat du lièvre variaient peu entre les différents rayons autour des coyotes, tel qu'observé dans le tableau I de l'article, ou qu'aucune différence biologique relativement à l'effet de la forêt et l'habitat du lièvre n'est notable à ces trois échelles.

3. Analyses spatiales

Tel que démontré dans les résultats de séroprévalence chez les coyotes, l'infection a circulé à travers les quatre régions étudiées. Aucun agrégat statistiquement significatif n'a été démontré chez les coyotes séropositifs, ce qui suggère que l'infection n'est pas comprise dans des zones bien définies à travers l'aire géographique étudiée. Ces résultats sont en contradiction avec l'opinion générale que la tularémie persiste dans des foyers naturels possédant des conditions environnementales spécifiques qui favorisent la réplication et la transmission du pathogène (Pavlovsky et al., 1966). Cette théorie est supportée par plusieurs études réalisées dans différents pays, ayant détecté des agrégats de *F. tularensis*, notamment en Suède et à Martha's Vineyard aux États-Unis (Goethert et Telford III, 2009; Svensson et al., 2009). Néanmoins, la faible puissance statistique découlant du faible nombre de coyotes séropositifs dans notre étude peut avoir diminué notre chance de détecter des foyers d'infection. De plus, il est possible que les 385 coyotes aient été distribués sur un territoire trop grand pour détecter les agrégats présents à une petite échelle géographique. Ainsi, chaque coyote séropositif pourrait représenter un foyer d'infection qui aurait été détecté si le nombre de coyotes échantillonnés par kilomètre carré avait été plus élevé. De plus, puisque le coyote possède un grand domaine vital, la position géographique de la capture du coyote n'est possiblement pas représentative de l'endroit où ce dernier a acquis l'infection ce qui peut avoir entraîné une certaine imprécision dans les données. Finalement, puisque la tularémie est reconnue pour la variation temporelle de ses éclosions, entrecoupées par de longues périodes sans aucune évidence de cas, l'absence de foyers d'infection lors de cette étude ne nous permet pas de rejeter la possibilité que des agrégats fussent présents sur le territoire québécois il y a plusieurs années dans le passé.

4. Limites de l'étude

Cette étude étant de type transversal, elle comporte certaines limites propres à ce devis d'étude. Effectivement, par une étude transversale, nous ne pouvons pas déterminer si les facteurs de risque détectés lors des analyses, c'est-à-dire l'âge, la forêt et la densité de lièvre, sont réellement des facteurs associés à un risque d'infection ou plutôt des facteurs associés à la survie des animaux ayant été infectés. De plus, ce devis d'étude fournit uniquement une image de la situation au moment de l'étude (ainsi qu'une certaine période précédant l'étude, qui correspond à la persistance des anticorps). Aucune information n'est donc obtenue sur la temporalité entre l'exposition au facteur de risque et la survenue de l'infection ce qui est un critère important pour supporter la causalité de l'association. Toutefois, puisque les facteurs d'exposition sont presque tous invariables dans le temps (sexe, type d'environnement), cette particularité n'a pas réellement d'impact pour l'interprétation de nos résultats.

En étudiant les résultats présentés dans les tableaux IV et V de l'article, on note la présence d'un gradient biologique pour les variables 'Forêt' et 'Habitat du lièvre', c'est-à-dire que plus la densité de l'environnement est élevée, plus le risque de séropositivité est élevé. Toutefois, une telle relation dose-effet n'est pas observée pour la variable 'Habitat du lièvre' dans le modèle utilisant le rayon de 4 km (Tableau V de l'article). Dans ce cas, les résultats les moins significatifs avec des forces d'association moindres sont obtenus lors de la comparaison des deux catégories extrêmes, c'est-à-dire la catégorie de densité supérieure avec la catégorie inférieure. Or, chacune de ces deux catégories comprend seulement 25% de l'échantillon comparativement à 50% pour la catégorie moyenne. Ainsi, en raison du faible nombre d'individus contenus dans les groupes extrêmes, il est probablement plus difficile d'en faire ressortir une association significative.

Un échantillonnage stratifié par région était premièrement effectué, afin d'assurer une taille d'échantillon suffisamment grande pour chaque strate d'intérêt. À l'intérieur de ces régions, la collecte de carcasses était effectuée par les trappeurs, sur une base volontaire. Puisque les objectifs de capture pour chaque trappeur étaient difficiles à atteindre, le nombre de carcasses collectées correspondait bien souvent à l'ensemble des animaux capturés par le trappeur

durant sa saison de trappe. Un échantillonnage d'accommodement a ensuite été utilisé, ce qui peut avoir introduit un biais de sélection. L'obtention d'un échantillon non représentatif de la population source peut alors en découler. Par contre, puisque nous n'avons aucune influence quant au choix des animaux trappés à l'intérieur des territoires couverts par chaque trappeur, nous pensons que l'échantillon sélectionné était tout même représentatif. La grande taille d'échantillon obtenue lors de ce projet favorise la puissance statistique. Cette dernière est toutefois limitée par le faible nombre de coyotes positifs. Une répartition spatiale qui couvrirait la totalité de chaque région était visée quoique très difficile à obtenir. Ainsi, il est possible que les trappeurs participants trappent uniquement dans des zones non-endémiques ou au contraire, au sein de foyers d'infection. Dans ces deux cas, il y aura sous-estimation et surestimation de la prévalence, respectivement.

Seuls des animaux trappés étaient inclus dans l'étude, alors que les animaux trouvés morts n'étaient pas collectés pour limiter les risques d'exposition à la bactérie chez les trappeurs. Puisque la prévalence est vraisemblablement plus élevée chez les animaux trouvés morts comparativement aux animaux trappés pour les espèces potentiellement sensibles, tel que le rat musqué, un biais de sélection a possiblement été introduit dans notre étude causant une sous-estimation de la prévalence dans la population animale. Ainsi, ce biais représente une explication possible pour les prévalences faibles détectées dans cette étude, et ce particulièrement chez les rats musqués.

Les conditions de l'étude ont pu faire en sorte que la sensibilité des tests s'en trouve réduite par rapport à des conditions optimales. Dans un premier temps, puisque les échantillons étaient prélevés d'animaux morts depuis un certain temps, ceux-ci n'étaient pas toujours d'une qualité optimale. Effectivement, le sang collecté était occasionnellement dilué avec des fluides corporels et les organes parfois décomposés. Deuxièmement, la PCR était réalisée sur un échantillon composite de la rate, du rein, du poumon et du foie plutôt qu'à partir de chaque organe individuel. Ce choix était justifié par des contraintes budgétaires et par l'incapacité d'identifier un organe particulier qui était systématiquement et sévèrement contaminé lors de l'infection selon les données dans la littérature. Or, cette approche peut avoir diminué la probabilité de détecter l'ADN de *F. tularensis*. Par exemple, si de ces quatre organes, un seul

était contaminé, un résultat faussement négatif aurait pu en découler. Ce scénario est probable considérant les résultats négatifs à la PCR obtenus sur le pool d'organes chez deux lièvres séropositifs, en contraste avec des résultats positifs à la PCR obtenus sur la rate ou le poumon de ces mêmes animaux. Par contre, les organes individuels de 30 autres lièvres localisés à proximité de ces deux individus étaient négatifs à la PCR, en accord avec le test sur l'échantillon composite des organes, suggérant une certaine robustesse des résultats relativement à notre choix méthodologique. La mauvaise classification de l'issue due à une faible sensibilité des tests de microagglutination et de la PCR peut avoir introduit un biais d'information dans notre étude. Dans un premier temps, une sous-estimation de la prévalence et de la séroprévalence est à considérer. Deuxièmement, les associations estimées dans les modèles de régression logistique peuvent avoir été affectées par ce biais. Le biais d'information est toutefois fort probablement non-différentiel, puisque nous n'avons aucun argument permettant de supporter l'hypothèse que la sensibilité du test soit variable selon le statut d'exposition aux facteurs de risque considérés. Ainsi, ce biais tend à sous-estimer les forces d'association et donc l'effet des facteurs de risque dans les modèles statistiques, ce qui représente un scénario conservateur. Effectivement, les analyses de sensibilités effectuées pour la mauvaise classification de l'issue ont démontré que la réduction de la sensibilité de 100% à 60% pour les variables significatives du modèle « II » entraînait une sous-estimation de faible importance des rapports de cotes, soit un changement de seulement 3% à 5%.

Le choix du seuil d'anticorps utilisé pour définir un animal séropositif posait un défi particulier, puisqu'aucun seuil d'anticorps pour les tests de microagglutination n'a été validé chez les animaux sauvages. Chez les humains, un seuil d'anticorps $\geq 1:128$ est recommandé pour le diagnostic sérologique d'une infection active (Dennis et al., 2001; World Health Organization, 2007). Toutefois, pour cette étude, notre intérêt premier était d'évaluer l'exposition des animaux à la bactérie et ce, à n'importe quel moment dans le passé. Ainsi, un seuil plus faible a été choisi, soit $\geq 1:64$, afin de pouvoir considérer à la fois les infections passées et actives. Ce choix semble a posteriori approprié, puisque l'ADN de la bactérie a été détecté par PCR chez un lièvre d'Amérique démontrant un titre d'anticorps de 1:64. De plus, le fait qu'aucune réaction croisée entre les anticorps de *F. tularensis* et *Brucella* n'a été

détectée chez tous les coyotes séropositifs rehausse davantage notre confiance quant à la validité des résultats positifs obtenus aux tests d'agglutination.

Finalement, cette étude était essentiellement de nature exploratoire, puisqu'aucune étude de ce genre n'a été réalisée préalablement au Québec, ce qui justifie le choix d'une valeur alpha libérale de 0.15 lors des analyses statistiques. Les associations trouvées significatives lors de cette étude doivent donc être considérées avec précaution, étant tout d'abord préliminaires, et devront être validées par des études futures.

5. Récapitulation des résultats trouvés

Les résultats de cette étude, tant pour la prévalence d'infection que pour les facteurs de risque décelés à partir des modèles de régression logistique, pointent collectivement vers l'hypothèse que le cycle terrestre de *F. tularensis* est présent dans les régions géographiques étudiées. Effectivement, la détection de coyotes positifs et de lièvres d'Amérique positifs, l'identification du type AI chez les deux lièvres d'Amérique ainsi que le risque accru de séropositivité décelé chez les coyotes vivant dans un environnement avec une forte densité de forêt ou un potentiel élevé pour l'habitat du lièvre sont tous des éléments pouvant être associés au cycle terrestre. En revanche, l'absence de détection de l'infection chez les rats musqués ainsi que l'obtention de modèles statistiques ne comprenant aucune variable reliée à l'eau, telle que les rives d'eau, les milieux humides et les précipitations, peuvent suggérer que le cycle aquatique est de moindre importance dans les régions étudiées au moment de l'étude.

D'après une étude rétrospective réalisée sur des cas provenant du Québec de 1998 à 2011, 78% des isolats humains et 100% des isolats de lièvres d'Amérique étaient causés par le type AI, ce qui est en accord avec les résultats trouvés dans notre étude (Antonation et al., 2014). Le lièvre d'Amérique semble donc être principalement infecté par le type AI de *F. tularensis*, du moins sur le territoire québécois. La proportion élevée de cas humains associés au type AI comparativement au type B pourrait par contre découler d'une sévérité plus importante des signes cliniques chez les patients infectés par le type AI et, en conséquence, d'une recherche accrue du pathogène en cause par le médecin. Cette étude rétrospective a également détecté le type B chez 22% des isolats humains, dont la moitié de ces cas étaient localisés près du fleuve Saint-Laurent, reconnu comme un endroit détenant une forte densité de rats musqués. Ainsi, malgré que notre étude n'ait pu le démontrer, l'existence possible du cycle aquatique au Québec ne peut être infirmée. En effet, l'absence de détection de l'infection chez le rat musqué peut également découler d'une sensibilité élevée propre à cette espèce ainsi que la présence de foyers endémiques restreints et temporaires. De plus, si le coyote se nourrit fréquemment d'animaux impliqués dans le cycle terrestre, tel que le lièvre d'Amérique, et chasse rarement des animaux semi-aquatiques, tels que le rat musqué et le castor, les facteurs

de risque trouvés dans les modèles de régression logistique seront alors un reflet du cycle terrestre plutôt que le cycle aquatique.

