



UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

U.F.R. Sciences Exactes et Naturelles

ECOLE DOCTORALE SCIENCES TECHNOLOGIE SANTE (547)

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : Ecotoxicologie

présentée et soutenue publiquement

par

Mélissa Palos Ladeiro

le 10 octobre 2014

Titre :

Interactions protozoaires – moule zébrée (*Dreissena polymorpha*) :

Implication en biosurveillance sanitaire et environnementale

JURY

<u>Mme Soizick Le Guyader,</u>	Directrice de Recherche, IFREMER (France)	<u>Président /</u>
Mr Bassem Allam,	Professeur, Univ. de Stony Brook (USA)	Rapporteur
Mr Aurélien Dumètre,	Maître de conférences, Univ. de Marseille (France)	Examineur
Mme Aurélie Bigot-Clivot,	Maître de conférences, Univ. de Reims (France)	Examineur
Mr Alain Geffard,	Professeur, Univ. de Reims (France)	Directeur
Mr Dominique Aubert,	Maître de conférences HDR, Univ. de Reims (France)	Directeur
Mme Isabelle Villena,	Professeur, Univ. de Reims (France)	Invitée

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier Monsieur le Pr. Alain Geffard (Directeur de l'UMR I-02 SEBIO) et Madame le Pr. Isabelle Villena (Directrice de l'EA 3800 PROTAL) pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire respectif. La recherche est d'autant plus passionnante lorsqu'elle allie des domaines presque improbables ! C'est le cas ici avec le rapprochement de l'écotoxicologie et de la parasitologie. Merci infiniment pour m'avoir impliquée dans ce beau projet ! Madame le Pr. Isabelle Villena, je vous remercie pour avoir pris le temps de vous soucier de mon travail et pour vos encouragements constants.

Merci à la région Champagne-Ardenne qui a financé cette thèse et à toutes les institutions qui ont soutenu ces travaux. Un grand merci à Estelle Odinot pour son aide administrative précieuse !

C'est un honneur pour moi d'être jugée par Monsieur le Pr. Bassem Allam. Les congrès scientifiques sont toujours enrichissants mais encore plus quand c'est l'occasion de rencontrer des personnes telles que vous ! Le seul inconvénient des congrès c'est qu'ils ne permettent pas de discuter longuement des travaux... Nous avons entamé un aperçu lors du congrès « Fish and Shellfish immunology » et j'espère que cette thèse sera l'occasion d'approfondir nos discussions.

Je tiens également à remercier Madame Soizick Le Guyader pour avoir accepté de rapporter mes travaux. Votre expérience et vos connaissances apportent une vision complémentaire et nécessaire à ce travail et permettront très certainement d'améliorer ce manuscrit.

Je remercie Monsieur le Dr. Aurélien Dumètre pour avoir accepté de faire partie du jury de thèse. Vous êtes un passionné du toxoplasme et votre présence est indispensable pour compléter le jury. Nos échanges ont toujours été constructifs et pour cela aussi je vous remercie aujourd'hui. Nul doute que votre regard va enrichir cette thèse.

Mes plus sincères remerciements sont destinés à mes encadrants de thèse qui m'ont permis, grâce à leur confiance et leur soutien, de vivre ces trois années (déjà ?!?) pleinement et sereinement. C'est un véritable honneur pour moi d'avoir pu travailler à vos côtés, d'avoir pu bénéficier de vos expériences et de vos regards. J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes.

Tout d'abord, Monsieur le Pr. Alain Geffard, merci pour votre grande disponibilité malgré vos responsabilités, mais aussi pour vos conseils, votre patience et l'attention que vous avez donné à mes travaux. Ce travail n'aurait pas vu le jour sans vos encouragements et votre expérience scientifique. Je salue ici vos qualités humaines qui m'ont permis (ainsi qu'à toute votre équipe) de grandir un peu plus chaque jour.

Merci à Monsieur le Dr. Dominique Aubert, très certainement le plus « écotoxicologue » des parasitologues ! Votre enthousiasme infailible m'a grandement encouragée tout au long de ces travaux. Nos vives discussions ont toujours été enrichissantes, passionnantes et ont plus que contribué à l'amélioration des recherches menées.

Un grand merci à Madame le Dr. Aurélie Bigot-Clivot. Qu'aurai été cette thèse sans toi ? Ta présence au quotidien m'a toujours rassurée et aidée. Tu as toujours su répondre aux interrogations même les plus insensées que j'ai pu avoir. Je n'oublierai pas nos moments de détente (mais toujours dans le plus grand sérieux !) lors des congrès et dans la vie de tous les jours où tu as souvent pris le rôle de confidente ! Très sincèrement Merci !

J'exprime ma plus grande gratitude aux personnes qui ont fait partie des comités de pilotage de cette thèse : Monsieur le Dr. Marc Bonnard, Madame le Pr. Emmanuelle Gilot-Fromont et Madame le Pr. Laure Giambérini. Ces moments d'échanges m'ont beaucoup aidé. Vos conseils et encouragements m'ont permis de garder le cap tout au long de ces années. Un clin d'œil particulier à Monsieur le Pr. Stéphane Betoulle, une grande part de ce travail est le fruit de nos discussions et de tes conseils. Merci pour ça et pour ton soutien scientifique, moral et gastronomique lors des congrès !

Mes sincères remerciements à tous les co-auteurs des différentes publications qui ont nettement permis d'améliorer et de faciliter l'écriture des travaux.

Je suis persuadée que je n'aurai pas pu mener ce travail à bien sans le soutien de l'équipe « Ecotoxicologie », non pardon, « Interactions Animal-Environnement », non pardon, « SEBIO » ! Quelle évolution ! En trois années, j'ai eu la chance de voir grandir une équipe qui le mérite amplement. Vous avez tous un petit plus qui m'est impossible de lister ici mais qui fait qu'il est bon de venir travailler avec vous ! Merci à tous les titulaires du laboratoire et en

particulier à Laurence qui s'est enfermée dans une pièce sans fenêtre pendant des heures pour m'aider dans les dissections, je sais que c'est une épreuve pour toi alors merci pour ça ! Un merci particulier à toutes les personnes du bureau qui ont partagé mon quotidien, qui m'ont fait rire, qui m'ont aidé : Laëtitia, Mohammad, Alban, Gabrielle, Lauris, Thomas (oui, il est grand notre bureau !). En remerciant SEBIO, je remercie également toutes les personnes de l'INERIS (que je connais déjà un peu !) et celles du Havre (que je connaîtrais j'espère bientôt !). Et bien évidemment, un énorme merci à Virginie Maes ! On s'est rencontrée pendant la difficile épreuve des entretiens de thèse. Ce jour-là j'ai trouvé une grande amie. Je n'imagine même pas ce parcours sans toi ! Et ça continue...

Je tiens vivement à remercier l'ensemble de l'équipe de parasitologie du CHU de Reims. Vous m'avez accueillie dès mon arrivée et m'avez fait une place dans votre équipe. Il paraît qu'il n'est pas toujours facile de travailler entre deux laboratoires... je ne sais pas ! Vous avez fait en sorte que je me sente à l'aise auprès de vous et vous m'avez formée on ne peut mieux aux techniques de filtration, extraction et qPCR.

J'adresse un clin d'œil très particulier à Jeanne Hohweyer et Emilie Dupuis ! Merci pour être là dans le travail mais aussi en dehors (même si on parle encore beaucoup de toxoplasme) !

Je n'oublie pas et je tiens également à remercier tous ceux qui contribué de près ou de pas très loin à mon engouement pour la recherche : Madame le Dr. Annabelle Deram qui, depuis quelques années déjà, me conforte dans mes choix. Je n'oublie pas le temps que vous avez pris pour m'orienter et me conseiller (surtout un fameux 21 Juin au Muséum de Paris). Les plantes terrestres et les mollusques aquatiques semblent un peu loin pour collaborer mais peuvent continuer à échanger ! Sincèrement, merci pour tout.

Messieurs les Dr. Wilfried Sanchez et Alain Devaux et Madame le Dr. Sylvie Bony et sans oublier Monsieur le Dr. Raphaël Santos. Je vous suis entièrement reconnaissante pour tout ce que vous avez pu faire pour moi. Sans vous, je n'aurai certainement pas eu les capacités de mener à bien une thèse !

J'adresse mes profonds remerciements aux deux personnes que j'ai pu encadrer pendant la thèse : Alexandra Lepoutre et Younès Hani qui m'ont formée sûrement davantage que la réciproque ! Très bonne continuation à vous !

Et puisque la stabilité professionnelle ne serait rien sans l'épanouissement personnel...

Je remercie du fond du cœur :

Mes Amis avec un grand A, ceux qui comprennent que la distance et le temps qui passe n'entravent en rien nos relations : mon binôme de toujours Flo, Mélanie, Damien, Raphaël, mon Jérém', Constance, Geo, Alex, Pauline, Arnaud... Merci de m'avoir toujours encouragée dans mes choix, respecter mes choix et d'être encore là après tout ce temps !

Ma famille qui, même de loin, me fait me sentir plus forte, (merci aux technologies qui permettent de rapprocher les frontières et les cœurs !)

A mes chères cousines, Nathalie et ma « Chouchou » Ana-Sofia qui m'ont soutenue à chaque moment malgré la distance !

A mes parents Ana-Maria et Joaquim, qui m'ont fait assez confiance pour me laisser partir vivre une aventure exceptionnelle même si cela n'a pas toujours été facile. 'On ne peut donner que deux choses à son enfant : des racines et des ailes'. Pour cela, un grand MERCI.

A mon frère Daniel et ma belle-sœur Nathalie qui ont fait plus que me soutenir toutes ces années. Vous êtes vraiment des exemples pour moi.

A mes petits Amours, Elisio, Tiago et Lucas sans qui la vie serait nettement moins jolie !

Auprès de vous, le verbe « se ressourcer » prend tout son sens.

Ma belle-famille, qui m'a accueillie dès le 1^{er} jour et qui prends toujours du temps pour moi (même si ce n'est pas aussi souvent qu'on le souhaiterait) !

Enfin, comment finir cette partie sans citer celui qui est à l'origine de tout ça. Celui qui m'a poussée à me lancer dans le monde presque inconnu de la recherche parce qu'il avait vu, avant tout le monde, cette étincelle dans mes yeux pendant les cours d'Ecotoxicologie. Celui qui m'a accompagnée et soutenue (et supportée !) dans les bons moments, consolée et rassurée (et supportée !) dans les moins bons. La langue française est riche mais pas assez pour décrire tout ce que je te dois...

Si j'en suis là aujourd'hui c'est grâce au destin.

Mon destin s'appelle Mehdi.

« Choisis le métier que tu veux. Peu importe. L'important est que tu te lèves tous les matins avec le sourire et l'envie d'y aller »

Joaquim Palos Ladeiro

Tu ne te souviens très certainement pas du jour où tu m'as dit ces mots, mais moi, je ne l'oublierai jamais. C'est certainement ce qui m'a donné la force d'y arriver. Saches que, tous les matins quand je vais travailler avec le sourire, je pense à toi...

Résumé

L'évaluation de la contamination des cours d'eau par les agents parasites protozoaires est fondamentale puisqu'on estime qu'une personne sur deux dans le monde est ou a été infectée par une zoonose d'origine parasitaire. Les trois principaux parasites responsables d'épidémies hydriques sont *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* et *Toxoplasma gondii*. Actuellement, seule la matrice eau est utilisée pour analyser la présence de ces parasites dans l'environnement aquatique. Peu reproductible et chronophage, cette méthode ne permet pas de mettre en place une surveillance de routine. Le projet de thèse propose l'utilisation de la moule zébrée, *Dreissena polymorpha*, comme un nouvel outil complémentaire pour évaluer la qualité biologique des milieux d'eau douce. Au travers d'expérimentations combinant différentes approches *in vivo*, *ex vivo* et *in situ*, le potentiel de la dreissène à accumuler les parasites protozoaires ainsi que leurs cinétiques d'accumulation dans les tissus ont été déterminés. Utilisée comme espèce sentinelle des contaminations chimiques, l'effet d'un stress biologique dû aux protozoaires a été évalué au laboratoire sur les cellules clefs de l'immunité des bivalves, les hémocytes. Ainsi, le projet permet de placer l'organisme *Dreissena polymorpha* dans une double stratégie de biosurveillance : une biosurveillance sanitaire liée à l'utilisation de la dreissène en tant que vecteur de parasites considérés comme enjeux de santé publique et une biosurveillance environnementale liée à la compréhension des facteurs de confusion avec les réponses biologiques utilisées comme biomarqueurs.

Mots clefs : *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis*, *Dreissena polymorpha*, interactions, biosurveillance

Abstract

Assessment of the water biological contamination by protozoa is crucial since one in two person worldwide is or has been infected by a parasitic zoonosis. The main protozoa responsible of waterborne outbreaks are *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* and *Toxoplasma gondii*. Currently, protozoa detection is only based on water analysis. Irrelevant and time consuming, water analysis do not permit accurate biomonitoring. These project aims to use the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*, as a new complementary tool for biological quality analysis of freshwater. Through *in vivo*, *ex vivo* and *in situ* experiments, we determine the utility of zebra mussel for protozoa accumulation and their accumulation pattern within mussel tissues. Already use as a sentinel specie for chemical contamination, biological stress caused by protozoa has been determined in laboratory experiments on key cells of bivalve immunity, the hemocytes. Hence, *Dreissena polymorpha* could be involved in a twofold biomonitoring tactics: sanitary biomonitoring related to the use of zebra mussel as vector to protozoa with public health issue and environmental biomonitoring on understanding of the confounding factors in biological responses used as biomarkers.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis*, *Dreissena polymorpha*, interactions, biomonitoring

Table des matières

Table des matières	i
Liste des figures (Manuscrit)	vii
Liste des figures (Articles)	xi
Liste des tableaux (Manuscrit)	xiii
Liste des tableaux (Articles)	xiv
Avant-propos	1
Introduction générale.....	3
Etat de l'art.....	10
1. Présence des protozoaires dans le milieu aquatique.....	11
Article 1: Protozoa interaction with aquatic invertebrate: interest for watercourses biomonitoring.	13
2. Méthodes de détection des protozoaires dans les matrices 'simples' (de type eau) et 'complexes' (de type mollusques bivalves)	42
2.1. Détection des protozoaires dans les matrices simples de type <i>eau</i>	42
2.1.1. Techniques de concentration des protozoaires issues de la méthode 1623.1	43
2.1.1.a. La filtration sur cartouche.....	43
2.1.1.b. La filtration sur filtres.....	43
2.1.1.c. Centrifugation	43
2.1.2. Technique de purification des protozoaires issues de la méthode 1623.1 : La séparation immunomagnétique (IMS).....	44

2.1.3.	Technique de détection des protozoaires issue de la méthode 1623.1 -----	44
2.2.	Détection des protozoaires dans les matrices complexes de type <i>mollusques bivalves</i> -----	47
2.2.1.	Concentration -----	47
2.2.2.	Purification -----	48
2.2.3.	Détection -----	48
	Objectifs scientifiques de la thèse-----	50
	Matériels biologiques et Techniques mises en œuvre -----	51
1.	Les modèles biologiques -----	53
1.1.	Les protozoaires-----	53
1.1.1.	<i>Cryptosporidium</i> spp.-----	53
1.1.1.a.	Classification -----	53
1.1.1.b.	Cycle parasitaire-----	53
1.1.1.c.	La cryptosporidiose -----	54
1.1.2.	<i>Giardia</i> spp.-----	55
1.1.2.a.	Classification -----	55
1.1.2.b.	Cycle parasitaire-----	55
1.1.2.c.	La giardiase-----	56
1.1.3.	<i>Toxoplasma gondii</i> -----	57
1.1.3.a.	Classification -----	57
1.1.3.b.	Cycle parasitaire-----	57
1.1.3.c.	La toxoplasmose -----	58

1.2.	<i>Dreissena polymorpha</i> -----	59
1.2.1.	Biologie et écologie -----	59
1.2.2.	Utilisation en surveillance des milieux -----	60
2.	Provenance des organismes et conditions générales des expérimentations -----	61
2.1.	Provenance des organismes -----	61
2.1.1.	<i>Cryptosporidium parvum</i> -----	61
2.1.2.	<i>Giardia duodenalis</i> -----	62
2.1.3.	<i>Toxoplasma gondii</i> -----	62
2.1.4.	<i>Dreissena polymorpha</i> -----	62
2.2.	Conditions d'expérimentations -----	62
2.2.1.	Expérimentations en conditions contrôlées de laboratoire -----	63
2.2.1.a.	Expérimentations <i>in vivo</i> -----	63
2.2.1.b.	Expérimentations <i>ex vivo</i> -----	64
2.2.2.	Expérimentations en conditions <i>in situ</i> -----	64
2.3.	Analyses des protozoaires et des hémocytes de dreissènes par cytométrie en flux-- -----	65
2.3.1.	Mortalité -----	65
2.3.2.	Capacité de phagocytose -----	66
2.4.	Traitement des tissus et détection des protozoaires -----	66
2.4.1.	Digestion des tissus de dreissènes -----	66
2.4.2.	Détection des protozoaires -----	67
2.4.2.a.	Lyse des oocystes/kystes -----	67
2.4.2.b.	Extraction de l'ADN -----	67

2.4.2.c. PCR en temps réel-----	67
3. Traitements statistiques des données-----	70
Chapitre 1 : Optimisation de la détection des protozoaires <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Giardia duodenalis</i> et <i>Toxoplasma gondii</i> en conditions simple et complexe. -----	
1. Evaluation de différents traitements de lyse sur les oocystes de <i>Toxoplasma gondii</i> : approches par cytométrie en flux et biologie moléculaire.-----	75
Article 2: Evaluation of lysis procedures on <i>Toxoplasma gondii</i> oocysts: approach by flow cytometry and qPCR method.-----	79
2. Détermination d'une méthode commune de purification pour la détection des trois protozoaires à partir de la matrice dreissène.-----	100
2.1. Introduction :-----	100
2.2. Matériels et Méthodes-----	101
2.2.1. Conditions d'expositions des dreissènes aux protozoaires -----	101
2.2.2. Traitement des échantillons-----	102
2.2.2.a. Concentration et purification -----	102
2.2.2.b. Détection des protozoaires-----	103
2.3. Résultats -----	104
2.4. Discussion -----	105
Chapitre 2 : Utilisation de la dreissène comme matrice pour la détermination de la contamination biologique des milieux aquatiques <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Giardia duodenalis</i> et <i>Toxoplasma gondii</i> .-----	
	109

1. Expositions simultanées <i>versus</i> simples des dreissènes aux trois protozoaires d'intérêts	113
---	-----

Article 3: Bioaccumulation of human waterborne protozoa by zebra mussel (<i>Dreissena polymorpha</i>): Interest for water biomonitoring.	115
---	-----

2. Détermination de la cinétique d'accumulation de <i>Toxoplasma gondii</i> par les dreissènes et de l'efficacité de la méthode de détection.	137
---	-----

Article 4: Assessment of <i>Toxoplasma gondii</i> levels in zebra mussel (<i>Dreissena polymorpha</i>) by real time qPCR: an organotropism study.	139
--	-----

3. La dreissène comme indicateur de contamination biologique des masses d'eau. Approche <i>in situ</i> .	161
--	-----

3.1. Introduction	161
-------------------	-----

3.2. Matériels et Méthodes	163
----------------------------	-----

3.3. Résultats	165
----------------	-----

3.4. Discussion	165
-----------------	-----

Chapitre 3 : Etudes des réponses cellulaires et immunologiques des hémocytes de la moule zébrée lors d'expositions <i>ex vivo</i> à <i>Cryptosporidium parvum</i> et <i>Toxoplasma gondii</i> .	171
---	-----

1. Introduction	175
-----------------	-----

2. Matériels et Méthodes	179
--------------------------	-----

2.1. Préparation des échantillons	179
-----------------------------------	-----

2.1.1. Les hémocytes	179
----------------------	-----

2.1.2. <i>Toxoplasma gondii</i>	182
---------------------------------	-----

2.1.3. <i>Cryptosporidium parvum</i>	183
--------------------------------------	-----

2.2. Incubations	184
------------------	-----

2.3.	Détermination de la mortalité cellulaire -----	184
2.4.	Mesure de l'activité de phagocytose des hémocytes -----	185
3.	Résultats -----	188
3.1.	Interactions <i>Toxoplasma gondii</i> – hémocytes -----	188
3.2.	Interactions <i>Cryptosporidium parvum</i> – hémocytes -----	192
3.2.1.	Mortalité -----	192
3.2.2.	Capacité de phagocytose -----	193
4.	Discussion -----	196
	Discussion générale -----	203
	Conclusions et perspectives -----	212
	Communications personnelles -----	216
	Bibliographie -----	218

Liste des figures (Manuscrit)

Figure 1 : Les différentes étapes de la technique de séparation immunomagnétique (IMS).	44
Figure 2 : Les différentes étapes du cycle parasitaire de <i>Cryptosporidium</i> spp. (d'après Smith et al. 2005)	54
Figure 3 : Les différentes étapes du cycle de vie de <i>Giardia</i> spp. (d'après Ankarklev et al. 2010)	56
Figure 4 : Les différentes étapes du cycle de vie de <i>T. gondii</i> (d'après Fergusson 2009)	58
Figure 5 : La moule d'eau douce ou moule zébrée (<i>Dreissena polymorpha</i>).....	60
Figure 6 : Distribution de la moule zébrée en Europe. En vert population d'origine, en rouge population introduite (d'après daisie : delivering alien invasive species inventories for Europe).	61
Figure 7 : Les différentes phases de la technique de qPCR qui permet la détermination du Ct d'un échantillon positif pour l'ADN cible.	68
Figure 8 : Plan expérimental pour la validation d'une méthode commune pour la détection des protozoaires à partir des tissus de dreissènes.	102
Figure 9 : Ct moyen (et écart-types) obtenus après 1 semaine d'exposition simultanée des dreissènes aux trois protozoaires à raison de 560 oocystes/kystes par dreissène et par jour. L'étape de purification est représentée par une digestion enzymatique à la trypsine seule (histogrammes noirs) ou une délipidation à l'éther suivie une digestion enzymatique (histogramme gris) N = 2 pools de 6 dreissènes.....	104
Figure 10 : Schéma de fonctionnement d'une station d'épuration des eaux usées à boues activées (source : www.irstea.fr).....	162
Figure 11 : Sites d'encagement des dreissènes en amont et en aval des stations d'épurations des eaux (STEP) des villes de Creil et Soissons pour la région de Picardie, et Epernay, Reims et Charleville-Mézières en Champagne-Ardenne. Des dreissènes ont également été encagées sur le site de Monthermé dans les Ardennes. Cinq cours d'eau sont ainsi analysés : l'Oise, l'Aisne, la Marne, la Vesle et la Meuse.	164
Figure 12 : Schéma des processus de phagocytose et d'encapsulation modifié d'après Donaghy et al. 2009. La phagocytose permet la destruction intracellulaire des agents microbiens de petite taille par les hémocytes. La première étape est la phase de reconnaissance et d'adhésion des microorganismes par les cellules (1), puis l'internalisation dans la cellule à l'aide des pseudopodes (2) à l'intérieur du phagosome (3) et enfin la destruction du microorganisme grâce aux lysosomes et à la production d'ERO au sein du	

phagolysosome (4). L'encapsulation permet la destruction extracellulaire des protozoaires de grande taille après la sécrétion de peptides antimicrobiens (2') éventuellement par l'action de plusieurs hémocytes (3').....178

Figure 13 : Diversité et mobilité des hémocytes de dreissènes observés au microscope à lumière inversée. Photo a prise directement après le prélèvement d'hémolymph et la photo b correspond au même focus 30 minute après la première. Observation de l'émission de pseudopodes (tête de flèche).180

Figure 14 : Visualisation des hémocytes de dreissènes au cytomètre : les cellules sont distinguées des débris présents dans l'échantillon, puis une région (ou « gate ») est créée afin de centrer l'acquisition des résultats sur la région « Hémocytes ». Celle-ci présente deux sous populations, H (en vert) et G (en violet) qui diffèrent selon leur taille et leur complexité (a). Dépourvus de marquage, les deux sous populations présentent un niveau de fluorescence identique (b : histogramme de fluorescence FL2 et c : dot plot représentant la fluorescence en fonction de la taille des cellules).181

Figure 15 : Visualisation des oocystes de *T. gondii* au cytomètre : la région '*T. gondii*' permet de supprimer les débris de l'échantillon et de focaliser l'acquisition des résultats au sein de cette région (a). L'autofluorescence des oocystes est détectée en FL2 (b). Le marquage à l'IP permet de distinguer deux pics de fluorescence (c) indiquant qu'une partie des oocystes de l'échantillon possèdent des parois altérées (sporocystes et/ou oocystes).....182

Figure 16 : Visualisation des oocystes de *C. parvum* au cytomètre : la région '*C. parvum*' permet de supprimer les débris de l'échantillon et de focaliser l'acquisition des résultats au sein de cette région (a). L'autofluorescence des oocystes est détectée en FL1 (b). Le marquage direct avec un anticorps-FITC permet d'affiner la détection des oocystes marqués au cytomètre (c).183

Figure 17 : Détermination de la mortalité cellulaire au cytomètre en flux : Après un marquage à l'iodure de propidium (IP), les cellules mortes ayant intégrées l'IP présentent une fluorescence plus importante que les cellules viables observables sur un histogramme (b) ou sur un dot plot fluorescence/taille (c).185

Figure 18 : Mesure de l'activité de phagocytose des hémocytes de la région G au cytomètre en flux : l'acquisition des résultats est centrée sur la région G qui représente des cellules de grande taille et de forte complexité (a). Après une exposition avec des particules fluorescentes telles que des billes de latex, les cellules ayant phagocyté les billes présentent une fluorescence plus importante que l'autofluorescence des cellules observable sur un histogramme (b). La mesure de l'activité de phagocytose peut être définie à travers les pics générés sur l'histogramme qui représentent le nombre de phagocytes dans la population totale de la région G (c).....186

Figure 19 : Test de validation de l'internalisation des particules fluorescentes avec le bleu trypan (BT) : sans BT dans le milieu, le signal émis par les oocystes-FITC sera mesuré en cytométrie en flux même si le protozoaire n'est pas internalisé dans la cellule. L'ajout de BT dans le milieu va permettre de supprimer la liaison antigène-anticorps lorsque ceux-ci sont libres dans le milieu. Le signal de fluorescence sera alors inhibé et ne pourra pas être mesuré en cytométrie.....	187
Figure 20 : Pourcentage d'hémocytes issus des deux sous-populations H (hyalinocytes) ou G (granulocytes) en conditions témoin (0, 1 et 3 h) ou après une incubation de 1 et 3 h avec des oocystes de <i>T. gondii</i> : ratios oocystes-cellules de 1:4, 1:2 ou 1:1 (N = 3 pools de 6 hémolymphes).....	188
Figure 21 : Interactions entre les oocystes de <i>T. gondii</i> et les hémocytes de dreissènes. Les dots plots représentent les deux régions définies pour les oocystes et les hémocytes (A-F) et les histogrammes correspondants représentent la mortalité cellulaire mesurée (a-f) après exposition à l'obscurité et à 16 °C. Les expositions ont été réalisées avec des concentrations oocyste:cellule de 1:4 (A,a et D, d), 1:2 (B, b et E, e) et 1:1 (C, c et F, f) et la mortalité a été mesurée après 1 h (a, b, c) et 3 h (d, e, et f) d'exposition.	190
Figure 22 : Mortalité des hémocytes mesurée après 15 min d'incubation avec de l'iodure de propidium (IP). La mesure a été effectuée uniquement sur la population G (granulocytes) en condition témoin (0, 1, 2 et 4 h) ou après 1, 2 et 4 h d'incubation avec des ratios oocystes-cellules de 10:1, 2:1 et 1:1 (N = 3 pools de 6 hémolymphes).....	192
Figure 23 : Pourcentage d'hémocytes issus de la population G (granulocytes) ayant phagocyté des billes de latex fluorescentes ou des oocystes de <i>C. parvum</i> marqués avec un anticorps-FITC après 4 h d'incubation à un ratio billes:cellule ou <i>C. parvum</i> -FITC:cellule de 5:1. * représente une différence significative entre les conditions (N = 3 pools de 6 hémolymphes). Mann-Whitney <i>U</i> -test, $p < 0,05$	193
Figure 24 : Validation du test de phagocytose avec le bleu trypan. Histogramme a, b et c représentent l'activité de phagocytose totale des granulocytes respectivement pour les trois pools, après une exposition de 4 h avec des oocystes de <i>C. parvum</i> -FITC (ratio 5 oocystes-FITC pour 1 hémocyte) avant l'incubation avec le bleu trypan. d, e et f représentent les histogrammes correspondant respectivement avec a, b et c après l'incubation de 10 minutes avec le bleu trypan. FL1-A : émission dans le vert.....	194
Figure 25 : Pourcentage de granulocytes ayant phagocyté des oocystes de <i>C. parvum</i> marqués avec un anticorps FITC après 4 h d'incubation à des ratios oocyste-FITC:cellule de 1:1, 5:1 et 10:1. Les lettres différentes représentent une différence significative entre les conditions (N = 3 pools de 6 hémolymphes). Mann-Whitney <i>U</i> -test, $p < 0,05$	195

Figure 26 : Place de la dreissène au sein de la double stratégie de biosurveillance des milieux : une biosurveillance sanitaire liée à l'accumulation des protozoaires et à son possible rôle dans l'épuration des masses d'eaux et une biosurveillance environnementale liée à la compréhension des facteurs de confusion sur la réponse et l'interprétation des biomarqueurs en écotoxicologie. Les flèches rouges correspondent aux parties abordées dans la thèse et les flèches noires au contexte. Pour la partie des travaux de thèse, les flèches pleines représentent les données en cours d'acquisition et les flèches en pointillées correspondent aux interrogations présentées en perspectives.....211

Liste des figures (Articles)

Fig. 1 : Experimental conditions for FCM and qPCR analysis (runs 1 and 2). CsCl: cesium chloride gradient; Cycles: freeze-thaw cycles; US: ultrasonic treatment; PK: proteinase K; NaOCl: sodium hypochlorite.	83
Fig. 2 : FSC/FL3 (A) and SSC/FL3 (B) dot plots of oocysts measured by flow cytometry after 15 min incubation with PI. Gate 1: untreated oocysts (condition 1); Gate 2, CsCl-purified oocysts (condition 2); Gate 3, oocysts subjected to freeze-thaw cycles and 1 min of sonication (condition 3.1).	87
Fig. 3 : Merge of fluorescence histograms of oocysts obtained by FCM after 15 min incubation with PI. M1: untreated oocysts (condition 1); M2, CsCl-purified oocysts (condition 2); M3, oocysts subjected to freeze-thaw cycles and 1 min of sonication (condition 3.1).	88
Fig. 4 : Ct mean (and standard deviation) obtained by TaqMan real-time qPCR on DNA extracted from <i>T. gondii</i> oocysts subjected to freeze-thaw cycle and sonication (US) treatment (condition 3) or sonication alone (condition 4). * Significant difference between conditions (N = 3 per condition, Mann-Whitney <i>U</i> -test, $p < 0.05$).	89
Fig. 5 : Ct mean (and standard deviation) obtained after TaqMan real-time qPCR on DNA extracted from <i>T. gondii</i> oocysts subjected to freeze-thaw cycle and sonication (US) (conditions 3), freeze-thaw cycle and proteinase K digestion without (condition 5) and with beads (condition 5.1), or chemical and enzymatic treatments (condition 6). * Significant difference between conditions (N = 4 per condition, Mann-Whitney <i>U</i> -test, $p < 0.05$).	90
Fig. 6 : Mean number (and standard deviation) of (oo)cysts detected in zebra mussel tissue after 7 days of exposure in laboratory experiment (N = 4 pools of 3 mussels) in a simultaneous exposure to 560 (oo)cysts per mussel and per day (logarithmic scale). * represent significant differences with control. Mann-Whitney <i>U</i> -test $p < 0.05$	124
Fig. 7 : Mean number (and standard deviation) of (oo)cysts detected in <i>Dreissena polymorpha</i> tissue after 7 days of exposure in laboratory experiment (N = 4 pools of 3 mussels) in single exposures to 20 and 200 (oo)cysts per mussel and per day (logarithmic scale). * represent significant differences with control. Mann-Whitney <i>U</i> -test $p < 0.05$	126
Fig. 8 : Mean number (and standard deviation) of oocysts detected in mussel organ (muscle, gills and digestive gland) after 1, 3 and 7 days of exposure to 200 <i>T. gondii</i> oocysts per mussel and per day (logarithmic scale). Different letters represent significant differences between number of oocysts detected with Mann-Whitney <i>U</i> -test $p < 0.05$ (N=4 pools of 3 organs). .	127