Nos résultats sont donc cohérents avec les connaissances actuelles sur le cycle écologique terrestre de la tularémie, ce qui supporte la causalité des associations observées. Par contre, d'autres études devront être réalisées au Québec afin d'évaluer davantage la constance de ces résultats.

Finalement, tel qu'attendu, les résultats de notre étude suggèrent que le lièvre d'Amérique joue un rôle important dans le cycle écologique terrestre de *F. tularensis* au Québec.

6. Orientations futures

Les connaissances actuelles quant à la tularémie correspondent à un amalgame complexe d'informations, provenant de différentes régions, différentes espèces animales et différentes périodes, qui ne semblent pas s'accorder entre-elles de façon à obtenir un portrait cohérent et complet du cycle de transmission. Plusieurs incertitudes et lacunes importantes demeurent et limitent notre compréhension globale de la tularémie. Des recherches ciblant spécifiquement l'évaluation des réservoirs potentiels naturels associés aux différents cycles écologiques devraient être prioritaires afin de s'assurer de bien comprendre le fondement même de la transmission de la bactérie. Ainsi, des recherches approfondies sur le rôle des protozoaires semblent prometteurs, en ce qui a trait au cycle aquatique. De plus, la mise en place de recherches explorant le rôle de la tique en association avec le lièvre serait une piste intéressante à approfondir, particulièrement au Québec, et ce dans un milieu principalement boisé. Également, dans le cas d'une étude réalisée chez des animaux sauvages, un suivi temporel, sur plusieurs années, pourrait apporter des informations supplémentaires, telles que la variation saisonnière ou annuelles de l'infection et des facteurs de risque.

Les résultats de notre étude supportent l'opinion générale que les coyotes sont probablement des animaux résistants à *F. tularensis* et développent des anticorps une fois exposés à la bactérie. Ainsi, dans une perspective de santé publique, puisque cet animal est régulièrement trappé en grand volume à travers le Québec, la collection d'échantillons sanguins par les trappeurs chez le coyote sauvage pour la surveillance de la circulation de la bactérie dans l'environnement pourrait être une avenue intéressante à explorer.

Finalement, tel qu'observé lors d'études récentes (Wahab et al., 2014), l'emploi des outils diagnostiques moléculaires semble être une approche révolutionnaire et d'avenir à privilégier pour les recherches sur la tularémie. Effectivement, l'épidémiologie moléculaire permettra de caractériser la distribution spatio-temporelle des différentes souches, de retracer l'origine de la souche ou la source d'une éclosion, de reconstituer l'évolution de cette bactérie à travers l'histoire et de construire des banques de données qui pourront être analysées et comparées entre les différents pays ainsi que les espèces animales affectées. Ces analyses pourraient être

fort utiles pour approfondir nos connaissances quant à la distinction des différents cycles écologiques de cette bactérie particulièrement énigmatique, tant au niveau des hôtes réellement impliqués dans chaque cycle que leur répartition géographique à travers le monde.

Conclusion

Cette étude a permis d'élargir les connaissances actuelles quant au cycle écologique de *F. tularensis* au sein de la faune sauvage au Québec, et contribue ainsi à l'avancement de la compréhension de cette bactérie sur une échelle globale.

Dans un premier temps, les résultats de prévalence et de séroprévalence supportent les hypothèses que le coyote serait un animal résistant à la tularémie alors que le lièvre serait un animal modérément résistant. L'absence de détection de l'infection chez le rat musqué nous indique soit une sensibilité élevée chez cette espèce ou une absence d'exposition à la bactérie. Globalement, le rat musqué ne semble pas correspondre à un réservoir naturel de la bactérie dans le cycle écologique au Québec. Également, des caractéristiques environnementales favorisant possiblement la circulation de la bactérie ont été identifiées, telles qu'une forte proportion de forêt ainsi qu'un habitat optimal pour le lièvre d'Amérique. Et finalement, à la lumière de tous les résultats obtenus lors de cette étude, nous pouvons émettre l'hypothèse que le cycle écologique terrestre est présent dans les régions étudiées et que le lièvre d'Amérique y joue possiblement un rôle central dans la transmission de cette bactérie mystérieuse sur le territoire québécois.

Bibliographie

- Abd H, Johansson T, Golovliov I, Sandstrom G, Forsman M. 2003. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* 69(1):600-606.
- Abril C, Nimmervoll H, Pilo P, Brodard I, Korczak B, Markus S, Miserez R, Frey J. 2008. Rapid diagnosis and quantification of *Francisella tularensis* in organs of naturally infected common squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Vet Microbiol* 127(1-2):203-208.
- Agence de la santé publique du Canada. 2014. *Maladies à déclaration obligatoire en direct* <http://dsol-smed.phac-aspc.gc.ca/dsol-smed/ndis/index-eng.php>. Consulté le 17 octobre 2014.
- Aguirre AA, McLean RG, Cook RS, Quan TJ. 1992. Serologic survey for selected arboviruses and other potential pathogens in wildlife from Mexico. *J Wildl Dis* 28(3):435-442.
- Akalin H, Helvacı S, Gedikoğlu S. 2009. Re-emergence of tularemia in Turkey. *Int J Infect Dis* 13(5):547-551.
- Akerman MB, Embil JA. 1982. Antibodies to *Francisella tularensis* in the snowshoe hare (*Lepus americanus struthopus*) populations of Nova Scotia and Prince Edward Island and in the moose (*Alces alces americana Clinton*) population of Nova Scotia. *Can J Microbiol* 28(4):403-405.
- Antonation KS, Bekal S, Côté G, Dallaire A, Corbett CR. 2014. Multiple locus variable number tandem repeat analysis of *Francisella tularensis* from Québec, Canada. *Lett Appl Microbiol* Article accepté.
- Arjo WM, Gese EM, Bromley C, Kozlowski A, Williams ES. 2003. Serologic survey for diseases in free-ranging coyotes (*Canis latrans*) from two ecologically distinct areas of Utah. *J Wildl Dis* 39(2):449-455.
- Bandouchova H, Sedlackova J, Hubalek M, Pohanka M, Peckova L, Tremml F, Vitula F, Pikula J. 2009. Susceptibility of selected murine and microtine species to infection by a wild strain of *Francisella tularensis* subsp. *holoarctica*. *Vet Med* 54(2):64-74.
- Banfield AWF. 1954. Tularemia in beavers and muskrats, Waterton Lakes National Park, Alberta, 1952-53. *Can J Zool* 32:139-143.
- Barker JR, Kloze KE. 2007. Molecular and genetic basis of pathogenesis in *Francisella tularensis*. *Ann N Y Acad Sci* 1105(1):138-159.
- Bell J, Green R. 1939. Nonfatal infections with *Pasteurella tularensis* in the snowshoe hare [résumé]. *J Bacteriol* 38:114.
- Bell J, Stewart S. 1975. Chronic shedding tularemia nephritis in rodents: possible relation to occurrence of *Francisella tularensis* in lotic waters. *J Wildl Dis* 11(3):421-430.

- Bell J, Stewart S. 1983. Quantum differences in oral susceptibility of voles, *Microtus pennsylvanicus*, to virulent *Francisella tularensis* type B, in drinking water: implications to epidemiology. *Ecol Dis* 2(2):151.
- Bell JF. 1945. The infection of ticks (*Dermacentor variabilis*) with *Pasteurella tularensis*. *J Infect Dis* 76(2):83-95.
- Bell JF. 1979. Tularemia. Dans: *Bacterial, rickettsial and mycotic diseases*, H. Stoenner, W. Kaplan, AND M. Torten, (éditeurs). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 161-193.
- Berdal BP, Mehl R, Meidell NK, Lorentzen-Styr AM, Scheel O. 1996. Field investigations of tularemia in Norway. *FEMS Immunol Med Microbiol* 13(3):191-195.
- Berrada ZL, Goethert HK, Telford SR, III. 2006. Raccoons and skunks as sentinels for enzootic tularemia. *Emerg Infect Dis* 12(6):1019-1021.
- Bevanger L, Maeland JA, Kvan A. 1994. Comparative analysis of antibodies to *Francisella tularensis* antigens during the acute phase of tularemia and eight years later. *Clin Diagn Lab Immunol* 1(2):238-240.
- Biek R, Zarnke RL, Gillin C, Wild M, Squires JR, Poss M. 2002. Serologic survey for viral and bacterial infections in western populations of Canada lynx (*Lynx canadensis*). *J Wildl Dis* 38(4):840-845.
- Binninger CE, Beecham JJ, Thomas LA, Winward LD. 1980. A serologic survey for selected infectious diseases of black bears in Idaho. *J Wildl Dis* 16(3):423-430.
- Birdsell DN, Johansson A, Öhrman C, Kaufman E, Molins C, Pearson T, Gyuranecz M, Naumann A, Vogler AJ, Myrtenäs K. 2014. *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* Group AI, United States. *Emerg Infect Dis* 20(5):861-865.
- Bischof R, Rogers DG. 2005. Serologic survey of select infectious diseases in coyotes and raccoons in Nebraska. *J Wildl Dis* 41(4):787-791.
- Bishopp FC, Trembley HL. 1945. Distribution and hosts of certain North American ticks. *J Parasitol* 31(1):1-54.
- Black DM, Thomson J. 1958. Tularaemia in British Columbia. *Can Med Assoc J* 78(1):16.
- Boisset S, Caspar Y, Sutera V, Maurin M. 2014. New therapeutic approaches for treatment of tularaemia: a review. *Front Cell Infect Microbiol* 4(40):1-8.
- Bow MR, Brown JH. 1943. Tularaemia in the " Seven Persons Coulee ", Alberta. *Can J Public Health* 34:414-418.
- Broman T, Thelaus J, Andersson A-C, Bäckman S, Wikström P, Larsson E, Granberg M, Karlsson L, Bäck E, Eliasson H. 2010. Molecular detection of persistent *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* in natural waters. *Int J Microbiol* 2011.
- Broekhuijsen M, Larsson P, Johansson A, Byström M, Eriksson U, Larsson E, Prior RG, Sjöstedt A, Titball RW, Forsman M. 2003. Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *J Clin Microbiol* 41(7):2924-2931.

- Burgdorfer W, Varma G. 1967. Trans-stadial and transovarial development of disease agents in arthropods. *Annu Rev Entomol* 12(1):347-376.
- Camin JH, Drenner RW. 1978. Climbing behavior and host-finding of larval rabbit ticks (*Haemaphysalis leporispalustris*). *J Parasitol*:905-909.
- Campagna S, Levesque B, Anassour-Laouan-Sidi E, Cote S, Serhir B, Ward BJ, Libman MD, Drebot MA, Makowski K, Andonova M, Ndao M, Dewailly E. 2011. Seroprevalence of 10 zoonotic infections in 2 Canadian Cree communities. *Diagn Microbiol Infect Dis* 70(2):191-199.
- Cayouette S. 1993. *Étude éco-morphologique de la tique du lapin Haemaphysalis leporispalustris packard (acari: Ixodae) et de son potentiel comme vecteur de la tularémie chez le lièvre d'Amérique au Québec*. Maîtrise ès sciences, Sciences de l'environnement, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, 108 pp.
- Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. 2006. *Paramètres d'exposition chez les mammifères - Coyote*, Fiche descriptive. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 23 pp.
- Chomel BB, Kasten RW, Chappuis G, Soulier M, Kikuchi Y. 1998. Serological survey of selected canine viral pathogens and zoonoses in grizzly bears (*Ursus arctos horribilis*) and black bears (*Ursus americanus*) from Alaska. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot* 17(3):756-766.
- Chronert JM. 2007. *Ecology of the coyote (Canis latrans) at Wind Cave National Park*. Maîtrise ès sciences, Wildlife and Fisheries Sciences Department, South Dakota State University, South Dakota, 123 pp.
- Clark DV, Ismailov A, Seyidova E, Hajiyeva A, Bakhishova S, Hajiyev H, Nuriyev T, Piraliyev S, Bagirov S, Aslanova A. 2012. Seroprevalence of tularemia in rural Azerbaijan. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 12(7):558-563.
- Cross AS, Calia FM, Edelman R. 2007. From rabbits to humans: the contributions of Dr. Theodore E. Woodward to tularemia research. *Clin Infect Dis* 45(Supplement 1):S61-S67.
- Cunha B. 2002. Anthrax, tularemia, plague, ebola or smallpox as agents of bioterrorism: recognition in the emergency room. *Clinical microbiology and infection* 8(8):489-503.
- Dennis DT, Inglesby TV, Henderson DA, et al. 2001. Tularemia as a biological weapon: Medical and public health management. *JAMA* 285(21):2763-2773.
- Desvars A, Furberg M, Hjertqvist M, Vidman L, Sjöstedt A, Rydén P, Johansson A. 2015. Epidemiology and ecology of tularemia in Sweden, 1984–2012. *Emerg Infect Dis* 21(1):32-39.
- Ditchfield J, Meads EB, Julian RJ. 1960. Tularemia of muskrats in Eastern Ontario. *Can J Public Health* 51:474-478.
- Eisen RJ, Mead PS, Meyer AM, Pfaff LE, Bradley KK, Eisen L. 2008. Ecoepidemiology of tularemia in the southcentral United States. *Am J Trop Med Hyg* 78(4):586-594.