Fig. 9: Detection level protocol: After dissection of zebra mussel' tissues, spiked experiments were realized to each samples (N = 6 *per* conditions) with 100 *T. gondii* oocysts (group 1), 500 oocysts (group 2) or 1,000 oocysts (group 3). Samples purification and detection by real time PCR were realized to determine the DNA level by organ.....144

Fig. 10 : Mean numbers and standard deviations (N = 4 pools of 3) of 1/Ct values determined *per* mussel after 21 days of exposure to 1,000 protozoa *per* mussel and *per* day and 14 days of depuration in clean water. Letters represent significant differences between exposure times. Mann-Whitney U-test $p < 0.05$152

Liste des tableaux (Manuscrit)

Tableau 1 : Amorces et sondes utilisées pour la détection des protozoaires dans les tissus de <i>D. polymorpha</i> avec la technique de qPCR Taqman en temps réel.	69
Tableau 2 : Les différentes conditions d'expérimentations présentées dans le chapitre 1.	74
Tableau 3 : Les différentes conditions d'expérimentations présentées dans le chapitre 2.	112
Tableau 4 : Nombre de pool positifs sur nombre de pool analysés (N = 6 pools de 3 dreissènes entières) après détection de l'ADN des parasites dans les tissus de dreissènes en qPCR. Les dreissènes ont été encagées 1 mois en amont et en aval de 5 STEP des régions de Picardie et de Champagne-Ardenne ainsi qu'au niveau du site de Monthermé dans les Ardennes de septembre à octobre 2013 (ND = non détecté).	165
Tableau 5 : Les différentes conditions d'expérimentations présentées dans le chapitre 3.	174
Tableau 6 : Mortalité des hémocytes totaux, hyalinocytes et granulocytes, mesurée après 15 min d'incubation avec de l'iodure de propidium (IP). La mesure a été effectuée en condition témoin ou après 1 et 3 h d'incubations avec des oocystes de <i>T. gondii</i> à différentes concentrations, 1:4, 1:2 et 1:1. * représente une différence significative entre les conditions (N = 3 pool de 6 hémolymphes). Mann-Whitney U-test, $p < 0,05$	191

Liste des tableaux (Articles)

Table 1 : Protozoa prevalence in different watercourses	22
Table 2 : Protozoa prevalence in aquatic invertebrates, <i>in situ</i> experimentations	23
Table 3 : Protozoa prevalence in aquatic invertebrates, <i>in situ</i> experimentations (suite)	24
Table 4 : Protozoa prevalence in aquatic invertebrates, laboratory experimentations (DD = depuration days; PI = post-inoculation).....	25
Table 5 : Protozoa prevalence in aquatic invertebrates, laboratory experimentations (DD = depuration days; PI = post-inoculation) (suite).....	26
Table 6 : Primers and probes used for protozoan detection in tissues of <i>D. polymorpha</i> by Taqman real time qPCR.	123
Table 7 : Number of pools where protozoan DNA was detected / total of pools analysed for simultaneous and single exposures (1 pool = 3 mussels or organs)	125
Table 8 : Number of pools where <i>T. gondii</i> DNA was detected / total of pools analysed after single exposure experiments to 200 <i>T. gondii</i> oocysts per mussel and per day.	127
Table 9 : Mean Ct values and standard deviations (N = 6) determined after spiking 100, 500 and 1,000 <i>T. gondii</i> oocysts in zebra mussel tissues (mantle, muscle, gills, hemolymph, digestive gland and the remaining tissues) or in PBS (positive control). Significant differences with the positive control, Mann-Whitney U-test, * p < 0.05; ** p < 0.01	149
Table 10 : Mean Ct values and standard deviations (N = 4 pools of 3) determined in zebra mussel organs after 21 days of <i>in vivo</i> exposure to 1,000 oocysts per mussel and per day and 14 days of depuration in clean water. * Negative controls were ND (Not detected) throughout the experiment.....	153

Avant-propos

Le projet de thèse présenté tout au long de ce manuscrit est l'objet d'une collaboration entre deux laboratoires de l'université de Reims Champagne-Ardenne : l'UMR I-02 SEBIO (Stress Environnementaux et BIOsurveillance des milieux aquatiques, Directeur : Pr Alain Geffard) et l'EA 3800 PROTAL (PROtozooses Transmises par l'ALimentation (cryptosporidiose, giardiose et toxoplasmose) : mode de contamination et pathogénie, Directrice : Pr Isabelle Villena).

Le rapprochement de ces deux équipes a permis la création d'un projet original et novateur à l'interface de l'écotoxicologie aquatique et la parasitologie. Le projet INTERBIO (essaimage de la région Champagne-Ardenne) vise à utiliser les capacités d'accumulation d'un organisme modèle en écotoxicologie, la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*), comme un nouvel outil pour la mise en évidence de parasites majeurs en santé publique, *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. et *Toxoplasma gondii* retrouvés dans le milieu aquatique sous forme d'oocystes/kystes.

Les recherches ont bénéficié du soutien du programme interdisciplinaire de recherche sur l'environnement de la Seine (PIREN-Seine) et du projet IPAD (Interactions PARasites-Dreissène : implication en biosurveillance, CNRS-INSU programme EC2CO) qui avaient pour but de définir les interactions entre les différents organismes puisque très peu d'informations étaient disponibles. En effet, si la bioaccumulation de *C. parvum* et *G. duodenalis* était rapportée chez la dreissène, aucune donnée sur les éventuels effets physiologiques de leur présence sur les moules d'eau douce n'était décrite dans la littérature. En ce qui concerne *T. gondii*, sa présence est connue dans le milieu aquatique et son interaction avec les organismes filtreurs est (peu) détaillée en milieu marin où sa transmission aux mammifères marins *via* les mollusques est suspectée.

La mise au point des protocoles d'extraction et de détection de l'ADN des protozoaires utilisés dans ce manuscrit a été réalisée par le centre technique ACTALIA (Villers-Bocage, France) lors du projet Protofood (ANR-09-ALIA-009-01) intitulé « Contamination des mollusques bivalves et des végétaux par les protozoaires *Cryptosporidium*, *Giardia* et *Toxoplasma* : détection, persistance et impact des procédés ».

Les acquis méthodologiques et scientifiques obtenus par le projet de thèse a permis d'élargir les travaux à d'autres organismes bivalves : les huîtres *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis* et à la moule bleue *Mytilus edulis* grâce aux travaux de Younès Hani lors de son stage de master 2 effectué de décembre 2013 à juin 2014 (encadrement PROTAL et SEBIO).

De plus, les résultats obtenus ont permis aux deux laboratoires de structurer de nouveaux projets notamment au niveau national suite à l'appel d'offre santé-environnement de l'ANSES (projet INQUASAN, en cours d'évaluation) et un projet en cours de structuration pour l'AO générique de l'ANR (concernant le continuum dreissène-moule bleue).

Introduction générale

La contamination biologique des cours d'eau est une préoccupation continue des autorités de santé publique. Durant le siècle dernier, des efforts considérables ont été réalisés pour évaluer et gérer les risques liés aux matières fécales, d'abord bactériologiques puis, plus récemment, virologiques (principalement dus aux rota- et norovirus) et enfin parasitologiques (Bridle 2013). Ces dernières années, le risque lié aux protozoaires émerge au sein de la communauté scientifique. La période 2004-2010 recense près de 200 épidémies liées aux protozoaires transmis par l'eau au niveau mondial. Parmi elles, les deux principaux agents de transmission sont *Cryptosporidium parvum* pour plus de 60% des cas et *Giardia duodenalis* dans 35% des cas. Un autre protozoaire, *Toxoplasma gondii*, est de plus en plus étudié du fait des nombreux cas de contamination hydrique liées aux oocystes de *T. gondii* (Dubey 2004 ; Jones et Dubey, 2010 ; Karanis et al. 2013) et de ses répercussions aussi bien sociétales qu'économiques (Jones et al. 2014). Ces protozoaires ont été retrouvés aussi bien dans les eaux douces, saumâtres et salées, de surface et souterraines mais également dans l'eau de boisson en ce qui concerne *C. parvum* (Baldurson et Karanis, 2011). Les coûts engendrés par les hospitalisations dues aux pathologies provoquées par ces trois protozoaires aux Etats-Unis se chiffrent en centaines de millions de dollars par an (Collier et al. 2012) et imposent de renforcer la surveillance des milieux aquatiques pour prévenir et limiter les risques pour les populations.

Un intérêt grandissant pour l'utilisation des invertébrés aquatiques, et notamment les organismes filtreurs, pour mettre en évidence les protozoaires dans l'eau apparait depuis quelques années dans la littérature (Robertson 2007 ; Mazzillo et al. 2013 ; Willis et al. 2013 ; Reboredo-Fernández et al. 2014). A l'instar des contaminations chimiques, les bivalves peuvent souligner une contamination biologique des cours d'eau à risque pour les populations sensibles (Miller et al. 2005 ; Lucy et al. 2010 ; Zhang et al. 2014). Certains d'entre eux sont déjà utilisés dans les études de suivi des sources microbiennes (*source tracking*), principalement fécales, des cours d'eau (Graczyk et Conn, 2008). En effet, la présence d'entérocoques a été révélée chez la moule bleue, *Mytilus edulis*, alors que les prélèvements

d'eau s'avéraient négatifs ce qui confirme la capacité de bioaccumulation des filtreurs (Roslev et al. 2009). De ce fait, les organismes vecteurs peuvent également représenter une aide significative pour comprendre la dissémination des pathogènes dans l'environnement aquatique. Néanmoins, la recherche des protozoaires *C. parvum* et *G. duodenalis*, au sein des tissus de mollusques bivalves est généralement effectuée sur des organismes d'intérêt commercial, tels que les coquillages côtiers, dans un but sanitaire de protection des populations *via* l'alimentation. Très peu de données sont actuellement disponibles concernant la présence du toxoplasme dans le milieu aquatique et sur l'accumulation de *T. gondii* par les bivalves. De plus, les recherches actuelles se limitent principalement sur la présence des protozoaires dans les tissus (organismes entiers et/ou organes) et sur l'état de viabilité des protozoaires. Elles ne prennent pas en compte les effets d'une contamination par les protozoaires sur la physiologie des organismes hôtes.

Afin d'utiliser les mollusques bivalves comme un outil de biosurveillance biologique des milieux aquatiques, il est nécessaire d'approfondir les connaissances actuelles afin de répondre à certaines interrogations laissées en suspens :

- Au niveau méthodologique, alors qu'il existe une technique standardisée pour la concentration des protozoaires *Cryptosporidium* et *Giardia* dans l'eau (matrice dite simple), il n'en existe pas pour les matrices complexes (organismes). La concentration et la purification des protozoaires dans les tissus de bivalves sont matrice-dépendantes et apparaissent comme des étapes clefs à maîtriser pour obtenir des résultats pertinents et reproductibles. Dans certains cas, des étapes supplémentaires permettront de libérer les protozoaires des tissus alors que dans d'autres cas, cibler un organe particulier (le plus bioaccumulateur) pourra permettre une meilleure détection. Les techniques de détection peuvent également varier en fonction du protozoaire cible et de sa capacité de résistance vis-à-vis des traitements utilisés.

- Au niveau parasitologique, alors que la bioaccumulation de *C. parvum* et *G. duodenalis* par les bivalves est connue, très peu d'informations sont disponibles pour le toxoplasme. La dissémination de *T. gondii* dans le milieu aquatique est peu détaillée dans la littérature. Aucune information n'est disponible sur une éventuelle accumulation du toxoplasme par des bivalves en milieu continental.
- Au niveau écotoxicologique, alors que les bivalves peuvent accumuler et concentrer les protozoaires *C. parvum* et *G. duodenalis* dans leur tissus, très peu d'études se sont intéressées aux éventuels effets qu'engendre cette contamination sur la physiologie des organismes. Les bivalves étant déjà utilisés en tant que sentinelles des contaminations chimiques à l'aide de biomarqueur¹, il est nécessaire d'évaluer les conséquences de paramètres environnementaux (ex : les protozoaires) sur la réponse de ces biomarqueurs.

¹ *Biomarqueur* : Changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic et al. 1997)

L'ensemble des expérimentations réalisées et les résultats obtenus sont présentés dans ce manuscrit structuré en plusieurs parties décrites ci-après :

L'« Etat de l'art » sera composé de deux sous-parties avec, dans un premier temps, une revue bibliographique qui délimite l'état des connaissances au départ du projet de thèse sur la prévalence des protozoaires au sein des différentes masses d'eau d'une part et des invertébrés aquatiques d'autre part. La deuxième sous-partie sera consacrée à la description des techniques actuellement mises en place pour détecter les protozoaires d'intérêts aussi bien dans les matrices 'simples' de type *eau* que les matrices 'complexes' de type *mollusques bivalves*.

Une partie « Matériel biologique et techniques mises en œuvre » détaillera les organismes utilisés et présentera les conditions générales et les techniques utilisées durant les expérimentations.

Le « Chapitre 1 : Optimisation de la détection des protozoaires *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* et *Toxoplasma gondii* en conditions simple et complexe » sera constituée de deux sous-parties, la première sera présentée sous forme d'un article qui présente les résultats des travaux de l'évaluation de différents protocoles de lyse sur les oocystes de toxoplasme en situation simple. Ensuite, une deuxième sous-partie sera consacrée à l'évaluation et à la mise en place d'une méthodologie commune de concentration, purification et de détection de *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* et *Toxoplasma gondii* à partir des tissus de dreissènes.

Le « Chapitre 2 : Utilisation de la dreissène comme matrice pour la détermination de la contamination biologique des milieux aquatiques: *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* et *Toxoplasma gondii* » présentera d'une part, les travaux réalisés en conditions

contrôlées, qui évaluent les cinétiques d'accumulation des trois protozoaires, et de dépuration pour *T. gondii* dans les tissus de dreissènes (organismes et organes). D'autre part, les résultats des expérimentations *in situ* sur des sites à risques de contaminations biologiques réalisées pour rechercher les trois protozoaires dans l'environnement seront présentés.

Enfin, le « Chapitre 3 : Etudes des réponses cellulaires et immunologiques des hémocytes de la moule zébrée lors d'expositions *ex vivo* à *Cryptosporidium parvum* et *Toxoplasma gondii* » apportera des éléments d'informations sur les interactions entre les organismes et les protozoaires *Toxoplasma gondii* et *Cryptosporidium parvum*, en particulier au niveau des hémocytes, cellules-clefs de l'immunité des dreissènes. Au travers d'expérimentations *ex-vivo*, la viabilité ainsi que la capacité de phagocytose des hémocytes ont été mesurées en contact de différents ratio 'protozoaire-cellule' par cytométrie en flux.

Une discussion générale ainsi que les conclusions et perspectives du projet viendront clore le mémoire.