- El-Etr SH, Margolis JJ, Monack D, Robison RA, Cohen M, Moore E, Rasley A. 2009. *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl Environ Microbiol* 75(23):7488-7500.
- Eliasson H, Broman T, Forsman M, Back E. 2006. Tularemia: Current epidemiology and disease management. *Infect Dis Clin North Am* 20(2):289-311.
- Enderlin G, Morales L, Jacobs RF, Cross JT. 1994. Streptomycin and alternative agents for the treatment of tularemia: review of the literature. *Clin Infect Dis* 19(1):42-47.
- Evans GP. 1969. Tularemia in Huron County, Ontario, 1968. *Can J Public Health* 60(11):447-449.
- Feldman KA. 2003. Tularemia. *J Am Vet Med Assoc* 222(6):725-730.
- Fields B, Barbaree J, Shotts E, Feeley J, Morrill W, Sanden G, Dykstra M. 1986. Comparison of guinea pig and protozoan models for determining virulence of *Legionella* species. *Infect Immun* 53(3):553-559.
- Foley JE, Nieto NC. 2010. Tularemia. *Vet Microbiol* 140(3-4, Sp. Iss. SI):332-338.
- Ford-Jones L, Delage G, Powell KR. 1982. 'Muskrat fever': Two outbreaks of tularemia near Montreal. *Can Med Assoc J* 127(4):298-299.
- Forsman M, Henningson EW, Larsson E, Johansson T, Sandström G. 2000. *Francisella tularensis* does not manifest virulence in viable but non-culturable state. *FEMS Microbiol Ecol* 31(3):217-224.
- Francis E. 1922. Tularemia Francis 1921: A new disease of man. *JAMA* 78(14):1015-1018.
- Francis E. 1937. Sources of infection and seasonal incidence of tularaemia in man. *Public Health Rep* 52(4):103-113.
- Francis E, Mayne B, Lake GC. 1921. Tularaemia Francis 1921. *Public Health Rep* 36(30):1731-1753.
- Fyvie A, Ross WG, Labzoffsky NA. 1959. Tularemia among muskrats on Walpole Island, Lake St. Clair, Ontario. *Can J Comp Med Vet Sci* 23(5):153-156.
- Gattereau A, Gareau R, Diallo GS. 1970. Deux cas de tularémie dans la province de Québec. *Can Med Assoc J* 103(5):512-515.
- Gese EM, Karki SM, Klavetter ML, Schauster ER, Kitchen AM. 2004. Serologic survey for canine infectious diseases among sympatric swift foxes (*Vulpes velox*) and coyotes (*Canis latrans*) in Southeastern Colorado. *J Wildl Dis* 40(4):741-748.
- Gese EM, Schultz RD, Johnson MR, Williams ES, Crabtree RL, Ruff RL. 1997. Serological survey for diseases in free-ranging coyotes (*Canis latrans*) in Yellowstone National Park, Wyoming. *J Wildl Dis* 33(1):47-56.
- Gibbons RJ. 1939. Survey of Rocky Mountain spotted fever and sylvatic plague in western Canada during 1938. *Can Pub Health* 30(4):184-187.

- Gibby I, Nicholes P, Tamura J, Foshay L. 1948. The effects of an extract of blood cells upon the cultivation of *Bacterium tularensis* in liquid media. *J Bacteriol* 55(6):855.
- Gier HT, Ameel DJ. 1959. *Parasites and diseases of Kansas coyotes*. Kansas Technical Bulletin 91. Agricultural Experiment Station, Kansas State College of Agriculture and Applied Science, Kansas State University, Manhattan, Kansas, 34 pp.
- Gier HT, Kruckenberg SM, Marler RJ. 1978. Parasites and diseases of coyotes. Dans: *Coyotes: biology, behavior, and management*, M. Bekoff, (éditeur). Academic Press, Inc, New York, USA & London, pp. 37-71.
- Goethert HK, Telford III SR. 2009. Nonrandom distribution of vector ticks (*Dermacentor variabilis*) infected by *Francisella tularensis*. *PLoS pathogens* 5(2):e1000319.
- Goodpasture EW, House SJ. 1928. The pathologic anatomy of tularemia in man. *Am J Pathol* 4(3):213.
- Gordon JR, McLaughlin BG, Nitiuthai S. 1983. Tularemia transmitted by ticks *Dermacentor andersoni* in Saskatchewan, Canada. *Can J Comp Med* 47(4):408-411.
- Greco D, Allegrini G, Tizzi T, Ninu E, Lamanna A, Luzi S. 1987. A waterborne tularemia outbreak. *Eur J Epidemiol* 3(1):35-38.
- Green R, Wade E. 1928. Experimental tularemia in birds. *Exp Biol Med* 25(8):637-637.
- Green RG. 1938. *Gross lesions of tularaemia in cottontail rabbits and snowshoe hares*. Minnesota Wildlife Disease Investigation. Division of Game and Fish, Minnesota Department of Conservation, 2-3 pp.
- Green RG. 1939. Tularaemia, a common disease in wild animals. *The Minnesota conservationist* 67:14-16.
- Green RG. 1943. Virulence of tularemia as related to animal and arthropod hosts. *Am J Hyg* 38(3):282-292.
- Green RG, Shillinger JE. 1932. Relation of disease to wildlife cycles. Dans: *Proceedings of the 19th Am Game Conf Trans*. University of Minnesota, pp. 432-436.
- Green RG, Shillinger JE. 1935. Progress report of wildlife disease studies for 1934. Dans: *Proceedings of the 21st Am Game Conf Trans*. University of Minnesota, pp. 397-401.
- Guryčová D. 1998. First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe. *Eur J Epidemiol* 14(8):797-802.
- Gurycová D, Výrosteková V, Khanakah G, Kocianová E, Stanek G. 2001. Importance of surveillance of tularemia natural foci in the known endemic area of Central Europe, 1991-1997. *Wien Klin Wochenschr* 113(11-12):433-438.
- Gyuranecz M, Rigo K, Dan A, Foeldvari G, Makrai L, Denes B, Fodor L, Majoros G, Tirjak L, Erdelyi K. 2011. Investigation of the ecology of *Francisella tularensis* during an inter-epizootic period. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 11(8):1031-1035.
- Gyuranecz M, Szeredi L, Makrai L, Fodor L, Meszaros AR, Szepe B, Fuleki M, Erdelyi K. 2010. Tularemia of European brown hare (*Lepus europaeus*): a pathological, histopathological, and immunohistochemical study. *Vet Pathol* 47(5):958-963.

- Helvacı S, Gedikoğlu S, Akalın H, Oral H. 2000. Tularemia in Bursa, Turkey: 205 cases in ten years. *Eur J Epidemiol* 16(3):271-276.
- Hoff GL, Yuill TM, Iversen JO, Hanson RP. 1970. Selected microbial agents in snowshoe hares and other vertebrates of Alberta. *J Wildl Dis* 6(4):472-478.
- Hopla C. 1974. The ecology of tularemia. *Adv Vet Sci Comp Med* 18:25-53.
- Hopla CE. 1953. Experimental studies on tick transmission of tularemia organisms. *Am J Epidemiol* 58(1):101-118.
- Hopla CE. 1955. The multiplication of tularemia organisms in the lone star tick. *Am J Epidemiol* 61(3):371-380.
- Hubálek Z. 2004. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *J Wildl Dis* 40(4):639-659.
- Humphreys F, Campbell A. 1947. Plague, Rocky Mountain spotted fever, and tularaemia surveys in Canada. *Can J Public Health* 38(3):124-130.
- Institut national de santé publique du Québec. 2011. Statistiques d'analyses du Laboratoire de santé publique du Québec. *Bulletin STATLABO* 10(11):1-12.
- Jammal A, Allard R, Loslier G. 1988. *Dictionnaire d'épidémiologie*. Edisem, St-Hyacinthe, Qc, 171 pp.
- Jellison W, Bell J, Owen C. 1959. Mouse disease studies. Dans: *The Oregon meadow mouse irruption of 1957-1958*, Federal Cooperative Extension Service, (éditeur). Oregon State College, Corvallis, pp. 71-80.
- Jellison WL. 1950. Tularemia geographical distribution of "deerfly fever" and the biting fly, *Chrysops discalis williston*. *Public Health Rep* 65(41):1321-1329.
- Jellison WL. 1974. *Tularemia in North America, 1930-1974*. University of Montana Foundation, Missoula, Montana 276 pp.
- Jellison WL, Kohls GM, Butler W, Weaver JA. 1942. Epizootic tularemia in the beaver, *Castor canadensis*, and the contamination of stream water with *Pasteurella tularensis*. *Am J Epidemiol* 36(2):168-182.
- Jellison WL, Kohls GM, Philip CB. 1951. Tularemia-muskrats as a source of human infection in Utah. *Rocky Mt Med J* 48(8):594-597.
- Jellison WL, Owen CR, Bell JF, Kohls GM. 1961. Tularemia and animal populations: ecology and epizootiology. *Wildl Dis* 17:1-22.
- Jellison WL, Parker R. 1945. Rodents, rabbits and tularemia in North America: some zoological and epidemiological considerations. *Am J Trop Med Hyg* 1(4):349-362.
- Johansson A, Forsman M, Sjostedt A. 2004. The development of tools for diagnosis of tularemia and typing of *Francisella tularensis*. *APMIS (Acta Pathol Microbiol Immunol Scand)* 112 (11-12):898-907.
- Johnson H. 1944. Natural occurrence of tularemia in dogs used as a source of canine distemper virus. *J Lab Clin Med* 29:906-915.

- Karpoff S, Antonoff N. 1936. The spread of tularemia through water, as a new factor in its epidemiology. *J Bacteriol* 32(3):243.
- Kaysser P, Seibold E, Mätz-Rensing K, Pfeffer M, Essbauer S, Splettstoesser WD. 2008. Re-emergence of tularemia in Germany: presence of *Francisella tularensis* in different rodent species in endemic areas. *BMC Infect Dis* 8(1):157.
- Keim P, Johansson A, Wagner DM. 2007. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Ann N Y Acad Sci* 1105:30-66.
- Konstantinova N, Kormilitsyna M, Didenko L, Meshcheriakova I. 1999. The ultrastructural characteristics of *Francisella tularensis* interaction with *Tetrahymena pyriformis* [résumé]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1:10-15.
- Krebs CJ. 1996. Population cycles revisited. *J Mammal* 77(1):8-24.
- Kugeler KJ, Mead PS, Janusz AM, Staples JE, Kubota KA, Chalcraft LG, Petersen JM. 2009. Molecular epidemiology of *Francisella tularensis* in the United States. *Clin Infect Dis* 48(7):863-870.
- Kunkel GM. 1930. Report of case of tularaemia contracted from a coyote (*Canis lestes*) in New Mexico. *Public Health Rep* 45(9):439-440.
- Kursban NJ, Foshay L. 1946. Tularemia acquired from the pheasant. *JAMA* 131(18):1493-1494.
- Labzoffsky NA, Sprent JFA. 1952. Tularemia among beaver and muskrat in Ontario. *Can J Med Sci* 30:250-255.
- Langford EV. 1954. An outbreak of tularaemia in beaver and muskrat in Waterton Lakes National Park, Alberta. *Can J Comp Med* 18:28-30.
- Leighton FA, Artsob HA, Chu MC, Olson JG. 2001. A serological survey of rural dogs and cats on the southwestern Canadian prairie for zoonotic pathogens. *Can J Public Health* 92(1):67-71.
- Lepitzki DA, Woolf A, Cooper M. 1990. Serological prevalence of tularemia in cottontail rabbits of southern Illinois. *J Wildl Dis* 26(2):279-282.
- Levesque B, De Serres G, Higgins R, D'Halewyn M-A, Artsob H, Grondin J, Major M, Garvie M, Duval B. 1995. Seroepidemiologic study of three zoonoses (Leptospirosis, Q fever, and tularemia) among trappers in Québec, Canada. *Clin Diagn Lab Immunol* 2(4):496-498.
- Lévesque B, Messier V, Bonnier-Viger Y, Couillard M, Côté S, Ward BJ, Libman MD, Gingras S, Dick D, Dewailly É. 2007. Seroprevalence of zoonoses in a Cree community (Canada). *Diagn Microbiol Infect Dis* 59(3):283-286.
- Lundgren DL, Marchette NJ, Smart KL. 1957. Tularemia in the coyote *Canis latrans lestes* Merriam. *J Infect Dis* 101(2):154-157.
- Lundström JO, Andersson A-C, Bäckman S, Schäfer ML, Forsman M, Thelaus J. 2011. Transstadial transmission of *Francisella tularensis holarctica* in mosquitoes, Sweden. *Emerg Infect Dis* 17(5):794.

- Mac Lulich DA. 1937. Fluctuations in the numbers of varying hare (*Lepus americanus*). *Univ Toronto Stud Biol Ser* 43:1-136.
- Marchette NJ. 1960. *Experimental tularemia in wild animals*. Doctorat ès sciences, Department of Bacteriology, University of Utah, Salt Lake City, 92 pp.
- Maurin M, Pelloux I. 2014. *Francisella tularensis* et la tularémie. *RFL* 2014(464):31-35.
- McCoy GW, Chapin CW. 1912. Further observations on a plague-like disease of rodents with a preliminary note on the causative agent, *Bacterium tularense*. *J Infect Dis*:61-72.
- McCrum Jr FR. 1961. Aerosol infection of man with *Pasteurella tularensis*. *Bacteriol Rev* 25(3):262.
- McCue PM, O'Farrell TP. 1988. Serological survey for selected diseases in the endangered San Joaquin kit fox *Vulpes macrotis mutica*. *J Wildl Dis* 24(2):274-281.
- McDermid AM. 1946. Report on muskrat disease. *Wis Cons Bull* 11(8-9):21-22.
- McKeever S, Schubert JH, Moody MD, Gorman GW, Chapman JF. 1958. Natural occurrence of tularemia in marsupials, carnivores, lagomorphs, and large rodents in southwestern Georgia and northwestern Florida. *J Infect Dis* 103(2):120-126.
- McNabb A. 1930. Tularemia: The first case reported in Canada. *Can Pub Health* 21:91-92.
- Mead PS, Petersen JM. 2009. Tularemia. Dans: *Bacterial infections of humans : epidemiology and control*, P. S. Brachman, AND E. Abrutyn, (éditeurs), pp. 897-911.
- Messier V, Levesque B, Proulx JF, Rochette L, Serhir B, Couillard M, Ward BJ, Libman MD, Dewailly E, Dery S. 2012. Seroprevalence of Seven Zoonotic Infections in Nunavik, Quebec (Canada). *Zoonoses Public Health* 59(2):107-117.
- Miller LG. 1974. Further studies on tularemia in Alaska: virulence and biochemical characteristics of indigenous strains. *Can J Microbiol* 20(11):1585-1590.
- Mörner T. 1992. The ecology of tularemia. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot* 11:1123-1130.
- Morner T, Addison E. 2001. Tularemia. Dans: *Infectious diseases of wild mammals*, E. S. Williams, AND I. K. Barker, (éditeurs), Iowa State University Press, pp. 303-312.
- Mörner T, Mattsson R. 1983. Tularemia in a rough-legged buzzard (*Buteo lagopus*) and a ural owl (*Strix uralensis*). *J Wildl Dis* 19(4):360-361.
- Mörner T, Mattsson R. 1988. Experimental infection of five species of raptors and of hooded crows with *Francisella tularensis* biovar *palaeartica*. *J Wildl Dis* 24(1):15-21.
- Morner T, Sandstedt K. 1983. A serological survey of antibodies against *Francisella tularensis* in some Swedish mammals. *Nord Veterinaarmed* 35(2):82-85.
- Morner T, Sandstrom G, Mattsson R, Nilsson P-O. 1988. Infections with *Francisella tularensis* biovar *palaeartica* in hares *Lepus timidus*, *Lepus europaeus* from Sweden. *J Wildl Dis* 24(3):422-433.
- Moteiunas L, Meshcheriakova I, Demidova T. 1984. Results of the study of bird droppings collected in the Lithuanian SSR for the purpose of searching out tularemia epizootics [résumé]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*(2):67-71.

- Olsufjev N, Shlygina K, Ananova E. 1984. Persistence of *Francisella tularensis* McCoy et Chapin tularemia agent in the organism of highly sensitive rodents after oral infection. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 28(4):441-454.
- Östman Ö, Lundström JO, Vinnersten TZP. 2008. Effects of mosquito larvae removal with *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) on natural protozoan communities. *Hydrobiologia* 607(1):231-235.
- Owen CR, Buker EO. 1956. Factors involved in the transmission of *Pasteurella tularensis* from inoculated animals to healthy cage mates. *J Infect Dis* 99(3):227-233.
- Padeshki PI, Ivanov IN, Popov B, Kantardjiev TV. 2010. The role of birds in dissemination of *Francisella tularensis*: first direct molecular evidence for bird-to-human transmission. *Epidemiol Infect* 138(03):376-379.
- Palmieri JR, Elswaifi SF. 2009. Low temperature induces trophozoites of *Acanthamoeba* spp. to phagocytose *Francisella tularensis*, explaining a possible mechanism of survival during winter [résumé]. *Am J Trop Med Hyg* 81(5, Suppl. S)
- Palo TR, Ahlm C, Tärnvik A. 2005. Climate variability reveals complex events for tularemia dynamics in man and mammals. *Ecol Soc* 10(1):22.
- Parker R, Francis E. 1926. Susceptibility of the coyote (*Canis testes*) to tularemia. *Public Health Rep* 41(28):1407-1410.
- Parker R, Hearle E, Bruce E. 1931. The occurrence of tularaemia in British Columbia. *Public Health Rep* 46(2):45-46.
- Parker R, Spencer R. 1926. Hereditary transmission of tularemia infection by the wood tick *Dermacentor andersoni* Stiles. *Public Health Rep* 41(28):1403-1407.
- Parker RR, Steinhaus EA, Kohls GM, Jellison WL. 1951. Contamination of natural waters and mud with *Pasteurella tularensis* and tularemia in beavers and muskrats in the northwestern United States. *Bull Natl Inst Health* 193:1-59.
- Pavlovsky EN, Plous JR FK, Levine ND. 1966. Natural nidity of transmissible diseases. *Am J Med Sci* 252(5):161.
- Pearson AD. 1975. Epidemiology of rodent tularemia in Norway and Sweden. *Ecol Bull*:99-111.
- Perron D. 1984. Tularémie : situation particulière dans la vallée du Richelieu, Québec. *Méd Vét Québec* 14(4):183-185.
- Petersen JM, Mead PS, Schriefer ME. 2009. *Francisella tularensis*: an arthropod-borne pathogen. *Vet Res* 40(2):1.
- Petersen JM, Schriefer ME. 2005. Tularemia: emergence/re-emergence. *Vet Res* 36(3):455-467.
- Petersen JM, Schriefer ME, Carter LG, Zhou Y, Sealy T, Bawiec D, Yockey B, Urich S, Zeidner NS, Kool JL. 2004a. Laboratory analysis of tularemia in wild-trapped, commercially traded prairie dogs, Texas, 2002. *Emerg Infect Dis* 10(3).

- Petersen JM, Schriefer ME, Gage KL, Montenieri JA, Carter LG, Stanley M, Chu MC. 2004b. Methods for enhanced culture recovery of *Francisella tularensis*. *Appl Environ Microbiol* 70(6):3733-3735.
- Petrisheva P. 1965. *Vectors of diseases of natural foci*. Israel Program for Scientific Translation, Jerusalem, 332 pp.
- Petrov V. 1960. Experimental study of *Dermacentor marginatus* Sulz. and *Rhipicephalus rossicus* Jak. et K. Jak. ticks as vectors of tularemia. *J Parasitol*:877-884.
- Philip C. 1952. Arthropod feces as a source of infection in experimental tularemia and Rocky Mountain spotted fever. *J Parasitol* 38:25.
- Philip CB. 1932. Experimental transmission of tularaemia by mosquitoes. *Public Health Rep* 47(43):2077-2088.
- Philip CB, Gill GD, Geary JM. 1954. Notes on the rabbit tick, *Haemaphysalis leporis-palustris* (Packard), and tularemia in central Alaska. *J Parasitol* 40(4):484-485.
- Philip CB, Jellison WL. 1934. The American dog tick, *Dermacentor variabilis*, as a host of *Bacterium tularense*. *Public Health Rep* 49(12):386-392.
- Philip CB, Parker RR. 1938. Occurrence of tularaemia in the rabbit tick (*Haemaphysalis leporis-palustris*) in Alaska. *Public Health Rep* 53(15):574-575.
- Pikula J, Beklova M, Holešovská Z, Tremel F. 2004. Ecology of European brown hare and distribution of natural foci of tularaemia in the Czech Republic. *Acta Vet Brno* 73(2):267-None.
- Pikula J, Tremel F, Beklová M, Holešovská Z, Pikulová J. 2003. Ecological conditions of natural foci of tularaemia in the Czech Republic. *Eur J Epidemiol* 18(11):1091-1095.
- Porsch-Özcürümez M, Kischel N, Priebe H, Splettstösser W, Finke E-J, Grunow R. 2004. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting, microagglutination, indirect immunofluorescence assay, and flow cytometry for serological diagnosis of tularemia. *Clin Diagn Lab Immunol* 11(6):1008-1015.
- Rand C. 1949. Tularaemia; an epidemiological review. *Can Med Assoc J* 61(5):501-505.
- Rausch RL. 1972. Observations on some natural-focal zoonoses in Alaska. *Arch Environ Health* 25(4):246-252.
- Reese SM, Dietrich G, Dolan MC, Sheldon SW, Piesman J, Petersen JM, Eisen RJ. 2010. Transmission dynamics of *Francisella tularensis* subspecies and clades by nymphal *Dermacentor variabilis* (acari: Ixodidae). *Am J Trop Med Hyg* 83(3):645.
- Reese SM, Petersen JM, Sheldon SW, Dolan MC, Dietrich G, Piesman J, Eisen RJ. 2011. Transmission efficiency of *Francisella tularensis* by adult American dog ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 48(4):884-890.
- Rosai J. 2004. *Rosai and Ackerman's surgical pathology (Ninth edition)*. Mosby, Edinburgh, Toronto, 2977 pp.
- Rosow H, Forbes KM, Tarkka E, Kinnunen PM, Hemmilä H, Huitu O, Nikkari S, Henttonen H, Kipar A, Vapalahti O. 2014. Experimental infection of voles with *Francisella*