Etat de l'art

1. Présence des protozoaires dans le milieu aquatique

L'eau peut être source de contamination pour les populations directement *via* les eaux de boisson ou par les activités nautiques de loisirs ou indirectement *via* les eaux d'irrigation qui contaminent les denrées alimentaires. Si les risques chimiques et bactériologiques sont maintenant bien connus, un manque d'information persiste sur les risques liés aux protozoaires. Ce constat peut être expliqué principalement par l'intérêt récent des autorités de santé publique envers la problématique sanitaire des parasites protozoaires dans l'eau. En effet, l'épidémie de Milwaukee (USA) en 1993, qui a causé des affections gastro-intestinales sévères chez près de 403 000 personnes, a révélé l'importance des parasites dans l'eau, la cause de cet événement étant liée au passage accidentel d'oocystes de *Cryptosporidium* spp. au travers du système de filtration des stations de traitement des eaux (Mac Kenzie et al. 1994). A partir de ce moment, la recherche des parasites dans les prélèvements environnementaux est apparue inévitable. Cependant, le manque de techniques disponibles rend difficile leur détection. Chalmers et collaborateurs, en 1997, ont montré pour la première fois la présence d'oocystes de *C. parvum* dans les tissus d'un bivalve marin, *Mytilus edulis*. Les auteurs soulignent non seulement l'intérêt des bivalves comme espèces sentinelles des contaminations parasitaires mais également le risque qu'ils peuvent représenter pour la santé humaine *via* leur consommation. Dès lors, les recherches se sont focalisées sur les organismes filtreurs dans le milieu marin avec des interrogations sanitaires sur la transmission directe des protozoaires vers l'Homme. Peu d'informations sont disponibles au niveau continental. Cependant, les espèces d'eau douce, qui ne présentent pas d'intérêt économique, peuvent également servir d'indicateurs dans un contexte de surveillance des milieux (Graczyk et Conn, 2008). C'est ainsi que des études ont montré l'intérêt de bivalves d'eau douce, la moule, *Dreissena polymorpha*, et la palourde, *Corbicula fluminea*, en tant que bioindicateurs de la contamination biologique (Graczyk et al. 2003, 2008).

L'interaction des protozoaires avec les organismes aquatiques permet donc d'envisager un nouvel outil pour leur détection dans les masses d'eau. En effet, puisque les caractéristiques générales (physico-chimie et débits) et les variations journalières de la matrice *eau* ont un impact direct sur la dissémination des protozoaires (vitesse de sédimentation, agrégation avec les particules) (Shapiro et al. 2009, 2012), l'analyse directe de l'eau ne permet pas une utilisation en biosurveillance de routine. Sédimentaires et accumulateurs, les organismes filtreurs peuvent représenter une alternative complémentaire et intéressante pour la détection des protozoaires dans les masses d'eau.

Cependant, en tant que vecteur potentiel de parasites protozoaires, il est nécessaire d'étudier les effets éventuels de ces derniers sur la physiologie des organismes. Puisque les réponses biologiques (biomarqueurs) des espèces sentinelles sont mesurées pour discriminer les sites de contaminations chimiques différentes, leur modulation par des protozoaires peut représenter un facteur de confusion dans les études écotoxicologiques. Une recherche bibliographique a été réalisée au départ du projet de thèse et met en avant le manque de données concernant l'effet des parasites protozoaires non spécifiques sur la physiologie de leurs hôtes.

Article 1: Protozoa interaction with aquatic invertebrate: interest for watercourses biomonitoring.

Paru dans Environmental Science and Pollution Research (2013), 20: 778-789.

Palos Ladeiro M.^{1,2}, Bigot A.^{1*}, Aubert D.², Hohweyer J.², Favennec L.³, Villena I.², Geffard A.¹

¹*Université de Reims Champagne Ardenne, Unité Interactions Animal-Environnement, EA 4689, UFR Sciences Exactes et Naturelles, campus du Moulin de la Housse 51100 Reims, France*

²*Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, EA 3800, SFR CAP-Santé FED 4231, Hôpital Maison Blanche, 45 rue Cognacq Jay 51100 Reims, France*

³*Laboratoire de Parasitologie Expérimentale, EA 3800, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 22 Boulevard Gambetta 76183 Rouen, France*

Corresponding author*:

Bigot Aurélie. E-mail adress : aurelie.bigot@univ-reims.fr Telephone: +333 26 91 33 28

Abstract:

Toxoplasma gondii, *Cryptosporidium parvum*, and *Giardia duodenalis* are human waterborne protozoa. These worldwide parasites had been detected in various watercourses as recreational, surface, drinking, river, and seawater. As of today, water protozoa detection was based on large water filtration and on sample concentration. Another tool like aquatic invertebrate parasitism could be used for sanitary and environmental biomonitoring. In fact, organisms like filter feeders could already filtrate and concentrate protozoa directly in their tissues in proportion to ambient concentration. So molluscan shellfish can be used as a bioindicator of protozoa contamination level in a site since they were sedentary. Nevertheless, only a few researches had focused on nonspecific parasitism like protozoa infection on aquatic invertebrates. Objectives of this review are twofold: Firstly, an overview of protozoa in worldwide water was presented. Secondly, current knowledge of protozoa parasitism on aquatic invertebrates was detailed and the lack of data of their biological impact was pointed out.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium spp*, *Giardia spp*, Aquatic invertebrate, Interaction, Biomonitoring

Abbreviation list:

FISH: Fluorescence In Situ Hybridization

IF: Immunofluorescence Technique

IFAT: Indirect Fluorescent Antibody Technique

IMS: Immunomagnetic Separation

IP: Propidium Iodide

PCR: Polymerase Chain Reaction

A. Introduction

Water quality has becoming an increasing problem for health and environmental authorities. In fact, microbial pathogens are considered as human health risks but only viruses and bacteria were widely studied in literature in spite of protozoa. However, one in two person of the world was affected by waterborne or foodborne parasitic zoonoses (Macpherson 2005). Protozoa were considered as human health risk because they could be transmitted by drinking water and by recreational water such as lakes and streams. Moreover, foodborne transmission was also considered at risk because undercooked meats or raw meals could be vehicle for enteric protozoa, although it was more difficult to link source and disease (Thompson et al. 2005). Here, we discuss three of them which were the main parasites associated with waterborne outbreaks: *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp., and *Giardia* spp. (Fayer et al. 2004c; Villena et al. 2004). Indeed, cryptosporidiosis and giardiasis constituted the most common causes of human waterborne infection leading to high morbidity in developed and developing countries and severe dehydration and death in immunocompromised hosts (Cacciò et al. 2005). Toxoplasmosis may be considered as reemerging parasitic zoonoses. In fact, childbearing women were less and less immune against toxoplasmosis which could pose a worrying scenario for their offspring.

However, pathogen detection methods in water are still expensive, inaccurate, and time consuming (Toze 1999). As a result, legislation had chosen to use indicators like *Escherichia coli* and another fecal and total coliforms to follow biological water contamination (Chauret et al. 1995; Field and Samadpour 2007; Figueras and Borrego 2010) although they can be rapidly removed from the environment and are more sensitive to environmental stress and disinfection treatment (Chauret et al. 1995). Moreover, various studies showed that neither *Cryptosporidium* oocysts nor *Giardia* cysts were correlated with total or fecal coliforms (Rose et al. 1988; Chauret et al. 1995; Bonadonna et al. 2002). In fact, Helmi et al. (2011) had

highlighted some protozoa-positive sites although they were fecal bacteria indicators negative and, at opposite, some samples were bacterial indicators positive and protozoa negative. Moreover, there are different limits according to (oo)cyst concentration in water which depend on the country legislation. For the US EPA, the risk value considered to be acceptable is 10^{-4} infection per person per year. Countries such England, Canada, and New Zealand had also implemented a national drinking water regulation to avoid outbreaks of protozoan diseases (Castro-Hermida et al. 2010). In fact, in the UK, the legal limit of *Cryptosporidium* in drinking water was 0.1 oocysts/L (Coffey et al. 2010). In EU, the European Drinking Water Directive (Council Directive 98/83/EC) sets the order of pathogenic organism-free water. Nevertheless, in Spain, there were no regulations according to *Cryptosporidium* oocyst limits (Castro-Hermida et al. 2010). This lack of real legislation could be explained by the fact that the scientific community was disagreeing with the (oo)cyst dose response inducing a disease. For example, when various studies had suggested that cryptosporidiosis infectious dose was reached with one oocyst (Coffey et al. 2010; Gale 2001), another investigations underscored an infectious dose with ten oocysts (Castro-Hermida et al. 2010; Helmi et al. 2011) or with a median dose of 130 oocysts (Fayer et al. 2000). Furthermore, pathogen detection in water is complex since it was necessary to filter a large water amount and concentrate parasites in the sample for analysis. Expensive and time consuming, these methods did not allow a rapid detection in routine. Also, filtration and purification techniques from water supplies could highlight different results depending on water quality, sampling period, locality, and quantity (Karanis et al. 2006).

Even so, protozoa were considered as reemerging zoonoses since they were abundant around the world in a large number of watercourses and could infect human by recreational or drinking water. Moreover, they could persist in fresh and even in seawater for several months (Tamburrini and Pozio 1999; Lindsay et al. 2003) and could contaminate aquatic invertebrates which played an important role in the aquatic food chain and may act as a vector to human

waterborne parasites (Slifko et al. 2000; Gajadhar and Allen 2004; Graczyk et al. 2004; Appelbee et al. 2005; Dawson 2005).

In an environmental biomonitoring program, organisms like filter feeders were used to reveal chemical contamination because they already could concentrate xenobiotics in their tissues. They were sedentary; thus, they could be relevant of site contamination and in proportion to the ambient pollution (Geffard et al. 2001; Palais et al. 2012). Invertebrates, and particularly bivalves, are considered as useful sentinel organisms in various biomonitoring programs (Viarengo et al. 2007). In Europe, the UNEP Mediterranean Biomonitoring Program is responsible for the follow-up work related to the protocol for the protection of the Mediterranean Sea against pollution from land-based source and activities, and the OSPAR Commission attempts to protect the marine environment of the North-East Atlantic with mollusc and fish as bioindicators tools. More recently, the European Water Framework Directive had made water pollution as a priority and would get polluted water clean again and ensure clean waters are kept clean. Thus, invertebrate community had been used to discriminate contaminated sites by endocrine disruptors (Oetken et al. 2004; Peck et al. 2007; Matozzo et al. 2008), by trace metals (Rainbow 2002; Amiard et al. 2006; Voets et al. 2009), by organic pollutants (Porte et al. 2006), and even by pesticide exposure (Fulton and Key 2001). As filter-feeding species, contaminants could be accumulated and concentrated in strong quantity in their tissues. Their wide distribution, their sedentary comportment, and their suitability for caging and laboratory experiments made them bioindicators of choice for site analysis. As another tool had to be developed to describe protozoan contamination state, aquatic invertebrates could be used since they could accumulate and concentrate protozoa directly in their tissues. Moreover, since parasitism could be considered as a confounding factor and could contribute to misinterpreted results in ecotoxicological studies (Minguez et al. 2009), it seems important to understand protozoa behavior in watercourses and their interaction with aquatic invertebrates as regard to biological responses.

Objectives of this review are to highlight the presence of protozoa, firstly, in aquatic environment and, secondly, in aquatic invertebrates trying to understand how aquatic organisms could contribute to misinterpreted results in ecotoxicological studies.

B. Protozoa

B.1. *Cryptosporidium* spp

Cryptosporidium spp. is an apicomplexan protozoan parasite. There are 11 species within the genus *Cryptosporidium* but two are considered as human health risk: *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. Transmission could be person to person direct or indirect, animal to person, waterborne, foodborne, and probably airborne (Fayer et al. 2000). Although any person can develop a cryptosporidiosis, high risk people are immunodeficient hosts who include HIV/AIDS patients and children under 2 years old who could suffer from severe dehydration and increased diarrhea (Slifko et al. 2000). Moreover, to date, there are no effective therapy for both immunocompetent and immunocompromised patients (Graczyk et al. 2011). Their life cycles are complex but rapid and autoinfective to provide a low number of oocysts to cause cryptosporidiosis (Carey et al. 2004). Oocysts (4–5 µm) are resistant forms which could survive in the environment for several months and could resist to the water treatment commonly used (Slifko et al. 2000). Proof of infectivity was highlighted in the USA in the spring of 1993. *Cryptosporidium* spp. contamination of municipal water induces the largest outbreak in the USA history with 403,000 cases (Marshall et al. 1997; Macpherson 2005). Fayer underscores that not only surface water but also groundwater samples were tested positive for *Cryptosporidium* spp. in the USA (Fayer 2004b). Concentration in surface water could vary from 0.001 to 100 oocysts per liter (Table 1).

B.2. *Giardia* spp

Giardia is a flagellated unicellular eukaryotic microorganism that causes intestinal infections in mammals (*Giardia duodenalis*), birds, reptiles (*Giardia muris* and *G. duodenalis*), and amphibians (*Giardia agilis*) (Adam 2001; Thompson 2004). *Giardia* cysts (12–15 µm) can be transmitted directly from one infected person to another and indirectly via environment, water, and food. Diarrhea, malaise, flatulence, greasy stools, and abdominal cramps are clinical symptoms although the majority of infected patients are asymptomatic (Gardner et al. 2001). *Giardia* has a simple life cycle which is easily transmitted from individual to another. Discharges can contaminate the environment through food and drinking water (Cacciò et al. 2005). Risk factors are almost the same than cryptosporidiosis but effective treatment exists (Magne et al. 1996). Their resistant cyst permits an important waterborne transmission. Each year, an estimated 2.8×10^8 cases of giardiasis occur around the world. Likewise, giardiasis is one of the most important waterborne diseases along with cryptosporidiosis (Thompson 2004). In fact, *Giardia* cysts are detected in recreational river water, raw surface water, groundwater, in drinking, waste-, tap, well, sewage, and bottle water (Table 1).

B.3. *Toxoplasma gondii*

T. gondii, the causative agent of toxoplasmosis, is an obligate intracellular protozoan parasite that infects more than one-third of the world's human population. Toxoplasma transmission can be both horizontal (person to person) or vertical (mother to fetus) (Aubert and Villena 2009). Most infections are asymptomatic in humans, but *T. gondii* can cause severe clinical diseases such as encephalitis or systemic infection in immunocompromised patients, particularly individuals with HIV infection and in cases of congenital toxoplasmosis (Villena et al. 2004; Hide et al. 2009). Infection is mainly acquired by ingestion of food or water that is contaminated with oocysts shed by cats or by eating undercooked or raw meat containing tissue cysts. Oocysts (10–12 µm) are excreted by felids which are the definitive hosts contributing to the sexual division, and warm-blooded animals are intermediate hosts and the

seat of the asexual division (Jones and Dubey 2010). Oocysts are formed only in felids which shed unsporulated oocysts. Sporulation occurs within 1–5 days and contain two sporocysts with four sporozoites each (Dubey 2004). A single cat can shed from 2 to 20×10^6 oocysts per day and cat feces are generally disposed of down toilets by their owners. Thus, environment and water could be infected through storm runoff or sewage (Cole et al. 2000; Miller et al. 2002; Fayer et al. 2004a).

C. Protozoa prevalence in watercourses

High protozoa density in water was correlated with water receiving sewage effluents (Chauret et al. 1995). *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts were often detected in various watercourses around the world, in raw surface water in the USA (Rose et al. 1988), Canada (Chauret et al. 1995), Italy (Giangaspero et al. 2009), Luxembourg (Helmi et al. 2011), in groundwater in Honduras (Solo-Gabriele et al. 1998), in underground water in France (Aubert and Villena 2009), and in drinking and recreational water in Spain (Castro-Hermida et al. 2010) (Table 1). In 166 water supplies in eastern Europe, Karanis et al. reported *Cryptosporidium* oocysts in 18.1 % of samples and *Giardia* cysts in 9.6 % and they also highlighted *Giardia* cysts in bottled water (Karanis et al. 2006). In most studies, concentrations in water varied from 0.1 to 56 oocysts/L and from 0.2 to 178 cysts/L. Chauret et al. had underscored in the raw surface water sample, detection of 78.8 and 75% of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp., respectively, with an average of 0.19 oocysts and 0.08 cysts per liter (Chauret et al. 1995). As we know, *Cryptosporidium* oocysts were more resistant to environmental stress and were more prevalent in animals than *Giardia* cysts (Helmi et al. 2011). It was probably the reason why some studies had detected more *Cryptosporidium* oocysts than *Giardia* cysts in the environment. Moreover, *Cryptosporidium*, *Toxoplasma* oocysts, and *Giardia* cysts could survive and persist in the environment (Aubert and Villena 2009), and various investigations

had underscored oocysts' ability to sporulate in seawater and remain infective for several months (Tamburrini and Pozio 1999; Lindsay et al. 2003; Lélou et al. 2012). As a result, these protozoa have been considered as public health risks since they are responsible of the main waterborne outbreaks. Karanis et al. had reported 325 outbreaks related with protozoa parasite, and majority of them were associated with *G. duodenalis* for 40.6 % and with *C. parvum* for 50.8 % (Karanis et al. 2006).