- tularensis* indicates their amplification role in tularemia outbreaks. *PLoS ONE* 9(10):e108864.
- Sampasa-Kanyinga H, Lévesque B, Anassour-Laouan-Sidi E, Côté S, Serhir B, Ward BJ, Libman MD, Drebot MA, Ndao M, Dewailly É. 2012. Zoonotic infections in native communities of James Bay, Canada. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 12(6):473-481.
- Santé et services sociaux Québec. 2014. *Maladies à déclaration obligatoire (MADO)*, <http://www.msss.gouv.qc.ca/professionnels/mado/index.php>. Consulté le 12 décembre 2014.
- Saslaw S, Eigelsbach HT, Wilson HE, Prior JA, Carhart S. 1961. Tularemia vaccine study: I. intracutaneous challenge. *Arch Intern Med* 107(5):689-701.
- Schlotthauer CF, Thompson L, Carl O, Jr. 1935. Tularemia in wild gray foxes: report of an epizootic. *J Infect Dis* 56(1):28-30.
- Sharma N, Hotta A, Yamamoto Y, Fujita O, Uda A, Morikawa S, Yamada A, Tanabayashi K. 2013. Detection of *Francisella tularensis*-specific antibodies in patients with tularemia by a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Vaccine Immunol* 20(1):9-16.
- Shlygina KN, Baranovskii PM, Ananova EV, Olsufev NG. 1987. Possible atypical course of tularemia (persistence) in the common vole *Microtus arvalis* Pall [résumé]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*(3):26-29.
- Shlygina KN, Olsufev NG. 1982. Experimental latent tularemia in common voles [résumé]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 4:101-104.
- Silverman M, Law B, Carson J. 1990. A case of insect borne tularemia above the tree line [résumé]. *Arct Med Res*:377-379.
- Sjöstedt A. 2006. Intracellular survival mechanisms of *Francisella tularensis*, a stealth pathogen. *Microbes Infect* 8(2):561-567.
- Sjöstedt A. 2007. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann N Y Acad Sci* 1105(1):1-29.
- Spencer RR, Francis E. 1924. Tularæmia: XI. Tularæmia infection in ticks of the species *Dermacentor andersoni* Stiles in the Bitterroot Valley, Mont. *Public Health Rep* 39(19):1057-1073.
- Stagg G, Tanner WS, Lavender J. 1956. Experimental infections of native animals with *Pasteurella tularensis*. *J Infect Dis* 99(1):34-37.
- Staples JE, Kubota KA, Chalcraft LG, Mead PS, Petersen JM. 2006. Epidemiologic and molecular analysis of human tularemia, United States, 1964–2004. *Emerg Infect Dis* 12(7):1113.
- Stephen LM, Kate FG, Richard WT. 2006. Tularemia pathogenesis and immunity. Dans: *Microorganisms and Bioterrorism*, B. Anderson, H. Friedman, AND M. Bendinelli, (éditeurs). Springer, pp. 121-137.

- Svensson K. 2009. *Genetic genealogy and epidemiology of Francisella*. Doctorat ès sciences, Department of Clinical Microbiology, Umeå University, Umeå, Sweden, 47 pp.
- Svensson K, Bäck E, Eliasson H, Berglund L, Granberg M, Karlsson L, Larsson P, Forsman M, Johansson A. 2009. Landscape epidemiology of tularemia outbreaks in Sweden. *Emerg Infect Dis* 15(12):1937-1947.
- Syrjälä H, Koskela P, Ripatti T, Salminen A, Herva E. 1986. Agglutination and ELISA methods in the diagnosis of tularemia in different clinical forms and severities of the disease. *J Infect Dis* 153(1):142-145.
- Tärnvik A. 1989. Nature of protective immunity to *Francisella tularensis*. *Clin Infect Dis* 11(3):440-451.
- Tärnvik A, Priebe H-s, Grunow R. 2004. Tularaemia in Europe: an epidemiological overview. *Scand J Infect Dis* 36(5):350-355.
- Telford III SR, Goethert HK. 2010. Toward an understanding of the perpetuation of the agent of tularemia. *Front Microbiol* 1(150):1-7.
- Thelaus J, Andersson A, Broman T, Bäckman S, Granberg M, Karlsson L, Kuoppa K, Larsson E, Lundmark E, Lundström J. 2013. *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* occurs in Swedish mosquitoes, persists through the developmental stages of laboratory-infected mosquitoes and is transmissible during blood feeding. *Microb Ecol*:1-12.
- Thelaus J, Andersson A, Mathisen P, Forslund AL, Noppa L, Forsman M. 2009. Influence of nutrient status and grazing pressure on the fate of *Francisella tularensis* in lake water. *FEMS Microbiol Ecol* 67 (1):69-80.
- Thomas LD, Schaffner W. 2010. Tularemia pneumonia. *Infect Dis Clin North Am* 24(1):43-55.
- Thorpe BD, Sidwell R, Johnson D, Smart K, Parker D. 1965. Tularemia in the wildlife and livestock of the Great Salt Lake Desert region, 1951 through 1964. *Am J Trop Med Hyg* 14(4):622-637.
- Tigertt W. 1962. Soviet viable *Pasteurella tularensis* vaccines. *Bacteriol Rev* 26(3):354-373.
- Toma B. 1991. *Glossaire d'épidémiologie animale*. Éditions du Point Vétérinaire, Collection Médecine vétérinaire, 365 pp.
- Trainer DO, Knowlton FF. 1968. Serologic evidence of diseases in Texas coyotes. *J Wildl Manage* 32(4):981-983.
- Valli VEOT. 2007. Hematopoietic system. Dans: *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals (Fifth Edition)*, M. G. Maxie, (éditeur). Elsevier, Edinburgh, pp. 107-324.
- Vest ED, Marchette NJ. 1958. Transmission of *Pasteurella tularensis* among desert rodents through infective carcasses. *Science* 128(3320):363-364.
- von Keyserlingk M, Runge M, Braune S. 2011. Tularämie in Niedersachsen: Wissenslücke geschlossen. *Niedersächsischer Jäger* 12(20):20-23.

- Výrosteková V, Khanakah G, Kocianová E, Gurycová D, Stanek G. 2002. Prevalence of coinfection with *Francisella tularensis* in reservoir animals of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Wien Klin Wochenschr* 114(13-14):482-488.
- Wahab T, Birdsell DN, Hjertqvist M, Mitchell CL, Wagner DM, Keim PS, Hedenström I, Löfdahl S. 2014. Insights to genetic characterization tools for epidemiological tracking of *Francisella tularensis* in Sweden. *PLoS ONE* 9(11):e112167.
- Walker WJ, Moore CA. 1971. Tularemia: experience in the Hamilton area. *Can Med Assoc J* 105(4):390-396.
- Weinberg AN. 2004. COMMENTARY: Wherry WB, Lamb BH. Infection of man with Bacterium tularense. *J Infect Dis* 1914; 15: 331–40. *J Infect Dis* 189(7):1317-1320.
- Wobeser G, Campbell GD, Dallaire A, McBurney S. 2009. Tularemia, plague, yersiniosis, and Tyzzer's disease in wild rodents and lagomorphs in Canada: a review. *Can Vet J* 50(12):1251-1256.
- Wobeser G, Hunter DB, Daoust PY. 1978. Tyzzer's disease in muskrats occurrence in free living animals. *J Wildl Dis* 14(3):325-328.
- World Health Organization. 2007. *WHO guidelines on tularaemia*. WHO/CDS/EPR/2007.7. WHO, Geneva, CH, 115 pp.
- Yeatter RE, Thompson DH. 1952. Tularemia, weather, and rabbit populations. *Ill Nat Hist Surv Bull* 25(6):351-382.
- Young LS, Bicknell DS, Archer BG, Clinton JM, Leavens LJ, Feeley JC. 1969. Tularemia epidemic: Vermont, 1968: forty-seven cases linked to contact with muskrats. *N Engl J Med* 280(23):1253-1260.
- Zarnke R, Yuill TM. 1981. Serologic survey for selected microbial agents in mammals from Alberta Canada 1976. *J Wildl Dis* 17(3):453-462.
- Zarnke RL, Ver Hoef JM, DeLong RA. 2004. Serologic survey for selected disease agents in wolves (*Canis lupus*) from Alaska and the Yukon Territory, 1984-2000. *J Wildl Dis* 40(4):632-638.
- Zhang F, Liu W, Chu MC, He J, Duan Q, Wu X-M, Zhang P-H, Zhao Q-M, Yang H, Xin Z-T. 2006. *Francisella tularensis* in rodents, China. *Emerg Infect Dis* 12(6).

Annexe 1. Tableaux détaillant les études réalisées chez le lièvre d'Amérique, le rat musqué et le coyote

Tableau VII. Études chez le lièvre d'Amérique (*Lepus americanus*)

Référence	Localisation	Année Étude	Test diagnostique ^a	Animal (Échantillons)	Résultats
Rapport de cas					
Parker et al., (1931)	Colombie-Britannique, Canada	1930	Inocu labo + Cult	1 lièvre d'Amérique moribond (Foie et rate prélevés)	1/3 cochons d'Inde injectés de foie 0/3 cochons d'Inde injectés de rate
				Tiques du lièvre prélevés du lièvre d'Amérique	1/3 cochons d'Inde injectés de tiques
Investigations pour plusieurs agents infectieux					
Humphreys et Campbell, (1947)	Alberta, Canada	1939-1946	Inocu labo + Cult	Lapin ou lièvre Nombre non spécifié	1/1
Philip et Parker, (1938)	Alaska, États-Unis	1937	Inocu labo + Cult	Tiques de lièvre séparés en 3 groupes (Groupe 1 : 75 tiques prélevés de 5 lièvres Groupe 2 : 130 tiques prélevés d'un lièvre Groupe 3 : 27 tiques prélevés d'un lièvre) État de santé du lièvre (mort, malade ou vivant) non spécifié	3 groupes positifs

Tableau VII. Études chez le lièvre d'Amérique (*Lepus americanus*)

Référence	Localisation	Année Étude	Test diagnostique ^a	Animal (Échantillons)	Résultats
Philip et al., (1954)	Alaska, États-Unis	1950-1952	Inocu labo + Cult	Tiques du lièvre prélevés de 47 lièvres	0
	Alaska, États-Unis	1953	Inocu labo + Cult	430 tiques de lièvre prélevés de lièvres d'Amérique, séparés en 14 groupes	3/14 groupes positifs (Lots positifs : 27 tiques prélevés de 2 lièvres apparemment en santé, 14 tiques prélevés d'un lièvre trouvé mort et 1 tique provenant d'un lièvre malade)
Investigations d'éclosion					
Ditchfield et al., (1960)	Ontario, Canada	1960	Aggl	25 lièvres tués par balle, suite à une éclosion de tularémie chez des rats musqués (Sang et organes prélevés)	4% (1/25) 2 lièvres avec titre de 1 :8 1 lièvre avec titre de 1 :256
			Inocu labo + Cult	600 tiques de lièvre prélevés de ces 25 lièvres, divisés en 3 pools	3/3 pools positifs

Tableau VII. Études chez le lièvre d'Amérique (*Lepus americanus*)

Référence	Localisation	Année Étude	Test diagnostique ^a	Animal (Échantillons)	Résultats
Miller, (1974)	Centre d'Alaska, États-Unis	1971	Inocu labo + Cult	24 lièvres d'Amérique tués par balle ou trappés, suite à l'observation de mortalité importante chez les lièvres d'Amérique Statut de santé non spécifié (Organes et tissus prélevés)	18.0% (1/24) (culture positive à partir du foie et de la rate)
				Tiques du lièvre prélevés des 24 lièvres et séparés en 24 groupes	7/24 groupes positifs (incluant le groupe de tiques prélevé du lièvre positif)
Études de séroprévalence					
Mac Lulich, (1937)	Ontario, Canada	1932-1935	Aggl	Lièvres trappés (Sang prélevé)	13.8% (4/29)
Hoff et al., (1970)	Alberta, Canada	1961-1969	Aggl plaque (Titre \geq 1:80 = Positif)	Lièvres trappés (Sang prélevé)	0.13% (2/1543)
Zarnke et Yuill, (1981)	Alberta, Canada	1976	Aggl lame (dilution à 1 :400) (Titre \geq 1:400 = Positif)	Lièvres trappés (Sang prélevé)	0% (0/11)
Akerman et Embil, (1982)	Nouvelle-Écosse, Canada	1976-1978	Micro-aggl (Titre \geq 1:80 = Positif Titre \leq 1:20 = Négatif Titre $>$ 1/20 et $<$ 1/80 = ambigu)	Lièvres trappés (Sang prélevé)	1.55% (13/837) 12 ambiguës (25/837)
	Île-du-Pince-Édouard, Canada	1976-1979			0% (0/119) 1 ambuë (1/119)

Tableau VII. Études chez le lièvre d'Amérique (*Lepus americanus*)

Référence	Localisation	Année Étude	Test diagnostique ^a	Animal (Échantillons)	Résultats
Cayouette, (1993)	Cantons-de-l'Est, Chaudière-Appalaches, Mauricie, Saguenay-Lac-Saint-Jean et Bas-Saint-Laurent, Québec, Canada	1992	Aggl plaque (Titre $\geq 1 : 20 =$ Positif)	41 lièvres capturés vivants et relâchés (Sang prélevé)	0% (0/41)
			Cult	56 échantillons de tiques récoltées des lièvres d'Amérique capturés	0% (0/56)

^aAggl : Test d'agglutination (non spécifié)

Aggl lam : Test d'agglutination sur lame

Aggl plaque : Test d'agglutination sur plaque

Aggl tube : Test d'agglutination en tube

Cult : Culture bactérienne

Exam macro : Examen macroscopique

Inocu emb + Cult : Inoculation d'embryons de poussins et culture subséquente

Inocu labo + Cult : Inoculation d'animaux de laboratoire et culture subséquente

Inocu labo + Macro : Inoculation d'animaux de laboratoire et examen macroscopique de ces animaux

Micro-aggl : Test de microagglutination

Tableau VIII. Études chez le rat musqué (*Ondatra zibethicus*)

Article	Mise en contexte	Localisation	Année Étude	Test diagnostic ^a	Échantillons	Résultats
Investigations d'éclosion						
Jellison et al., (1942)	Mortalités inquiétantes chez des castors	Montana, États-Unis	Automne 1939 jusqu'au printemps 1940	Inocu labo + Cult	1 rat musqué Statut de santé non spécifié (trappé ou trouvé mort) Près d'une rivière où 25 castors ont été trouvés morts dont 1 positif à la tularémie	0/1
					Plusieurs échantillons d'eau et de boue, prélevés de cette même rivière	Certains échantillons positifs pour l'eau et la boue
					27 rats musqués trappés Près d'un ruisseau où 2 castors ont été trouvés morts et testés positifs à la tularémie	0/27
					8 échantillons d'eau et 1 échantillon de boue, prélevés de ce même ruisseau	1/8 échantillon d'eau et 0/1 échantillon de boue positif
					1 rat musqué, trouvé mort Près d'un ruisseau où un castor a été trouvé mort et testé positif à la tularémie	1/1
					Échantillons d'eau prélevés de ce même ruisseau (Nombre non spécifié)	Positifs (nombre non spécifié)

Tableau VIII. Études chez le rat musqué (*Ondatra zibethicus*)

Article	Mise en contexte	Localisation	Année Étude	Test diagnostic ^a	Échantillons	Résultats
Parker et al., (1951)	Mortalité chez des castors et rats musqués	Montana et Idaho, États-Unis	1942-1943	Inocu labo + Cult	30 rats musqués, dont au moins 21 trouvés morts et au moins 2 trappés mais malades	20/30 (dont au moins 17 trouvés morts et 1 trappé mais malade)
					Plusieurs échantillons d'eau et boue	Positifs pour chaque cours d'eau étudié
McDermid, (1946)	Mortalité importante de rats musqués (>1100 carcasses de rats musqués trouvés morts au cours de l'étude)	Wisconsin, États-Unis	1946	Exam macro	Au moins 48 rats musqués, dont 42 trouvés morts et 6 trappés	Lésions typiques pour la majorité des rats musqués trouvés morts (~30/40) et aucun des rats musqués trappés (0/6)
				Inocu labo + Macro		Lésions typiques de tularémie chez animaux de laboratoire Nombre non spécifié
Labzoffsky et Sprent, (1952)	Mortalité inquiétante chez des castors	Ontario, Canada	1949	Inocu labo + Cult Inocu emb + Cult	1 rat musqué, Statut de santé non spécifié (mort, vivant, malade) (Foie et rate prélevés)	1/1

Tableau VIII. Études chez le rat musqué (*Ondatra zibethicus*)

Article	Mise en contexte	Localisation	Année Étude	Test diagnostic ^a	Échantillons	Résultats
Jellison et al., (1951)	Mortalité importante chez des rats musqués	Utah, États-Unis	1950	Exam macro et Cult	2 rats musqués dont 1 trouvé mort et 1 trappé	1/2 (rat musqué trouvé mort)
			Juin 1950 (6) octobre et novembre 1950 (38)	Inocu labo + Cult	44 échantillons d'eau, provenant de différents ruisseaux, lacs, marécages, où une mortalité avait été observée	0/44 échantillon positif
		Idaho, États-Unis	Novembre 1950 (1) janvier 1951 (1)		2 échantillons d'eau prélevés à 16 km de la frontière avec Utah	2/2 échantillons positifs
Banfield, (1954); Langford, (1954)	Mortalités inquiétantes chez des castors et rats musqués	Alberta, Canada	Janvier 1953	Inocu labo + Cult	1 rat musqué et 2 castors, trouvés morts (Rate prélevée)	Au moins 1 individu positif parmi les 3 animaux
			Janvier 1953		10 échantillons d'eau	2/10 échantillons positifs
			Avril 1953		17 échantillons d'eau	0/17 échantillon positif
			Juillet 1953		5 échantillons d'eau	0/5 échantillon positif

Tableau VIII. Études chez le rat musqué (*Ondatra zibethicus*)

Article	Mise en contexte	Localisation	Année Étude	Test diagnostic ^a	Échantillons	Résultats
Fyvie et al., (1959)	Mortalités importantes chez des rats musqués	Ontario, Canada	Octobre 1955	Inocu labo + Cult	6 rats musqués, trouvés morts (Rates prélevées, groupées en 2 pools)	Positif (Nombre non spécifié)
				Inocu labo + Cult	16 échantillons d'eau et boue, prélevés autour des animaux morts, groupés en 4 pools	Positif (Nombre non spécifié)
Ditchfield et al., (1960)	Mortalités importantes chez des rats musqués	Ontario, Canada	1960	Cult et Inocu labo + Cult	Rats musqués trouvés morts Nombre non spécifié (Rate et foie prélevés)	Positifs (Nombre non spécifié)
				Cult (Technique de filtration Millipore)	22 échantillons d'eau prélevés de l'étang et les cours d'eau qui drainent l'étang	3/22 échantillons positifs

Tableau VIII. Études chez le rat musqué (*Ondatra zibethicus*)

Article	Mise en contexte	Localisation	Année Étude	Test diagnostic ^a	Échantillons	Résultats
Young et al., (1969)	Éclosions chez 47 trappeurs de rats musqués	Vermont, États-Unis	1968	Inocu labo + Cult	78 rats musqués trappés (Foie, poumon et rate prélevés)	5% (4/78) Note : Le test d'agglutination n'a pas été effectué pour ces 4 rats musqués positifs
				Aggl tube	12 rat musqué trappés (Ces individus font partie de l'échantillon de 78 rats musqués ci-haut) (Sang prélevé)	42% (5/12) (Titres variant de 1 :1 280 à 1 :20 480) Note : Les 5 rats musqués séropositifs étaient tous négatifs à la culture
				Inocu labo + Cult	40 échantillons d'eau et boue	Positifs pour eau et boue (Nombre non-spécifié)
Wobeser et al., (1978)	Mortalité inquiétante chez des rats musqués	Saskatchewan, Canada	1977	Cult	17 rats musqués, dont 4 trouvés morts et 13 trappés (Foie, poumons, rate et intestins prélevés)	0% (0/17) Note : La maladie de Tyzzer a été diagnostiquée

Tableau VIII. Études chez le rat musqué (*Ondatra zibethicus*)

Article	Mise en contexte	Localisation	Année Étude	Test diagnostic ^a	Échantillons	Résultats
Études de prévalence						
Dr FA Leighton, communication personnelle, (2014)	Région endémique	Saskatchewan, Canada	1977	Aggl tube	Rats musqués trappés Nombre non spécifié (Sang prélevé)	0%
von Keyserlingk et al., (2011)	Région endémique (Éclosion chez des chasseurs dans une province avoisinante)	Basse-saxe, Allemagne	Non disponible	PCR et Cult	2304 rats musqués trappés (Foie prélevé)	0% (1/2304)

^aAggl : Test d'agglutination (non spécifié)

Aggl lam : Test d'agglutination sur lame

Aggl plaque : Test d'agglutination sur plaque

Aggl tube : Test d'agglutination en tube

Cult : Culture bactérienne

Exam macro : Examen macroscopique

Inocu emb + Cult : Inoculation d'embryons de poussins et culture subséquente

Inocu labo + Cult : Inoculation d'animaux de laboratoire et culture subséquente

Inocu labo + Macro : Inoculation d'animaux de laboratoire et examen macroscopique de ces animaux

Micro-aggl : Test de microagglutination

Tableau IX. Études chez le coyote (*Canis latrans*)

Article	Localisation	Année	Test diagnostic ^a	Échantillon	Résultats	Association
Études de séroprévalence						
Thorpe et al., (1965)	Utah, États-Unis	1951-1964	Aggl tube (Titre ≥ 20 : Positif)	15 coyotes tirés (Sang prélevé)	13.3% (2/15)	Ø
Trainer et Knowlton, (1968)	Texas, États-Unis	1966	Aggl lame (Seuil non spécifié)	33 coyotes trappés (Sang prélevé)	0% (0/33)	Ø
Knowlton, cité par Gier et al., (1978)	Idaho États-Unis	1975	Test non spécifié (détection de titre d'anticorps)	Nombre de coyotes testés et technique pour la capture non spécifiés	88%	Ø
Gese et al., (1997)	Wyoming, États-Unis	1991, 1992 et 1993	Micro-aggl (Titre ≥ 128 : Positif)	70 coyotes capturés (Sang prélevé)	18.6% (13/70)	Aucune association avec : âge (3 ddl, $P = 0.88$) et région (1 ddl, $P = 0.40$) Association avec : année ($P = 0.043$)
Arjo et al., (2003)	Utah, États-Unis	1997-1999	Micro-aggl (Titre ≥ 127 : Positif)	67 coyotes capturés (Sang prélevé)	3.0% (2/67)	Aucune association avec : âge (1 ddl, $P = 0.67$) et région (1 ddl, $P = 0.77$)

Tableau IX. Études chez le coyote (*Canis latrans*)

Article	Localisation	Année	Test diagnostic ^a	Échantillon	Résultats	Association
Gese et al., (2004)	Colorado, États-Unis	1997-2001	Micro-aggl (Titre \geq 128 : Positif)	91 coyotes capturés (Sang prélevé)	4% (4/91)	Aucune association avec : âge (1 ddl, $P = 0.99$) et sexe (pour adulte $P = 0.16$ et juvénile $P > 0.30$)
Bischof et Rogers, (2005)	Nebraska, États-Unis	2002-2003	Aggl lame (Seuil non spécifié)	60 coyotes trappés (Sang prélevé)	32% (19/60)	Ø
Chronert, (2007)	Dakota du Sud, États-Unis	2003-2004	Micro-aggl (Titre \geq 128 : Positif)	16 coyotes capturés (Sang prélevé)	6% (1/16)	Ø

^aAggl : Test d'agglutination (non spécifié)

Aggl lam : Test d'agglutination sur lame

Aggl plaque : Test d'agglutination sur plaque

Aggl tube : Test d'agglutination en tube

Cult : Culture bactérienne

Exam macro : Examen macroscopique

Inocu emb + Cult : Inoculation d'embryons de poussins et culture subséquente

Inocu labo + Cult : Inoculation d'animaux de laboratoire et culture subséquente

Inocu labo + Macro : Inoculation d'animaux de laboratoire et examen macroscopique de ces animaux

Micro-aggl : Test de microagglutination

Annexe 2. Documents relatifs à la prise de données par les trappeurs

PROJET TULAREMIE

Document d'information destinés aux participants

INTRODUCTION AU PROJET

La tularémie est une maladie infectieuse causée par la bactérie *Francisella tularensis*. Elle peut affecter plus de 200 espèces animales, dont les oiseaux, les poissons, les amphibiens, les invertébrés et, plus particulièrement, les mammifères. Au Canada, la maladie est présente dans la faune sauvage où elle affecte principalement les lièvres, les rats musqués et les castors. Cette maladie revêt une importance particulière pour la santé publique puisqu'il s'agit d'une zoonose, c'est-à-dire une maladie transmissible de l'animal à l'homme. Depuis les 10 dernières années, une dizaine de cas humains de tularémie sont rapportés au Québec annuellement, principalement chez les chasseurs et les trappeurs. Toutefois, le risque d'exposition à la bactérie au Québec lors d'un contact avec la faune sauvage demeure méconnu sur le territoire québécois.