Table 1 : Protozoa prevalence in different watercourses

References	Country	Protozoa	Medium	Results: % of positive samples (mean (oo)cysts/L)	Techniques
Rose et al. 1988	United States	<i>C.parvum</i> <i>G.duodenalis</i>	Raw surface water	72% (0.00835 oocysts/L) 31% (0.0015 cysts/L)	Water filtration Sucrose gradient IF
Chauret et al. 1995	Canada	<i>C.parvum</i> <i>G.duodenalis</i>	Raw surface water	78.8% (0.19 oocysts/L) 75% (0.08 cysts/L)	Water filtration IF
Solo-Gabriele et al. 1998	Honduras	<i>C.parvum</i> <i>G.duodenalis</i>	Surface water / Groundwater Surface water / Groundwater	0.58-2.6 oocysts/L 0.26 oocyst/L 3.8 – 21 cysts/L 0.06 cyst/L	IF
Karanis et al. 2006	Bulgaria, Russia	<i>C.parvum</i> <i>G.duodenalis</i>	Tap, river, well, sewage and bottle water	18.1% (River = 56.5 oocysts/L) 9.6% (River = 178.5 cysts/L, Well = 255 cysts/L, bottle = 0.5 cyst/L)	Water filtration or flocculation Sucrose gradient IF
Castro-Hermida et al. 2010	Spain	<i>C.parvum</i> <i>G.duodenalis</i>	Recreational river, drinking and wastewater	57.1% of recreational water (1-60 oocysts/L) 40% of drinking water (1-13 oocysts/L) 32.7% of wastewater (1-4 oocysts/L) 60% of recreational water (1-160 cysts/L) 42.3% of drinking water (1-7 cysts/L) 36.5% of wastewater (1-5 cysts/L)	IMS IFAT IP
Helmi et al. 2011	Luxembourg	<i>C.parvum</i> <i>G.duodenalis</i>	Surface water	81% (1.4 oocysts/L) 53% (0.1 oocysts/L) 81% (7.6 oocysts/L) 53% (0.2 oocysts/L)	IMS IF PCR

Table 2 : Protozoa prevalence in aquatic invertebrates, *in situ* experimentations

References	Country	Protozoa	Medium	Results	Techniques
Gomez-Bautista et al. 2000	Spain	<i>C.parvum</i>	Mussels (<i>M. galloprovincialis</i>) Cockles (<i>C. edule</i>) Tank water	5.8×10^3 oocysts/mussel 5×10^3 oocysts/cockle None oocyst detected after 72h	IFAT Mice inoculation PCR
Graczyk et al. 2001	Canada	<i>C.parvum</i>	Mussels (<i>D. polymorpha</i>)	4.4×10^2 oocysts/mussel	CsCl ₂ gradient IF
Gomez-Couso et al. 2003	Spain Italy United Kingdom Ireland Portugal	<i>C.parvum</i>	Mussels (<i>M. galloprovincialis</i>) Cockles (<i>C. edule</i>)/ Oysters (<i>O. edulis</i>)/ Clams (<i>R. decussatus</i> <i>R. philippinarum</i> <i>V. pulastra</i> <i>D. exoleta</i>)	50% of positive sample even after 14 depuration days Contamination degree = Oysters (54.8%) > Mussels (32.7%) > Clams (29.4%) > Cockles (20.8%) Oocysts viability = Clams (60%) > Oysters, Mussels (51.4%) > Cockles (47.8%)	Diethyl ether IFAT IP
Graczyk et al. 2004	Ireland	<i>C.parvum</i> <i>G.duodenalis</i>	Mussels (<i>D. polymorpha</i>)	4-16 oocysts/mussel 5-9 cysts/mussel	CsCl ₂ gradient IFAT + FISH

Table 3 : Protozoa prevalence in aquatic invertebrates, *in situ* experimentations (suite)

References	Country	Protozoa	Medium	Results	Techniques
Miller et al. 2005	United States	<i>C.parvum</i> <i>G.duodenalis</i>	Clams (<i>C. fluminea</i>)	1-7 oocysts/pool of clams 1-26 cysts/pool of clams	IF IMS + IF PCR
Lucy et al. 2008	Ireland	<i>C.parvum</i> <i>G.duodenalis</i>	Mussels (<i>D. polymorpha</i> <i>M. edulis</i> / <i>A. anatina</i>)	0-6 oocysts/g 0-13 cysts/g	FISH IF
Giangaspero et al. 2009	Italy	<i>C.parvum</i> <i>G.duodenalis</i>	Mussels (<i>M. galloprovincialis</i>) Clams (<i>R. decussatus</i>) In situ water	All samples negatives 31% <i>C.parvum</i> positive 54.8% <i>G.duodenalis</i> positive	IF RT-PCR

Table 4 : Protozoa prevalence in aquatic invertebrates, laboratory experimentations (DD = depuration days; PI = post-inoculation)

References	Protozoa	Medium	Experimental conditions	Results	Techniques
Fayer et al. 1997	<i>C.parvum</i>	Oysters (<i>C. virginica</i>)	Single dose of 5×10^5 oocysts/oyster and 30 DD	Oocysts in gills and hemocytes 3h PI In stomach lumens and intestine 24,168, 720h PI	IF Immunohistology
Graczyk et al. 1998	<i>C.parvum</i>	Clams (<i>C. fluminea</i>) Tank water	19×10^4 oocysts/clam during 24h and 14 DD 10^6 oocysts/L and 3 DD	Oocysts in gills and gastrointestinal tract 24 and 48h PI, in feces until 3 days, in hemolymph until 7 days None oocyst detected after 24h PI	Acid fast stain IF
Tamburrini and Pozzio 1999	<i>C.parvum</i>	Mussels (<i>M. galloprovincialis</i>) Tank water	8×10^6 oocysts/mussel during 24h and 14 DD 13×10^6 oocysts/L	Oocysts in gills 3 days PI, in hemolymph 7 days PI and in gut 14 days PI Infective oocysts detected after 14 days PI	Immunohistology Mice inoculation
Freire-Santos et al. 2001	<i>C.parvum</i>	Clams (<i>R. philippinarum</i>)	10^6 oocysts/clam during 48h	Infective oocysts in gill and gastrointestinal tract	IF IFAT
Lindsay et al. 2001	<i>T.gondii</i>	Oysters (<i>C. virginica</i>)	10^6 oocysts during 24h and 6 DD	Infective oocysts after 6 days PI	Mice inoculation
Freire-Santos et al. 2002	<i>C.parvum</i>	Clams (<i>T. decussatus</i>) Oysters (<i>O. edulis</i>) Tank water	Single dose of 5×10^5 oocysts/organism and 31 DD 10^6 oocysts/L	Decrease of 70% oocyst viability after 96h Infective oocysts detected after 31 days PI From 10^6 to 25×10^3 oocysts/L after 24h	Diethyl ether IP IFAT
Arkush et al. 2003	<i>T.gondii</i>	Mussels (<i>M. galloprovincialis</i>) Tank water	2×10^5 oocysts/mussel and 21 DD 6×10^5 oocysts/L	24h PI: 50% in hemolymph 3 days PI: 25% in digestive gland 7 days PI: 17% in gill 21 days PI: 33% in hemolymph 740 fold reduction in 6h	Taqman PCR Mice bioassay

Table 5 : Protozoa prevalence in aquatic invertebrates, laboratory experimentations (DD = depuration days; PI = post-inoculation) (suite)

References	Protozoa	Medium	Experimental conditions	Results	Techniques
Graczyk et al. 2003	<i>C. parvum</i> <i>G. duodenalis</i>	Mussels (<i>D. polymorpha</i>) Clams (<i>C. fluminea</i>)	0.5 oocysts/organism and 1.4 cysts/organism daily during 5 weeks and 14 DD	70 ± 25.8/pool of 30 mussels 48 ± 24.9/pool of 30 clams Oocysts are still detected until 2 depuration weeks	CsCl ₂ gradient + IF
Izumi et al. 2004	<i>C. parvum</i>	Clams (<i>C. japonica</i>) Tank water	6.73×10 ⁴ oocysts/clam and 14 DD 7.29×10 ⁵ oocysts/L	2h PI: 90% in gastrointestinal tract, 5% in mantle, 0.1% in gills 48h PI: 85% in feces still infective 14 days PI: total recovery No oocysts detected 2h PI	Sucrose gradient IFAT
Lindsay et al. 2004	<i>T. gondii</i>	Oysters (<i>C. virginica</i>)	6.67×10 ⁴ oocysts/oyster and 85 DD	Oocysts are still infective in oyster tissues until 85 days PI	Mice bioassay
Gomez-Couso et al. 2005	<i>C. parvum</i>	Clams (<i>T. decussatus</i>)	Single dose of 3.3×10 ⁵ oocysts/clam and 10 DD (without remove water)	24h: 2.85×10 ⁵ oocysts/clam	Diethyl ether + IFAT Immunohistology
Miller et al. 2005	<i>C. parvum</i>	Clams (<i>C. fluminea</i>) Tank water	Exposition during 6h of: 2.5 oocysts/clam 25 oocysts/clam 250 oocysts/clam and 21 DD 20/200/2 000 oocysts/L and 21 DD	3h PI: 1 oocyst/clam 3h PI: 8 oocysts/clam 3h PI: 40 oocysts/clam 6h PI: decrease of 55%	IF IMS + IF PCR
Graczyk et al. 2006	<i>C. parvum</i> <i>G. duodenalis</i>	Oysters (<i>C. ariakensis</i>)	2.6×10 ³ (oo)cysts/oyster and 33 DD	Viable oocysts were identified up to 33 days PI Viable cysts are detected until 14 days PI	IFAT FISH

D. Protozoa prevalence in aquatic invertebrates

Various experimentations had highlighted aquatic invertebrate and particularly mollusc able to accumulate *C. parvum* and *G. duodenalis* cysts in their tissue (Tables 2,3 and 4,5). In fact, infective *C. parvum* oocysts were detected in mussels and cockles from a shellfish-producing region in Spain. Authors found 5×10^3 oocysts shellfish intensity (Gomez-Bautista et al. 2000). In Canada watercourses, *C. parvum* intensity on zebra mussel was 4.4×10^2 oocysts (Graczyk et al. 2001). *G. duodenalis* has been highlighted in clams and mussels in Ireland and US streams (Table 2,3). Nevertheless, threat research still focused on commercial organisms such as oysters or consumable mussels which can be eaten raw and transmit waterborne disease directly (Graczyk et al. 2006). In fact, Graczyk et al. had highlighted the clam ability to retain an average of 3.68×10^6 waterborne oocysts only by hemocyte internalization (Graczyk et al. 1997). Furthermore, laboratory experiments also demonstrated that shellfish have the capability to not only remove and concentrate a large number of (oo)cysts present in contaminated water but also retain (oo)cysts' infectivity after their transit in the organism (Table 4,5). For example, experimental contamination of oysters and clams followed by a 31-day depuration period highlighted a decrease of 70 % of *C. parvum* oocysts viability in oyster and clam tissue during the first 96 h. However, viable oocysts are still detected at the end of depuration time since half of the mice inoculated by shellfish homogenate were still infected 31 days postinfection (Freire-Santos et al. 2002; Graczyk et al. 2006). Mussels spiked by 2×10^5 *T. gondii* oocysts are infectious to mice 3 days postinfection, and oocysts are still detected in mussel hemolymph 21 days postexposure (Arkush et al. 2003). Some studies indicate that food chain could be contaminated by protozoa because aquatic mammals consume aquatic infected invertebrates (Cole et al. 2000; Miller et al. 2002; Conrad et al. 2005). More interestingly, Miller et al. (2008) report the same *T. gondii* type in terrestrial carnivores, wild mussel, and in southern sea otters occupying the same region. This study highlights the link

between *T. gondii* oocyst release by wild felids, environment, and water contamination and the role of wild mussel for aquatic mammal through the food chain contamination. Indeed, various studies underscored infected mussels consumption as a threat for aquatic mammals and as a public health issue (Graczyk et al. 2003; Mead et al. 1999; Tamburrini and Pozio 1999). However, it is necessary to keep in mind that another organism could act as a vector to protozoa indirectly by food chain infection. Some aquatic organisms which have not commercially interest could internalize oocysts on their tissue and could play an important role in environmental (oo)cyst dissemination (Tables 2,3 and 4,5). By filtration, organism like filter feeders could concentrate directly in their tissues particles present in water. Moreover, (oo)cysts could survive in sea and freshwater for several months which is beneficial for aquatic invertebrates could filter and concentrate waterborne (oo)cysts in their tissues. Thus, aquatic invertebrates could be useful to highlight water bioinfection instead of water analysis since it was time consuming and expensive. In fact, parasite detection methods could be accessed by immunofluorescence or PCR presently after dissection. However, a large choice of analytical techniques made the comparison between studies problematic (Tables 1, 2,3 and 4,5). In fact, Miller et al. (2005) had tested four methods to detect low numbers of *C. parvum* oocyst in clam: direct fluorescent antibody (DFA), immunomagnetic separation–DFA (IMS-DFA), and two techniques of PCR which amplify different *C. parvum* DNA segment and use dissimilar amplification conditions. They found that IMS-DFA and first PCR are sensitive to detect a single oocyst spiked into digestive gland samples, but only PCR methods are too sensitive to detect a single oocyst spiked into clam hemolymph than other techniques (Table 3). Sotiriadou and Karanis (2008) underscored dissimilar results on *T. gondii* detection with different methods. In fact, in a 52-water sample study, authors found 48 % of *T. gondii* DNA-positive sample by the loop-mediated isothermal amplification method, whereas nested PCR products were present in only 13.5 % of samples and all were negative by immunofluorescence method. Thus, a lot of steps were needed to reach an acceptable quality of sample, and brought by a strong loss

of parasites, the results were not constant between experimentations and even between samples.