Le projet Tularémie vise à évaluer la fréquence de l'infection par l'agent de la tularémie chez la faune sauvage au Québec en relation avec les caractéristiques des animaux et du territoire. Trois espèces sont ciblées dans le cadre de ce projet, soit le coyote, le lièvre d'amérique et le rat musqué. Les animaux seront échantillonnés dans 4 régions du Québec : Bas St-Laurent, Chaudières-Appalaches, Abitibi-Témiscamingue et Estrie. Les carcasses et les échantillons d'animaux seront collectés par les trappeurs lors des activités régulières de trappe, puis soumises à la faculté de médecine vétérinaire à Saint-Hyacinthe pour des tests de laboratoire. Des analyses complémentaires réalisées sur les canines des coyotes et des rats musqués ainsi que sur le cristallin de l'œil des lièvres permettront d'obtenir des informations sur l'âge de chaque spécimen trappé. De plus, la mesure du gras entourant le rein servira d'indicateur du pourcentage de gras total chez l'animal. Finalement, à partir des coordonnées géographiques fournies par les trappeurs, les caractéristiques écologiques (e.g. climat, végétation, hydrologie) du lieu de capture de chaque animal seront extraites de bases de données géographiques, et ce, afin d'étudier l'influence des caractéristiques écologiques sur le risque d'infection.

Ce projet permettra de mieux caractériser le risque d'infection au Québec et contribuera à l'avancement des connaissances sur le cycle écologique de la bactérie, qui demeure très peu connu. Ainsi, dans une perspective de santé publique, ce projet pourra très certainement contribuer à l'orientation des efforts de contrôle et de prévention de la tularémie.

VOTRE PARTICIPATION AU PROJET

Votre participation est essentielle au projet afin de pouvoir obtenir un nombre suffisant d'échantillons pour atteindre les objectifs de cette étude. Nous vous demandons de nous envoyer les carcasses animales entières pour le lièvre d'amérique et le rat musqué. Par contre, un protocole particulier s'applique pour le coyote. L'animal étant plus gros, nous vous demandons de prélever des échantillons spécifiques afin d'éviter le transport de la carcasse complète. Deux sortes de troussees vous sont donc fournies : celles pour la capture du coyote et celles pour la capture du lièvre d'amérique et du rat musqué.

Les fiches suivantes précisent la liste du matériel fourni ainsi que la procédure pour l'envoi des carcasses et des échantillons. Vous trouverez en pièces jointes un protocole pour les coyotes et un autre

pour les lièvres et rats musqués qui décrivent les différentes manipulations requises pour la collecte et l'entreposage des échantillons.

Pour toutes questions concernant ce protocole et le projet ou dans le cas où vous avez besoin de matériel supplémentaire, veuillez contacter les responsables du projet.

Ce projet est réalisé en partenariat avec la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, le Ministère de Ressources naturelles et de la Faune du Québec, l'Agence de la santé publique du Canada et le Laboratoire national de microbiologie (Winnipeg), avec la collaboration financière de l'Institut national de santé publique du Québec (INSPQ) dans le cadre d'une entente avec le GREZOSP à la faculté de médecine vétérinaire.

LISTE DE MATÉRIEL FOURNI

1) Matériel de protection



Gants



Masque

2) Matériel d'entreposage



2 boîtes pour l'entreposage des tubes de sang
provenant de tous les coyotes capturés

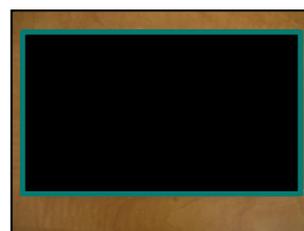
3) Matériel d'envoi



Étiquettes



3-5 grands sacs à moulée
accompagnés d'une attache
blanche



3-5 bons de connaissance



3-5 grands sacs semi-opaques
accompagnés d'une attache
blanche



2 glacières et des blocs
réfrigérants (icepacks) pour
l'envoi des tubes de sang

4) Trousse d'échantillonnage (1 trousse par spécimen trappé)

Une trousse contient tout le matériel nécessaire pour les prélèvements d'un seul animal. Il est **important d'éviter le mélange du matériel d'une trousse à l'autre**. Un numéro unique d'identification est attribué à chaque animal et à sa trousse.

TROUSSE POUR LES COYOTES



Des trousse pour les coyotes vous sont fournies.
Chaque trousse contient :



1 paire de gants



1 seringue



2 tubes prénumérotés



1 identifiant en métal



3 petits sacs ziploc
prénumérotés, incluant
le sac contenant le
matériel



1 sac semi-opaque



1 attache blanche



1 fiche de capture
prénumérotée

TROUSSE POUR LES LIEVRES D'AMERIQUE ET LES RATS MUSQUES



Des troussees pour les lièvres et les rats musqués vous sont fournies.
Chaque trousse contient :



1 paire de gants



1 fiche de capture prénumérotée



1 petit sac ziploc prénuméroté
contenant le matériel



1 sac semi-opaque



1 attache blanche

L'ENVOI DES ÉCHANTILLONS

Nous vous demandons d'entreposer les carcasses et les échantillons au congélateur jusqu'à l'obtention de 30 kg (60 lbs) à 45 kg (100 lbs) en considérant la totalité des spécimens demandés. L'envoi peut inclure plusieurs sacs en autant que le poids se situe dans la limite ci-haut. Avant leur envoi, ces derniers devront être emballés comme suit :

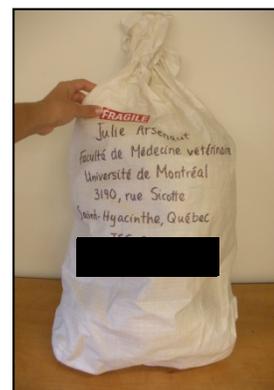
Les tubes sanguins

1. La boîte contenant les tubes sera déposée dans une glacière remplie de blocs réfrigérants (*icepacks*) pour le transport.



Les carcasses entières et les échantillons

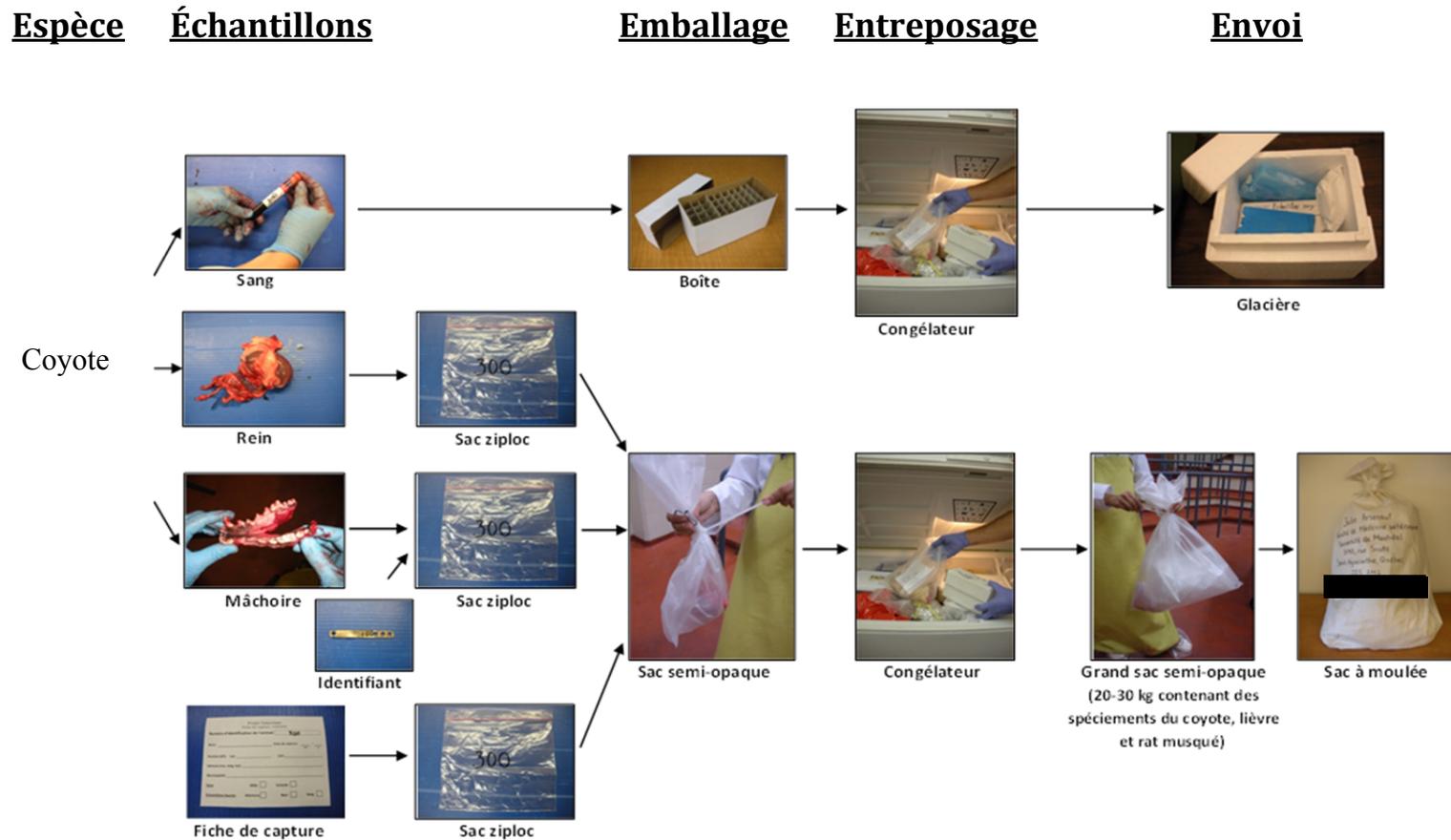
1. Les sacs semi-opaques contenant les carcasses entières ou les échantillons de coyotes devront être déposés ensemble dans un nouveau sac semi-opaque de grande dimension. Le contenu de ce sac ne devra pas excéder 20 à 30 kg. Plusieurs envois devront être effectués au cours de ce projet.
2. Le sac de 20 à 30 kg devra être refermé à l'aide d'une attache.
3. Ce dernier sera finalement déposé dans un sac à moulée sur lequel l'adresse d'expédition est indiquée. Le sac sera également refermé à l'aide d'une attache et une étiquette rouge 'fragile' devra être apposée sur ce sac.



Les échantillons seront transportés par [REDACTED] jusqu'à St-Hyacinthe. Vous devez apporter les spécimens au point de service le plus près de chez vous. Remettez le bon de connaissance comprenant les coordonnées de l'expéditeur et du destinataire. Si vous n'avez plus de bon de connaissance en votre possession, mentionner le numéro de compte [REDACTED] pour que les frais soient chargés directement au projet.

IMPORTANT : La veille de l'envoi, veuillez téléphoner au [REDACTED] (laissez un message au besoin) ou nous écrire un courriel à [REDACTED] afin que l'on puisse récupérer les échantillons rapidement.

PROTOCOLE POUR L'ÉCHANTILLONNAGE DES COYOTES



Les tubes de sang, l'identifiant en métal, les sacs ziploc ainsi que la fiche de capture doivent tous posséder le même numéro d'identification spécifique à chaque animal

IMPORTANT : Il est impératif de porter des gants ainsi qu'un masque lors de la manipulation des carcasses et des spécimens et d'éviter de se toucher le visage et les yeux en tout temps. Nous vous demandons de porter 1 paire de gants neufs par animal pour éviter la contamination entre les spécimens. Lorsque les manipulations seront terminées, il est fortement recommandé de se laver les mains ainsi que de laver les instruments ayant servi aux manipulations et les désinfecter dans une solution d'eau de javel pendant 10 minutes.

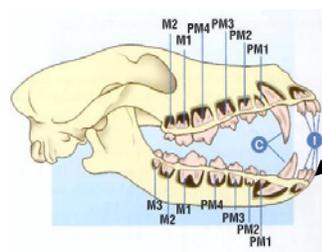
1. Fiche de capture

1. Remplir la fiche de capture soigneusement pour chaque coyote trappé. (Fournir les coordonnées GPS lorsque possible, avec un nombre maximal de décimales)
2. Déposer la fiche prénumérotée dans le petit sac ziploc prénuméroté (Dans le cas présent, il s'agit du # 300). Bien refermer le sac.



2. Échantillon de la mâchoire (*analyse des canines*)

1. À l'aide d'un couteau, sectionner les tissus sous la mâchoire inférieure.
2. Couper la mandibule entre 2 molaires du côté droit et du côté gauche à l'aide d'un cutter ou tout autre instrument.
3. S'assurer de ne pas casser ou abîmer la canine. (Préserver la dent jusqu'à la racine)
4. Mettre l'échantillon de la mâchoire dans un sac ziploc prénuméroté.
5. Rajouter dans ce sac l'identifiant en métal avec le numéro correspondant à l'animal et bien refermer le sac.



Canine



3. Échantillon de rein

(analyse de la quantité de gras du rein)

1. Mettre la carcasse sur son côté latéral droit (les pattes dirigées vers vous et la tête vers votre gauche). Ouvrir la carcasse au niveau de l'abdomen, au milieu du ventre.



2. Afin d'obtenir une meilleure visualisation des organes internes de l'abdomen, sectionner les tissus en partant de l'incision réalisée à l'étape #1 et en se dirigeant vers le dos.



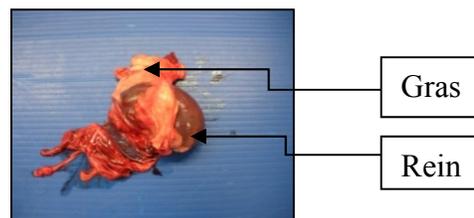
3. Repérer le rein dans le fond de la carcasse. Il a une forme ovale, une couleur foncée et se retrouve près du dos.



4. À l'aide d'un ciseau ou un couteau, sectionner les tissus et les vaisseaux sanguins reliant le rein aux autres structures dans l'abdomen afin de libérer le rein.



5. S'assurer de ne pas retirer du gras attaché au rein lors du prélèvement.



6. Mettre le rein ainsi que le gras l'entourant dans le deuxième sac ziploc prénuméroté et bien refermer le sac.



4. Rassemblement et entreposage de la fiche de capture, de l'échantillon de la mâchoire et du rein

1. Déposer le sac ziploc prénuméroté contenant la fiche de capture, le sac ziploc prénuméroté contenant la mâchoire et le sac ziploc prénuméroté contenant le rein dans le sac semi-opaque.



2. S'assurer que la fiche de capture possède le même numéro d'identification que l'identifiant en métal, et les sacs ziploc.

3. Refermer ce sac à l'aide de l'attache blanche.



4. Conserver ce sac au congélateur jusqu'à l'envoi des spécimens.



5. Échantillon de sang et entreposage (*analyse des anticorps de la bactérie*)

1. S'assurer que les gants utilisés n'ont touché à aucune autre carcasse. Changer de paire de gants dans le cas contraire.

2. Rechercher un endroit avec accumulation de sang dans la carcasse. Dans un premier temps, regardez dans l'abdomen par la fenêtre créée lors de l'excision du rein.



3. Utiliser une seringue pour prélever le sang (**IMPORTANT : 1 seringue neuve par animal pour éviter la contamination entre les échantillons**).



4. Transférer le sang de la seringue vers les 2 tubes prénumérotés. Répartir le sang dans les 2 tubes en quantité égale. S'assurer que les 2 tubes possèdent le **même numéro** d'identification (Dans ce cas-ci, il s'agit du spécimen #300).



5. Bien refermer les tubes et déposer les tubes dans la boîte prévue pour cet effet.



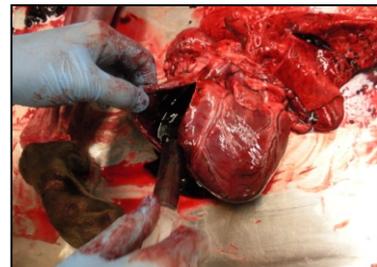
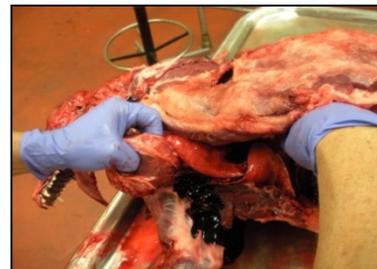
6. Conserver les échantillons au congélateur.

Note : Si vous n'observez pas de sang à l'intérieur de l'abdomen, vous devrez alors ouvrir la cage thoracique pour prélever l'échantillon sanguin. Référez-vous au protocole détaillé 'Recherche de sang au niveau de la cage thoracique'.

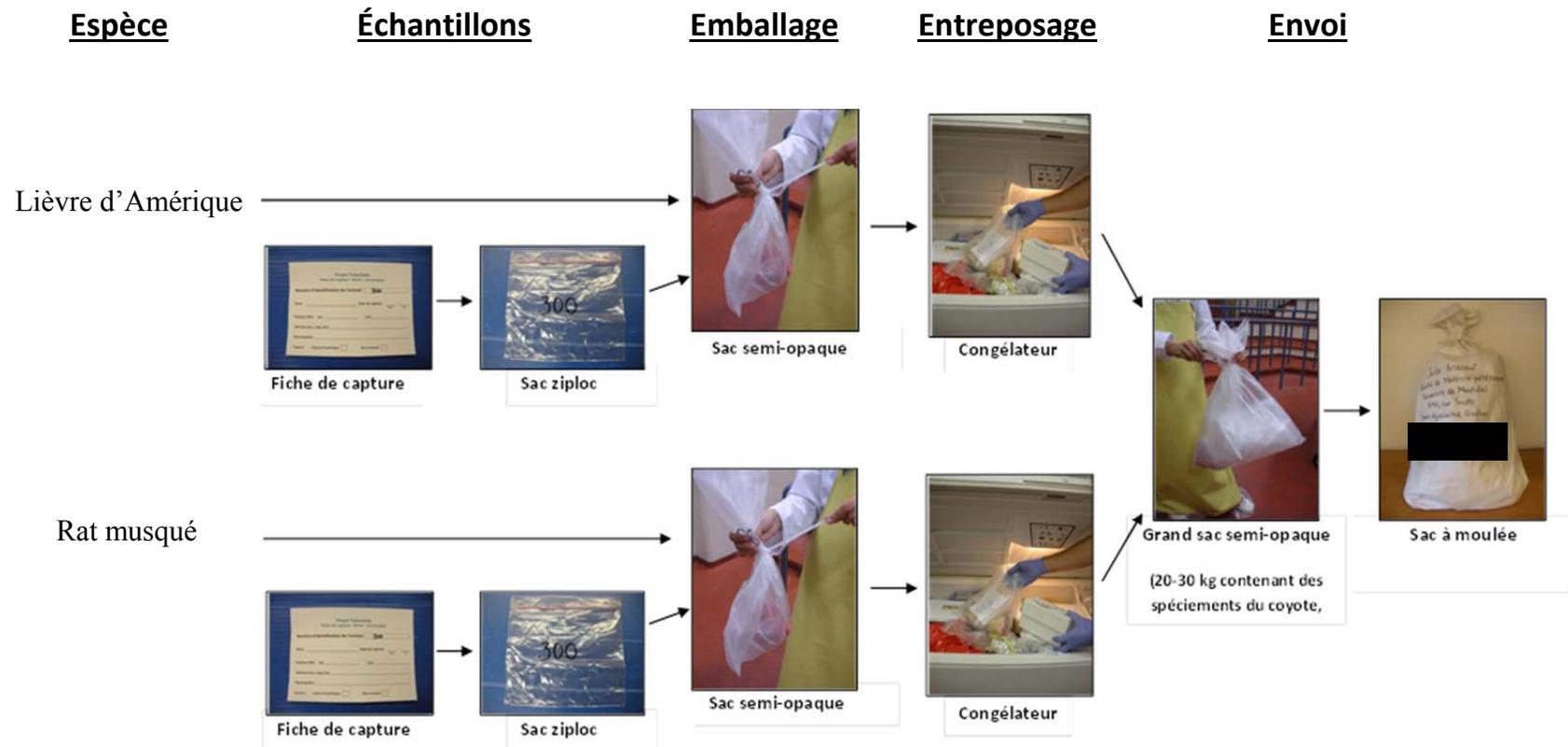


RECHERCHE DE SANG AU NIVEAU DE LA CAGE THORACIQUE

1. L'ouverture de la cage thoracique est facilitée par le retrait du membre avant.
2. Sectionner au niveau du sternum à l'aide d'un cutter ou tout autre instrument.
3. Sectionner les tissus et les muscles en suivant le contour de la dernière côte de la cage thoracique.
4. Rechercher un endroit avec accumulation de sang en partie déclive au fond de la cage thoracique.
5. S'il ne semble pas y avoir d'accumulation de sang visible, repérer le cœur et retirer-le de la cage thoracique. Effectuer une incision sur le cœur, en suivant la ligne blanche telle qu'indiquée sur la photo.
6. Prélever le sang avec la seringue et transférer le sang dans les 2 tubes prénumérotés (se référer à la section 5 'Échantillon de sang et entreposage' pour plus de détails).



PROTOCOLE POUR L'ÉCHANTILLONNAGE DES LIÈVRES ET RATS MUSQUÉS



Les sacs ziploc ainsi que la fiche de capture doivent tous posséder le même numéro d'identification spécifique à chaque animal

IMPORTANT : Il est impératif de porter des gants ainsi qu'un masque lors de la manipulation des carcasses et des spécimens et d'éviter de se toucher le visage et les yeux en tout temps. Nous vous demandons de porter 1 paire de gants neufs par animal pour éviter la contamination entre les spécimens. Lorsque les manipulations seront terminées, il est fortement recommandé de se laver les mains ainsi que de laver les instruments ayant servi aux manipulations et les désinfecter dans une solution d'eau de javel pendant 10 minutes.



1. Remplir la fiche de capture soigneusement. (Fournir les coordonnées GPS lorsque possible, avec un nombre maximal de décimales)

Projet Tularémie
Fiche de capture : lièvre - rat musqué

Numéro d'identification de l'animal: 300

Nom: PIERRE BENDAY Date de capture: 11 - 22

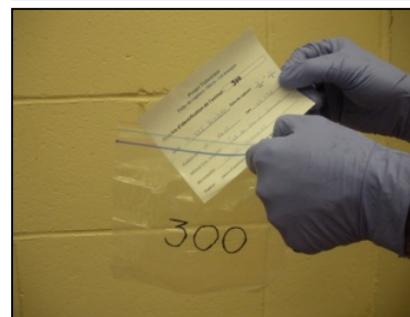
Position GPS: Lat: 14.12 Lon: -61.7117

Adresse (rue, rang, lac): Sud de Lac St-Germain

Municipalité: SAINT-BLANCHINE

Espèce: Lièvre d'amérique Rat musqué

2. Déposer la fiche prénumérotée dans le petit sac ziploc prénuméroté et bien le refermer. S'assurer que la fiche possède **le même numéro d'identification** que le sac ziploc (Dans ce cas-ci, il s'agit du # 300).



3. Déposer le sac ziploc contenant la fiche de capture ainsi que la **carcasse entière** dans le sac semi-opaque.



4. Refermer le sac à l'aide de l'attache blanche.

5. Congeler immédiatement la carcasse jusqu'à l'envoi.



FICHES DE CAPTURE POUR LES TRAPPEURS

Projet Tularémie		
Fiche de capture		
COYOTE		
Numéro d'identification de l'animal: <input style="width: 150px; height: 20px;" type="text"/>		
Nom: _____	Date de capture: ____ - ____ <small>mm jj</small>	
Position GPS: Lat: _____	Lon: _____	
Adresse (rue, rang, lac): _____		
Municipalité: _____		
<u>Sexe:</u>	Mâle <input type="checkbox"/>	Femelle <input type="checkbox"/>
<u>Échantillons fournis:</u>	Mâchoire <input type="checkbox"/>	Rein <input type="checkbox"/> Sang <input type="checkbox"/>

Projet Tularémie		
Fiche de capture		
RAT MUSQUÉ - LIÈVRE D'AMÉRIQUE		
Numéro d'identification de l'animal: <input style="width: 150px; height: 20px;" type="text"/>		
Nom: _____	Date de capture: ____ - ____ <small>mm jj</small>	
Position GPS: Lat: _____	Lon: _____	
Adresse (rue, rang, lac): _____		
Municipalité: _____		
<u>Espèce:</u>	Rat musqué <input type="checkbox"/>	Lièvre d'amérique <input type="checkbox"/>