A problem appeared when results did not indicate presence of parasites in a sample: was it effective because no parasites were in the sample or may be because nothing was detected? Therefore, to facilitate protozoa detection, it is conceivable to use only a few organs instead of whole organisms to detect protozoa since the final matrix could be too complex for a detection technique. Fayer et al. demonstrated that *C. parvum* could be accumulated by eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and oocysts would be preferentially accumulated in gills and hemocytes (Fayer et al. 1997). In fact, gills are directly in contact with contaminated water and provide parasites with an access to the organism and, in fine, in hemolymph. Although filtration activity was a complex phenomenon depending on water chemistry, water parameters, and particle concentration (Bourgeault et al. 2011), invertebrate could filter water, keep nutrients, and concentrate small particles. Protozoa such as *Cryptosporidium* is a small-size organism measuring 4–5 µm (Carey et al. 2004) and *Giardia* and *Toxoplasma*, 10–15 µm (Adam 2001; Jones and Dubey 2010). Thus, filter feeders could retain protozoa during feeding and respiration (Gomez-Couso et al. 2003). Indeed, some studies found a high level of infective parasite in hemolymph, gills, gastrointestinal tract, and feces (Fayer et al. 1997; Graczyk et al. 1998; Tamburrini and Pozio 1999; Freire-Santos et al. 2001). Gomez-Couso et al. attempted to bring out the transit of *C. parvum* oocysts in clam (*Tapes decussatus*). They found that oocysts could be found in siphons, stomach, intestine, digestive diverticula, branchial mucus, and gills. Moreover, they found the highest number of oocysts in the intestine (Gomez-Couso et al. 2003). Another study indicated that, after a single exposition of 7.29×10^5 *C. parvum* oocysts per liter, almost all oocysts were concentrated by clam. Moreover, authors pointed out that 90 % of oocysts are present in the gastrointestinal tract, 5 % are in the mantle, and 0.1 % in the gill only 2 h after exposure; 85 % of oocysts were excreted via feces between 4 and 8 h postexposure (Izumi et al. 2004). Clam exposition to *C. parvum* indicated that 81.6 % of the oocysts could be phagocytosed by 93 % of the clam hemocytes (Graczyk et al. 1997), whereas

Gomez-Couso et al. did not highlight oocyst internalization in clam cells (Gomez-Couso et al. 2003). Concerning *T. gondii*, an experimental study highlighted *Toxoplasma* RNA most often in digestive gland than in hemolymph or in gill sample (Arkush et al. 2003). Moreover, some researches underscored the potential infectivity of oocysts after their passage in the organism and found that oocysts were still infective (Fayer et al. 1997; Lindsay et al. 2001). These conclusions highlight some biological interrogations since viable oocysts consequences on invertebrate homeostasis were poorly studied in these experimentations. From now, most studies deal with specific parasite since parasitism could be an important confounding factor in ecotoxicological investigations (Neves et al. 2000; Sures 2004; Coors et al. 2008; Sures 2008; Marcogliese et al. 2009; Morley 2010). In fact, various studies had investigated macroparasites such as trematodes, nematodes, or acanthocephalan that are specific parasites for their host. These parasites often produce negative effects on their host or on their offspring (Taskinen 1998; Hasu et al. 2006; Gangloff et al. 2008; Minguez et al. 2009; Ben-Ami et al. 2011). For example, Robledo et al. found an inhibiting gonadal development and a decrease in condition index of mussels affected by a copepod parasite (Robledo et al. 1994). Another study had highlighted a lower lipid level in gravid *Gammarus pulex* female infected by a macroparasite (Plaistow et al. 2001). In the same way, Hasu et al. had underscored a smaller offspring in female infected by an acanthocephalan than noninfected female because infected female has a less resource for offspring care (Hasu et al. 2006). Regarding their hosts, parasite could reduce tolerance to chemical contamination: infected snails by trematodes are less tolerant to zinc exposure (Guth et al. 1977), infected cockle have a less tolerance to hypoxia than noninfected one (Wegeberg and Jensen 1999), and increased trematode densities predict reduced mussel reproductive output and physiological condition (Gangloff et al. 2008). According to biomarkers' responses, SOD activity was significantly reduced in infected shrimp by isopods (Neves et al. 2000), infected zebra mussels by ciliates and bacteria displayed a more developed lysosomal system revealed by a larger number of lysosomes (Minguez et al. 2012), and metallothionein concentrations increased in healthy cockles whereas decreased

significantly in trematode-parasited ones (Baudrimont et al. 2006). Nevertheless, some studies had highlighted the synergistic or antagonistic effects of biological and chemical stressors in aquatic organisms (Khan 1990; Lafferty 1997; Sures 2006, 2008; Morley 2009).

Even if they underscored the simultaneous effect of both contaminations, they deal with intestinal parasites of fish and invertebrate infected by trematodes, nematodes, or isopods. Only a few studies took into account biological effects by parasite on biological response. Minguez et al. (2009) had suggested that specific parasitism of zebra mussel must be taken into account in ecotoxicology studies. However, as we see previously, nonspecific parasite such as protozoa could be present in strong density in watercourses and could be accumulated and concentrated by aquatic organism, particularly by filter feeders like molluscs and crustacean. Effects of nonspecific parasite on aquatic invertebrate biomarkers would be an interesting investigation because protozoa may modulate biological responses even if they are nonspecific and because aquatic invertebrate biological responses had been largely used in biomonitoring programs. Even if aquatic invertebrates were not protozoa host specific, viable parasites could interfere with organism and with biological responses. Since invertebrate hemocytes are involved in various biological functions like wound repair; shell repair; nutrient digestion, transport, and excretion (Cheng 1981); gills ensure respiration; and digestive gland ensures nutrition, viable (oo)cysts could interfere with these organs and, in fine, damage their important functions. Moreover, these organs are already used in ecotoxicological studies as exposure indicators like antioxidant system in digestive gland (Bigot et al. 2010), energy metabolism (Palais et al. 2012), DNA damage in gills cells and hemocytes (Vincent-Hubert et al. 2011), immunological functions (Ellis et al. 2011), or host defense (Xu and Faisal 2009). When immunological functions and defense need to be increased by the presence of foreign body, other organism resources could be impacted such as survival, energy, or reproduction resource (Nisbet et al. 2000; Ren and Ross 2005; Kooijman and Troost 2007; Sousa et al. 2010). Protozoa effects on biological responses should be investigated since they were poorly

accessed in literature instead of finding false positive or false negative results in experimentations.

Conclusion

T. gondii, *Cryptosporidium* spp., and *Giardia* spp. are human waterborne parasites. These worldwide parasites have been detected in various watercourses as recreational, surface, drinking, river, and seawater. Thus, interaction with aquatic organisms is unavoidable since they can filter a large quantity of water for feeding and respiration. Impact on the immune system of foreign body could activate and limit immunological system to the detriment of another large biological function such as survival, growth, or reproduction. Protozoa could also damage the defense system which was already used in ecotoxicological studies to discriminate pollution risk sites. As chemical contamination, consequence of protozoa could interfere with biological response. Moreover, associated chemical and biological stress could distort ecotoxicological conclusion giving false positive or false negative results.

While confounding factors had to be considered, effect of nonspecific parasitism on biological responses was poorly accessed. Protozoa could be present in strong density in watercourses and could be accumulated and concentrated by aquatic organisms, particularly by filter feeders like molluscs and crustaceans. The high filtration rate of aquatic invertebrate allowed the filtration of large amount of water and concentration of protozoa with their food. Moreover, concentration of protozoa by phyto- and zooplankton did not be neglected. Their role in aquatic food chain was important and permitted the bioconcentration and bioaccumulation in higher organisms such as aquatic invertebrates. Nonetheless, invertebrate's physiological state could be an important factor of parasite accumulation or parasite depuration. As a result, *in situ* experimentations had highlighted more prevalence in organism than laboratory ones. It is probably the reason why a lot of studies process the whole sample of organism before to realize the parasite detection technique. Thus, they can integrate the entire parasite amount

in their results. However, realization of parasite detection organ by organ could be interesting to understand the parasite kinetics and parasite effects on organism.

Aquatic organisms could be more integrative of the biological pollution and useful than water since they already could filter and concentrate parasite in their tissues. Biological response of aquatic organism could be an alternative to water analysis technique which had a poor sensitivity. Since they are sedentary and could accumulate protozoa, they could be a new useful tool to highlight biological water contamination. However, other research studies are needed to complete the lack of data with exposition to active filter feeders at nonspecific parasite to understand the kinetic and the effects of these biological confounding factors on aquatic organisms: *ex vivo* exposure will permit to understand nonspecific parasite and cells' interaction whereas *in vivo* exposure will point out protozoa's impact on the whole organism. It is all the more necessary since aquatic organisms are used as sentinel or indicator organisms of watercourses, and parasitism could be a source of misinterpreted results.

Acknowledgements

This PhD work was supported by grants from the "Région Champagne Ardenne" (projet INTERBIO). Financial support was provided by CNRS-INSU (Programme EC2CO, projet IPAD) and the Programme Interdisciplinaire de Recherche sur l'Environnement de la Seine (PIREN-Seine).

References

- Adam RD (2001) Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev 14(3):447-475.
- Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquat Toxicol 76(2):160-202.
- Appelbee AJ, Thompson RCA, Olson ME (2005) *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife-current status and future needs. Trends Parasitol 21(8):370-376.
- Arkush KD, Miller MA, Leutenegger CM, Gardner IA, Packham AE, Heckeroth AR et al. (2003) Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Int J Parasitol 33(10):1087-1097.
- Aubert D, Villena I (2009) Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne Region, France. Mem Inst Oswaldo Cruz 104(2):290-295.
- Baudrimont M, Montaudouin XD, Palvadeau A (2006) Impact of digenean parasite infection on metallothionein synthesis by the cockle (*Cerastoderma edule*): A multivariate field monitoring. Mar Pollut Bull 52:494-502.
- Bigot A, Vasseur P, Rodius F (2010) SOD and CAT cDNA cloning, and expression pattern of detoxification genes in the freshwater bivalve *Unio tumidus* transplanted into the Moselle river. Ecotoxicol 19:369-376.
- Ben-Ami F, Rigaud T, Ebert D (2011) The expression of virulence during double infections by different parasites with conflicting host exploitation and transmission strategies. J Evol Biol 24(6):1307-1316.
- Bonadonna L, Briancesco R, Cataldo C, Divizia M, Donia D, Pana A (2002) Fate of bacterial indicators, viruses and protozoan parasites in a wastewater multi-component treatment system. New Microbiol 25:413-420.
- Bourgeault A, Gourlay-Francé C, Priadi C, Ayrault S, Tusseau-Vuillemin MH (2011) Bioavailability of particulate metal to zebra mussels: biodynamic modelling shows that assimilation efficiencies are site-specific. Environ Pollut 159(12):3381-3389.
- Cacciò SM, Thompson RCA, McLauchlin J, Smith HV (2005) Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. Trends Parasitol 21(9):430-437.
- Carey CM, Lee H, Trevors JT (2004) Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. Water Res 38(4):818-862.
- Castro-Hermida JA, García-Presedo I, González-Warleta M, Mezo M (2010) *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies of Galicia, Spain. Water Res 44(20):5887-5896.
- Chauret C, Armstrong N, Fisher J, Sharma R, Springthorpe S, Sattar S (1995) Correlating *Cryptosporidium* and *Giardia* with microbial indicators. J Am Water Works Assoc 87(11):76-84.
- Cheng TC (1981) Bivalves. In Ratcliffe NA, Rowley AF (Ed) Invertebrate blood cells 1, New York, pp 233-300.
- Coffey R, Cummins E, Flaherty VO, Cormican M (2010) Analysis of the soil and water assessment tool (SWAT) to model *Cryptosporidium* in surface water sources. Biosyst Eng 106(3):303-314.
- Cole RA, Lindsay DS, Howe DK, Roderick CL, Dubey JP, Thomas NJ et al. (2000) Biological and molecular characterizations of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). J Parasitol 86(3):526-530.

- Conrad PA, Miller MA, Kreuder C, James ER, Mazet J, Dabritz H et al. (2005) Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *Int J Parasitol* 35(11-12):1155-1168.
- Coors A, Decaestecker E, Jansen M, De Meester L (2008) Pesticide exposure strongly enhances parasite virulence in an invertebrate host model. *Oikos* 117(12):1840-1846.
- Dawson D (2005) Foodborne protozoan parasites. *Int J Food Microbiol* 103(2):207-227.
- Dubey JP (2004) Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol* 126(1-2):57-72.
- Ellis RP, Parry H, Spicer JI, Hutchinson TH, Pipe RK, Widdicombe S (2011) Immunological function in marine invertebrate: Responses to environmental perturbation. *Fish & Shellfish Immunol* 30:1209-1222.
- Fayer R, Farley CA, Lewis EJ, Trout JM, Graczyk TK (1997) Potential Role of the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*, in the Epidemiology of *Cryptosporidium parvum*. *App Env Microbiol* 63(5):2086-2088.
- Fayer R, Morgan U, Upton SJ (2000) Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* 30:1305-1322.
- Fayer R, Lindsay D, Cole RA, Lindsay DS, Dubey JP, Thomas NJ et al. (2004a) Zoonotic protozoa in the marine environment: A threat to aquatic mammals and public health. *Vet Parasitol* 125(1-2):131-135.
- Fayer R (2004b) *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol* 126(1-2):37-56.
- Fayer R, Dubey JP, Lindsay DS (2004c) Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends Parasitol* 20(11):531-536.
- Field KG and Samadpour M (2007) Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Res* 41(16):3517-3538.
- Figueras MJ and Borrego JJ (2010) New perspectives in monitoring drinking water microbial quality. *Int J Environ Res and Public Health* 7(12):4179-4202.
- Freire-Santos F, Oteiza-López A, Castro-Hermida J, García-Martín O, Ares-Mazás M (2001) Viability and infectivity of oocysts recovered from clams, *Ruditapes philippinarum*, experimentally contaminated with *Cryptosporidium parvum*. *Parasitol Res* 87(6):428-430.
- Freire-Santos F, Gómez-Couso H, Ortega-Iñarrea MR, Castro-Hermida J, Oteiza-López A, García-Martín O et al. (2002) Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from experimentally contaminated oysters (*Ostrea edulis*) and clams (*Tapes decussatus*). *Parasitol Res* 88(2):130-133.
- Fulton MH and Key PB (2001) Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ Toxicol Chem / SETAC* 20(1):37-45.
- Gajadhar AA and Allen JR (2004) Factors contributing to the public health and economic importance of waterborne zoonotic parasites. *Vet Parasitol* 126:3-14.
- Gale P (2001) Developments in microbiological risk assessment for drinking water. *J Appl Microbiol* 91(2):191-205.
- Gangloff MM, Lenertz KK, Feminella JW (2008) Parasitic mite and trematode abundance are associated with reduced reproductive output and physiological condition of freshwater mussels. *Hydrobiologia* 610(1):25-31.
- Gardner TB, Hill DR, Gardner TB, Hill DR (2001) Treatment of Giardiasis. *Society* 14(1).

- Geffard A, Amiard-Triquet C, Amiard JC, Mouneyrac C (2001) Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in digestive gland of oysters *Crassostrea gigas* from a clean and a metal-rich sites. *Biomarkers* 6:91-107.
- Giangaspero A, Cirillo R, Lacasella V, Lonigro A, Marangi M, Cavallo P et al. (2009) *Giardia* and *Cryptosporidium* in inflowing water and harvested shellfish in a lagoon in Southern Italy. *Parasitol Int* 58(1):12-17.
- Gomez-Bautista M, Ortega-Mora LM, Tabares E, Lopez-Rodas V, Costas E (2000) Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). *Appl Env Microbiol* 66(5):1866-1870.
- Gomez-Couso H, Freire-Santos F, Ortega-Inarrea MR, Castro-Hermida JA, Ares-Mazas ME (2003) Environmental dispersal of *Cryptosporidium parvum* oocysts and cross transmission in cultured bivalve molluscs. *Parasitol Res* 90:140-142.
- Gomez-Couso H, Freire-Santos F, Hernandez-Cordova GA, Ares-Mazas ME (2005) A histological study of the transit of *Cryptosporidium parvum* oocysts through clams (*Tapes decussatus*). *Int J Food Microbiol* 102:57-62.
- Graczyk TK, Fayer R, Cranfield MR, Conn DB (1997) *In Vitro* Interactions of Asian Freshwater Clam (*Corbicula fluminea*) Hemocytes and *Cryptosporidium parvum* Oocysts. *Appl Env Microbiol* 63(7):2910-2912.
- Graczyk TK, Fayer R, Cranfield MR, Conn DB (1998) Recovery of Waterborne *Cryptosporidium parvum* Oocysts by Freshwater Benthic Clams (*Corbicula fluminea*). *Appl Env Microbiol* 64(2):427-430.
- Graczyk TK, Marcogliese DJ, De Lafontaine Y, Da Silva AJ, Mhangami-Ruwende B, Pieniazek NJ (2001) *Cryptosporidium parvum* oocysts in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): evidence from the St. Lawrence river. *Parasitol Res* 87:231-234.
- Graczyk TK, Conn DB, Marcogliese DJ, Graczyk H, De Lafontaine Y (2003) Accumulation of human waterborne parasites by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*). *Parasitol Res* 89(2):107-112.
- Graczyk TK, Conn DB, Lucy F, Minchin D, Tamang L, Moura LNS et al. (2004) Human waterborne parasites in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from the Shannon River drainage area, Ireland. *Parasitol Res* 93(5):385-391.
- Graczyk TK, Girouard AS, Tamang L, Nappier SP, Schwab KJ (2006) Recovery, Bioaccumulation, and Inactivation of Human Waterborne Pathogens by the Chesapeake Bay Nonnative Oyster, *Crassostrea ariakensis*. *Appl Env Microbiol* 72(5):3390-3395.
- Graczyk Z, Chomicz L, Kozłowska M, Kazimierczuk Z, Graczyk TK (2011) Novel and promising compounds to treat *Cryptosporidium parvum* infections. *Parasitol Res* 109(3):591-594.
- Guth DJ, Blankespoor HD, Cairns J (1977) Potentiation of zinc stress caused by parasitic infection of snails. *Hydrobiologia* 55(3):225-229.
- Hasu T, Tellervo Valtonen E, Jokela J (2006) Costs of parasite resistance for female survival and parental care in a freshwater isopod. *Oikos* 114(2):322-328.
- Helmi K, Skraber S, Burnet JB, Leblanc L, Hoffmann L, Cauchie HM (2011) Two-year monitoring of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* occurrence in a recreational and drinking water reservoir using standard microscopic and molecular biology techniques. *Environ Monit Assess* 179(1-4):163-175.
- Hide G, Morley EK, Hughes JM, Gerwash O, Elmahaishi MS, Elmahaishi KH et al. (2009) Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 136(14):1877-1885.

- Izumi T, Itoh Y, Yagita K, Endo T, Ohyama T (2004) Brackish water benthic shellfish (*Corbicula japonica*) as a biological indicator for *Cryptosporidium parvum* oocysts in river water. Bull Environ Contam Toxicol 72:29-37.
- Jones JL and Dubey JP (2010) Waterborne toxoplasmosis-recent developments. Exp Parasitol 124(1):10-25.
- Karanis P, Sotiriadou I, Kartashev V, Kourenti C, Tsvetkova N, Stojanova K (2006) Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies of Russia and Bulgaria. Environ Res 102(3):260-271.
- Khan RA (1990) Parasitism in Marine Fish after Chronic Exposure to Petroleum Hydrocarbons in the Laboratory and to the Exxon Valdez Oil Spill. Bull Environ Contam Toxicol 44:759-763.
- Kooijman SALM and Troost TA (2007) Quantitative steps in the evolution of metabolic organisation as specified by the Dynamic Energy Budget theory. Biol Rev 113-142.
- Lafferty KD (1997) Reviews Environmental Parasitology: What can Parasites tell us about Human Impacts on the Environment? Parasitol Today 13:251-255.
- Lélu M, Villena I, Dardé ML, Aubert D, Geers R, Dupuis E, Marnef F, Pouille ML, Gotteland C, Dumètre A, Gilot-Fromont E (2012) Quantitative estimation of the viability of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil. App Env Microbiol (in press).
- Lindsay DS, Phelps KK, Smith SA, Flick G, Sumner SS, Dubey JP (2001) Removal of *Toxoplasma gondii* Oocysts from Sea Water by Eastern Oysters (*Crassostrea virginica*). J Eukaryotic Microbiol 197-198.
- Lindsay DS, Collins MV, Mitchell SM, Cole RA, Flick GJ, Wetch CN et al. (2003) Sporulation and Survival of *Toxoplasma gondii* Oocysts in Seawater. J Eukaryotic Microbiol 50(6):687-688.
- Lindsay DS, Collins MV, Mitchell SM, Wetch CN, Rosypal AC, Flick GF, Zajac AM, Lindquist A, Dubey JP (2004) Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in eastern oysters (*Crassostrea virginica*). J Parasitol 90(5):1054-1057.
- Lucy FE, Graczyk TK, Tamang L, Mirafior A, Minchin D (2008) Biomonitoring of surface and coastal water for *Cryptosporidium*, *Giardia*, and human-virulent microsporidia using molluscan shellfish. Parasitol Res 103:1369-1375.
- Macpherson CNL (2005) Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. Int J Parasitol 35(11-12):1319-1331.
- Magne D, Chochillon C, Savel J, Gobert JG (1996) *Giardia intestinalis* et giardiose. J Pediatr Pueric 2:1-10.
- Marcogliese DJ, King KC, Salo HM, Fournier M, Brousseau P, Spear P et al. (2009) Combined effects of agricultural activity and parasites on biomarkers in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. Aquat Toxicol 91:126-134.
- Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR (1997) Waterborne Protozoan Pathogens. Microbiol 10(1):67-85.
- Matozzo V, Gagné F, Marin MG, Ricciardi F, Blaise C (2008) Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: a review. Environ Int 34(4):531-45.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C et al. (1999) Food-related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis 5(5):607-625.

- Miller MA, Gardner IA, Kreuder C, Paradies DM, Worcester KR, Jessup DA et al. (2002) Coastal freshwater runoff is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *Int J Parasitol* 32:997-1006.
- Miller WA, Atwill ER, Gardner IA, Miller MA, Fritz HM, Hedrick RP et al. (2005) Clams (*Corbicula fluminea*) as bioindicators of fecal contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia spp.* in freshwater ecosystems in California. *Int J Parasitol* 35(6):673-684.
- Miller MA, Miller WA, Conrad PA, James ER, Melli AC, Leutenegger CM et al. (2008) Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: new linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *Int J Parasitol* 38(11):1319-1328.
- Minguez L, Meyer A, Molloy DP, Giamberini L (2009) Interactions between parasitism and biological responses in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): Importance in ecotoxicological studies. *Environ Res* 109:843-850.
- Minguez L, Boiché A, Sroda S, Mastitsky S, Brulé N, Bouquerel J, Giambérini L (2012) Cross-effects of nickel contamination and parasitism on zebra mussel physiology. *Ecotoxicol* 21:538-547.
- Morley NJ (2009) Environmental risk and toxicology of human and veterinary waste pharmaceutical exposure to wild aquatic host-parasite relationships. *Environ Toxicol Pharmacol* 27(2):161-175.
- Morley NJ (2010) Interactive effects of infectious diseases and pollution in aquatic molluscs. *Aquat Toxicol* 96:27-36.
- Neves CA, Santos EA, Bainy AC (2000) Reduced superoxide dismutase activity in *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Palemonidae) infected by *Probopyrus ringueleti* (Isopoda, Bopyridae). *Dis Aquat Org* 39:155-158.
- Nisbet RM, Muller EB, Lika K, Kooijman SALM (2000) From molecules to ecosystems through dynamic energy budget models. *J Anim Ecol* 69:913-926.
- Oetken M, Bachmann J, Schulte-oehlmann U, Oehlmann J (2004) Evidence for Endocrine Disruption in Invertebrates. *Int Rev Cytol* 236:1-44.
- Palais F, Dedourge-Geffard O, Beaudon A, Pain-Devin S, Trapp J, Geffard O, Noury P, Gourlay-Francé C, Uher E, Mouneyrac C, Biagianti-Risbourg S, Geffard A (2012) One-year monitoring of core biomarker and digestive enzyme responses in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Ecotoxicol* (in press).
- Peck MR, Labadie P, Minier C, Hill EM (2007) Profiles of environmental and endogenous estrogens in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Chemosphere* 69(1):1-8.
- Plaistow SJ, Troussard JP, Cézilly F (2001) The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its intermediate host *Gammarus pulex*. *Int J Parasitol* 31(4):346-351.
- Porte C, Janer G, Lorusso LC, Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP, Fossi MC et al. (2006) Endocrine disruptors in marine organisms: approaches and perspectives. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicol Pharmacol: CBP* 143(3):303-315.
- Rainbow P (2002) Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environ Pollut* 120(3):497-507.
- Ren JS and Ross AH (2005) Environmental influence on mussel growth: A dynamic energy budget model and its application to the greenshell mussel *Perna canaliculus*. *Ecol Model* 189:347-362.

- Robledo J, Boulo V, Mialhe E, Desprès B, Figueras A (1994) Monoclonal antibodies against sporangia and spores of *Marteilia* sp. (Protozoa: Ascomycota). Dis Aquat Org 18:211-216.
- Rose JB, Darbin H, Gerba CP (1988) Correlations of the protozoa, *Cryptosporidium* and *Giardia*, with water quality variables in a watershed. Water Sci Technol 20(11-12):271-276.
- Slifko TR, Smith HV, Rose JB (2000) Emerging parasite zoonoses associated with water and food. Int J Parasitol 30:1379-1393.
- Solo-Gabriele HM, LeRoy Ager A, Fitzgerald Lindo J, Dubón JM, Neumeister SM, Baum MK et al. (1998) Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water supplies of San Pedro Sula, Honduras. Revista panamericana de salud pública. Pan Am J Public Health 4(6):398-400.
- Sotiriadou I and Karanis P (2008) Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Toxoplasma gondii* in water samples and comparative findings by polymerase chain reaction and immunofluorescence test (IFT). Diagn Microbiol Infect Dis 62(4):357-365.
- Sousa T, Domingos T, Poggiale J, Kooijman SALM (2010) Dynamic energy budget theory restores coherence in biology. Philos trans of the R Soc of Lond. Series B, Biol Sci 365:3413-3428.
- Sures B (2004) Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. Trends Parasitol 20(4):170-177.
- Sures B (2006) How parasitism and pollution affect the physiological homeostasis of aquatic hosts. J Helminthol 80(2):151-157.
- Sures B (2008) Host-parasite interactions in polluted environments. J Fish Biol 73(9):2133-2142.
- Tamburrini A and Pozio E (1999) Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Int J Parasitol 29(5):711-715.
- Taskinen J (1998) Influence of trematode parasitism on the growth of a bivalve host in the field. Int J Parasitol 28(4):599-602.
- Thompson RCA (2004) The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. Vet Parasitol 126(1-2):15-35.
- Thompson RCA, Olson ME, Zhu G, Enomoto S, Abrahamsen MS, Hijjawi NS (2005) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Adv Parasitol 59(05):77-158.
- Toze S (1999) PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. Wat Res 33:3545-3556.
- Viarengo A, Lowe D, Bolognesi C, Fabbri E, Koehler A (2007) United Nations Environment Programme / Mediterranean Action Plan Med Pol proceedings of the workshop on the Med Pol Biological Effects Programme: Achievements and future orientations 185-224.
- Villena I, Aubert D, Gomis P, Ingland JC, Denis-Bisiaux H, Dondon JM et al. (2004) Evaluation of a Strategy for *Toxoplasma gondii* Oocyst Detection in Water. App Env Microbiol 20:160-162.
- Vincent-Hubert F, Arini A, Gourlay-Francé C (2011) Early genotoxic effects in gill cells and haemocytes of *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium, B[a]P and a combination of B[a]P and Cd. Mut Res 23:26-35.

- Voets J, Redeker ES, Blust R, Bervoets L (2009) Differences in metal sequestration between zebra mussels from clean and polluted field locations. *Aquat Toxicol* 93(1):53-60.
- Xu W and Faisal M (2009) Identification of the molecules involved in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes host defense. *Comparative Biochem Physiol Part B*:143-149.
- Wegeberg A and Jensen K (1999) Reduced survivorship of *Himasthla* (*Trematoda*, *Digenea*)-infected cockles (*Cerastoderma edule*) exposed to oxygen depletion. *J Sea Res* 42:325-331.

N.B. : Depuis la parution de cet article, de nombreuses publications ont vu le jour dénotant l'importance de ce sujet au sein des recherches en microbiologie environnementale (Willis et al. 2013) et pour le management des risques associés aux protozoaires hydriques (Austin et al. 2012). La détection des protozoaires du genre *Cryptosporidium* et *Giardia* est encore principalement déterminée dans l'eau (Agulló-Barceló et al. 2013 ; Gallas-Lindemann et al. 2013 ; Burnet et al. 2014 ; Lee et al. 2014, Kitajima et al. 2014), mais aussi dans les tissus de bivalves comme *Mytilus galloprovincialis* (Giangaspero et al. 2014) et, très récemment, au sein de communautés de macroinvertébrés benthiques afin d'élargir les sites d'études dans lesquels les bivalves sont absents (Reboredo-Fernández et al. 2014). A ce jour, la détection des oocystes dans les matrices complexes de type mollusque n'est pas standardisée. C'est pourquoi des études tentent d'améliorer les méthodes disponibles par des expérimentations de dopage (Schets et al. 2013 ; Willis et al. 2014).

Concernant *T. gondii*, plusieurs auteurs rappellent l'importance de la prise en compte de ce protozoaire souvent négligé (Flegr et al. 2014 ; Jones et al. 2014 ; Pal et al. 2014 ; Sepúlveda et al. 2014) et d'autres établissent clairement le lien entre la dissémination des oocystes dans l'environnement à travers l'eau (Krueger et al. 2014) et la contamination des mammifères aquatiques *via* les mollusques (Gonzales-Viera et al. 2013 ; Mazzillo et al. 2013 ; Simon et al. 2013 ; VanWormer et al. 2013a, 2013b ; Goyette et al. 2014). De plus, des études ont mis en évidence la détection de l'ADN de *T. gondii* au sein de tissus d'écrevisse, *Procambarus clarkii*, de poisson, *Hypophthalmichthys molitrix*, de crevette, *Macrobrachium nipponense* (Zhang et al. 2014) et de la moule méditerranéenne, *Mytilus galloprovincialis* (Aksoy et al. 2014) complétant ainsi les données acquises depuis les premières publications de détection du toxoplasme dans les mollusques de Lindsay et collaborateurs (2001).

2. Méthodes de détection des protozoaires dans les matrices ‘simples’ (de type eau) et ‘complexes’ (de type mollusques bivalves)

2.1. Détection des protozoaires dans les matrices simples de type eau

La détection des protozoaires dans les échantillons issus de l’environnement est complexe de par la faible quantité de protozoaires généralement présents dans les échantillons (Guy et al. 2003) et à l’impossibilité de mise en culture due à leur absence de capacité de multiplication. De plus, les prélèvements environnementaux contiennent des substances pouvant interférer avec la détection des protozoaires ou de leur ADN (Schrader et al. 2012). Dans des échantillons relativement purs comme l’eau, la détection des protozoaires *C. parvum* et *G. duodenalis* est réalisée par une méthode introduite et standardisée par l’agence de protection environnementale des Etats-Unis (US EPA) et standardisée par une norme française (NF T90-455).

La première version de 1999 s’est focalisée uniquement sur la détection de *Cryptosporidium* spp. (méthode 1622) puis sur *Cryptosporidium* spp. et *Giardia* spp. (méthode 1623). Plusieurs modifications sont ensuite venues compléter et améliorer la technique. A ce jour, la méthode utilisée pour la détection de *Cryptosporidium* spp. et *Giardia* spp. dans l’eau est la méthode 1623.1², la dernière version datant de 2012. En règle générale, trois étapes sont nécessaires à l’ensemble du processus de détection des protozoaires dans les échantillons, la *concentration*, la *purification* et la *détection*.

² Method 1623.1 : *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA

2.1.1. Techniques de concentration des protozoaires issues de la méthode 1623.1

L'US EPA propose de concentrer de larges volumes d'eau à l'aide de différentes techniques :

2.1.1.a. La filtration sur cartouche

La filtration sur cartouches (option 1) consiste à filtrer l'eau sur des cartouches de type Envirocheck HV (high volume, jusqu'à 1 000 L) en membrane en polyester avec des pores de 1 μm où la surface effective de filtration est de 1 300 cm^2 . L'eau est ensuite éluée de la cartouche avec une solution qui combine détergents et émulsifiants afin de libérer les particules contenues dans les pores de la membrane. Le volume d'élution est de 127 ml au minimum. L'éluât est ensuite entreposé selon les conditions de stockage préconisées jusqu'à l'étape suivante.

2.1.1.b. La filtration sur filtres

Cette technique (option 2) permet de concentrer d'important volumes d'eau (jusqu'à 1 000 L si l'eau est traitée). Elle utilise des filtres constitués de disques en mousse évidés dans leur centre et comprimés au maximum. Pendant la filtration, la mousse est décompressée et permet de retenir les microorganismes présents dans l'échantillon. L'élution du filtre peut être effectuée manuellement ou automatiquement. Dans les deux cas, une série de 2 lavages suivis d'une concentration de l'échantillon sont effectués pour l'élution de l'intégralité des éléments présents dans le filtre. Le volume d'éluât obtenu peut être concentré dans 25 ml.

2.1.1.c. Centrifugation

La troisième technique proposée est la concentration à l'aide d'une centrifugeuse à flux continu (option 3) pour des volumes d'eau allant jusqu'à 50 L. Le culot récupéré est directement prêt pour l'étape de purification.

2.1.2. Technique de purification des protozoaires issues de la méthode 1623.1 : La séparation immunomagnétique (IMS)

La purification de l'échantillon est effectuée à l'aide de la technique de séparation immunomagnétique (IMS) avec, dans certains cas, une étape supplémentaire adaptée pour les échantillons chargés en particules magnétiques comme le fer.

Brièvement, l'IMS (Fig. 1) consiste en l'ajout de billes magnétiques couplées à des anticorps spécifiques de la paroi des oocystes de *Cryptosporidium* et des kystes de *Giardia* directement dans l'échantillon. Une fois le complexe anticorps-protozoaire formé, les billes magnétiques sont aimantées sur les parois du tube pour réaliser différentes étapes de lavages. Les complexes bille-protozoaire sont ensuite remis en suspension dans une solution acide afin de permettre la séparation des liaisons. Les billes sont aimantées une dernière fois afin de récupérer le surnageant constitué uniquement de protozoaires purifiés.

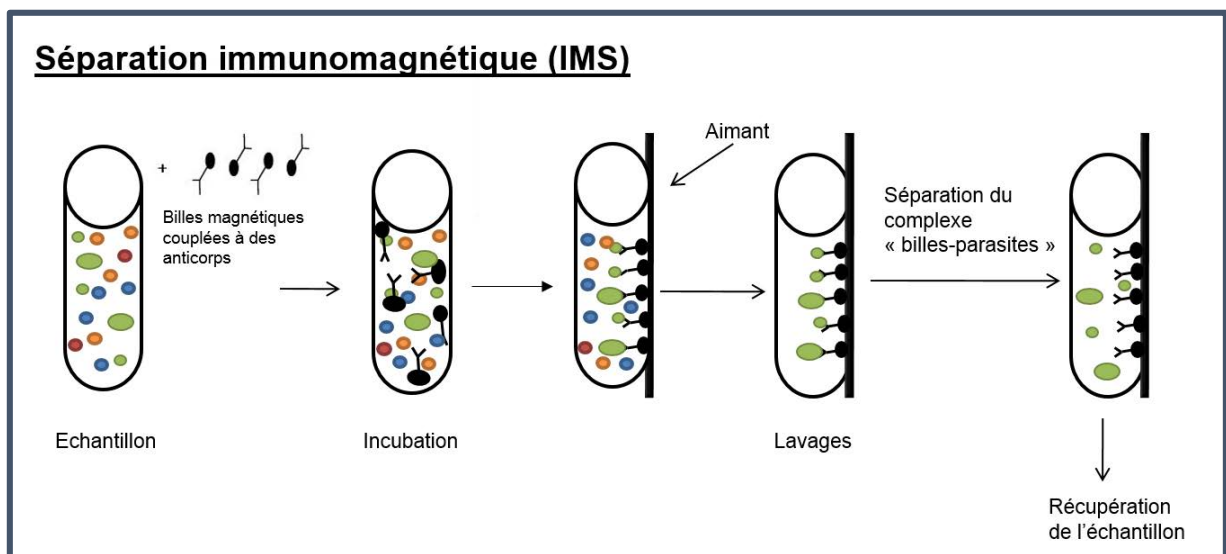


Figure 1 : Les différentes étapes de la technique de séparation immunomagnétique (IMS).

2.1.3. Technique de détection des protozoaires issue de la méthode 1623.1

Suite à la purification de l'échantillon, la détection est réalisée par microscopie. Le marquage des cibles est réalisé avec un anticorps spécifique couplé à une fluorescéine généralement de

type FITC (isothiocyanate de fluorescéine). Différents kits sont disponibles et validés pour la méthode : MeriFluor® *Cryptosporidium/Giardia*, Aqua-Glo™ G/C Direct FL, Crypt-a-Glo™ and Giardi-a-Glo™, et EasyStain™ C&G, et permettent la détection simultanée de *Cryptosporidium* et de *Giardia* dans l'échantillon. La reconnaissance des oocystes et des kystes est basée sur plusieurs critères comme l'intensité de fluorescence, la taille et la forme des cibles marquées.

La méthode 1623.1 a été réévaluée à plusieurs reprises depuis sa mise en application et nécessite encore des compléments d'études pour ajuster certaines étapes encore approximatives. En effet, les volumes d'eau importants à filtrer et la faible quantité de protozoaires dans les échantillons rendent difficiles leur mise en évidence (Straub et Chandler, 2003).

D'autres techniques de concentration (sédimentation), de purification (gradient de densité) et de détection (cytométrie en flux, biologie moléculaire) ont été listées et critiquées par Zarlenga et Trout (2004). Cependant, la diversité des méthodes disponibles et appliquées dans les différentes études rendent les comparaisons difficiles. Les rendements obtenus varient considérablement comme le montre une étude de Yu et al. (2009) qui détecte entre 0 et 70% de kystes de *G. duodenalis* dans des prélèvements d'eau dopés, en fonction des méthodes employées pour la détection.

En ce qui concerne le toxoplasme, il n'existe pas à ce jour de méthode standardisée qui permette de concentrer *T. gondii* dans les échantillons d'eau. En effet, l'absence d'anticorps monoclonal dirigé contre la paroi de l'oocyste rend impossible la réalisation de l'IMS, même si des stratégies de détection ont déjà été proposées (Isaac-Renton et al. 1998 ; Dumètre et Dardé, 2003 ; Villena et al. 2004). Pourtant, des études ont mis en évidence sa présence dans le milieu aquatique incluant l'eau (Bowie et al. 1997 ; Aubert et Villena, 2009 ; Jones et Dubey, 2010), et différentes espèces animales comme les loutres de mer (Cole et al. 2000 ; Conrad et al. 2005 ; Mazillo et al. 2013), les lamantins (Delgado et al. 2013), les dauphins (Gonzalez-Vieira et al. 2013) ou encore les bivalves marins (Miller et al. 2008 ; Esmerini et al. 2010 ; Putignani et al. 2011).

2.2. Détection des protozoaires dans les matrices complexes de type *mollusques bivalves*

Les protozoaires sont susceptibles d'interagir avec les organismes de type bivalves (qui sont dénommés 'matrices complexes' tout au long de ce manuscrit), lors des processus d'alimentation (filtration) mais aussi de défenses (capacité de phagocytose, d'encapsulation) et de sélection (pseudo-fèces). En comparaison avec des matrices relativement simples, il est nécessaire de réaliser des étapes supplémentaires de purification afin d'optimiser le processus de détection des protozoaires dans l'échantillon.

Plusieurs auteurs ont tenté de développer des techniques efficaces et reproductibles pour la détection des protozoaires dans les chairs de mollusques. Cependant, il s'avère que les rendements des différentes méthodes utilisées sont matrice-dépendants et varient en fonction du type d'organisme et du type d'échantillon étudiés (organes *versus* organisme entier) rendant ainsi une éventuelle standardisation difficile (Willis et al. 2013). Un aperçu des principales techniques publiées est proposé ci-après pour les trois étapes de mise en évidence des protozoaires (voir Hohweyer et al. 2013 pour revue).

2.2.1. Concentration

En vue de l'étape de détection, il est primordial d'obtenir un échantillon homogène et dépourvu des chairs des individus pour faciliter l'accès aux protozoaires. Pour cela, une première étape de broyages mécaniques et/ou enzymatiques des tissus (réalisée sur tout ou partie des tissus mous) est généralement réalisée. La plupart des études traitant les chairs de mollusques utilisent la pepsine comme enzyme de digestion des tissus (Robertson et Gjerde, 2008 ; Willis et al. 2014), alors que les études portant sur la digestion de viande d'animaux vertébrés utilisent préférentiellement la trypsine (Esteves et al. 2014).

En prétraitement à la digestion, une délipidation à l'éther s'avère parfois nécessaire afin de libérer les éventuelles graisses de l'échantillon qui pourraient interférer avec les autres étapes

de détection (Waldman et al. 1986). Ce procédé est très utilisé pour les moules marines et les huitres, chez lesquelles de nombreuses études ont tenté de mettre en évidence les protozoaires entériques du fait de leur risque pour la santé humaine (Freire-Santos et al. 2000, 2001 ; Gómez-Couso et al. 2003, 2005).

2.2.2. Purification

Pour la purification de l'échantillon, la technique de séparation immunomagnétique précédemment décrite (voir fig. 1, partie 2.1.2) peut être utilisée (Miller et al. 2005 ; Li et al. 2006). Cependant, la complexité de la matrice peut empêcher la liaison des billes magnétiques avec les protozoaires, obligeant à effectuer des étapes de purification de l'échantillon en amont de l'IMS au risque d'accentuer les pertes d'oocystes/kystes (Downey et Graczyk, 2007).

La séparation sur gradients de type gradient de sucrose (Traversa et al. 2004 ; Li et al. 2006 ; Melo et al. 2006 ; Putignani et al. 2011) ou de chlorure de césium (Graczyk et al. 1999, 2004) permet également de libérer les protozoaires présents dans l'échantillon. Cependant certains auteurs mettent en évidence un effet de sélection des protozoaires par ces techniques. En effet, les oocystes viables de *Cryptosporidium* sont préférentiellement concentrés avec les gradients de sucrose alors que les gradients de Percoll-sucrose concentrent en majorité les oocystes non viables (Bukhari et Smith, 1995).

2.2.3. Détection

La détection des protozoaires se fait principalement à l'aide de la technique d'immunofluorescence normalisée. En effet, il existe des kits combinés pour la détection de *Cryptosporidium* spp. et *Giardia* spp. qui rendent la détection accessible (Freire-Santos et al. 2000). Cependant cette technique est limitée de par la possibilité de réactions croisées avec d'autres organismes (Clancy et al. 1994). L'emploi de fluorochromes combinés tels que le 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) et l'iodure de propidium (IP) permet de renseigner sur la

viabilité des oocystes/kystes même si l'utilisation de l'IP paraît surestimer la mortalité des protozoaires (Shi et al. 2007; Dauschies et al. 2013). Pour *T. gondii*, les propriétés de la paroi des oocystes permettent de le visualiser directement au microscope sous UV (Dumètre et al. 2013). Cependant, quel que soit le protozoaire concerné, il est primordial de purifier au préalable l'échantillon afin que les débris n'interfèrent pas avec l'identification. A la vue des nombreuses substances issues de l'environnement pouvant émettre une fluorescence naturelle (*i.e.* microalgues), il est nécessaire que l'expérimentateur soit formé à l'identification des cibles. De plus, l'identification par immunofluorescence ne permet pas de discriminer les espèces des genres *Cryptosporidium* et *Giardia*. A l'heure actuelle, il n'existe pas de monoclonal dirigé contre les parois des oocystes de *T. gondii* pour une utilisation en microbiologie environnementale ce qui rend difficile son identification dans les prélèvements environnementaux.

Récemment, des approches moléculaires se sont développées en vue d'obtenir des résultats sensibles et spécifiques (Girones et al. 2010). En effet, les techniques de type PCR permettent d'obtenir non seulement des informations sur la présence de protozoaires dans l'échantillon (PCR quantitative en temps réel) en un minimum de temps mais également sur la viabilité des cibles (par RT-PCR) ce qui s'avère nécessaire dans une approche complète d'évaluation du risque sanitaire pour les populations. Cependant, la forme oocystes ou kystes est une forme particulièrement robuste (Belli et al. 2006) qui permet aux protozoaires de survivre durant des mois voire des années dans l'environnement (Robertson et al. 1992). L'accès à l'ADN, nécessaire à la détection par PCR, dépend fortement de la méthode de lyse utilisée afin de casser les parois des protozoaires. En général, plusieurs cycles de chocs thermiques sont réalisés (Sluter et al. 1997 ; Yu et al. 2009). Dans certains cas, des traitements complémentaires doivent être effectués en fonction de la résistance des protozoaires (Dumètre et Dardé, 2003 ; Aubert et Villena, 2009) puisque la composition même des parois diffère selon les protozoaires (*i.e.* composition biochimiques, nombre de couches, présence de sporocystes).

Objectifs scientifiques de la thèse

Ce travail de thèse a pour but d'étudier les interactions entre des parasites protozoaires, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* et *Giardia duodenalis*, et la moule d'eau douce, *Dreissena polymorpha*.

Pour cela, des expérimentations *in vivo* en conditions contrôlées de laboratoire seront réalisées au travers d'expositions simultanées, simples et de dopage des dreissènes aux protozoaires. Ceci permettra de valider la méthodologie de détection des parasites au sein des tissus de dreissène mais également de définir leur cinétique d'accumulation. Une campagne *in situ* viendra compléter les informations obtenues au laboratoire. Des expérimentations *ex vivo* entre les hémocytes, cellules effectrices du maintien de l'immunité des dreissènes, et les oocystes de parasites seront également réalisées.

Ainsi, en combinant les approches à différents niveaux d'organisation biologique, le projet permettra de placer l'organisme *Dreissena polymorpha* dans une double stratégie de biosurveillance qui constituera les deux principales issues de ce travail:

- une biosurveillance sanitaire liée à l'utilisation de la dreissène en tant que vecteur de parasites considérés comme enjeux de santé publique (Chapitre 1 et 2)
- une biosurveillance environnementale liée à la compréhension du rôle potentiel de ces paramètres environnementaux (protozoaires) en tant que facteur de confusion vis-à-vis de réponses biologiques utilisées chez la dreissène comme biomarqueurs (Chapitre 3).

Matériels biologiques et Techniques mises en œuvre

1. Les modèles biologiques

1.1. Les protozoaires

1.1.1. *Cryptosporidium* spp.

1.1.1.a. Classification

Le genre *Cryptosporidium* est généralement décrit comme appartenant à la classe des *Coccidia* du *phylum* des *Apicomplexa*, à l'ordre des *Eucoccidiorida* et à la famille des *Cryptosporidiidae* qui ne comprend que le genre *Cryptosporidium*. Cette classification est néanmoins controversée par la communauté scientifique car les oocystes de *Cryptosporidium* présentent plusieurs caractéristiques qui les différencient des autres membres de la classe des coccidies notamment de par leur petite taille (4,4-5,6 μm) et leur résistance aux agents anti-coccidiose (Fayer 2012). Parmi les 23 espèces représentées dans le genre, *C. parvum* et *C. hominis* ont été les premiers décrits comme présentant un risque d'infection pour l'Homme mais cette liste peut être allongée à *C. cervine*, *C. felis* et *C. meleagridis* (Carey et al. 2004).

1.1.1.b. Cycle parasitaire

Le cycle parasitaire de *Cryptosporidium* est monoxène et se déroule donc chez un seul hôte (Fig. 2). Comme toutes les coccidies, le protozoaire est retrouvé dans l'environnement sous une forme résistante, l'oocyste. Une fois ingéré par l'hôte (eau ou d'aliments contaminés), l'action combinée de la température, du pH, des enzymes et des sels biliaires permettent le dékystement de l'oocyste qui libère ainsi ses 4 sporozoïtes (forme infectante du protozoaire). La multiplication sexuée et asexuée permet alors un développement très rapide du protozoaire qui consiste en la formation de deux types d'oocystes : ceux à paroi épaisse pour la majorité (80%) qui seront excrétés avec les selles des individus et ceux à paroi fine (20%) qui contribuent à l'auto-infection (Smith et al. 2005).

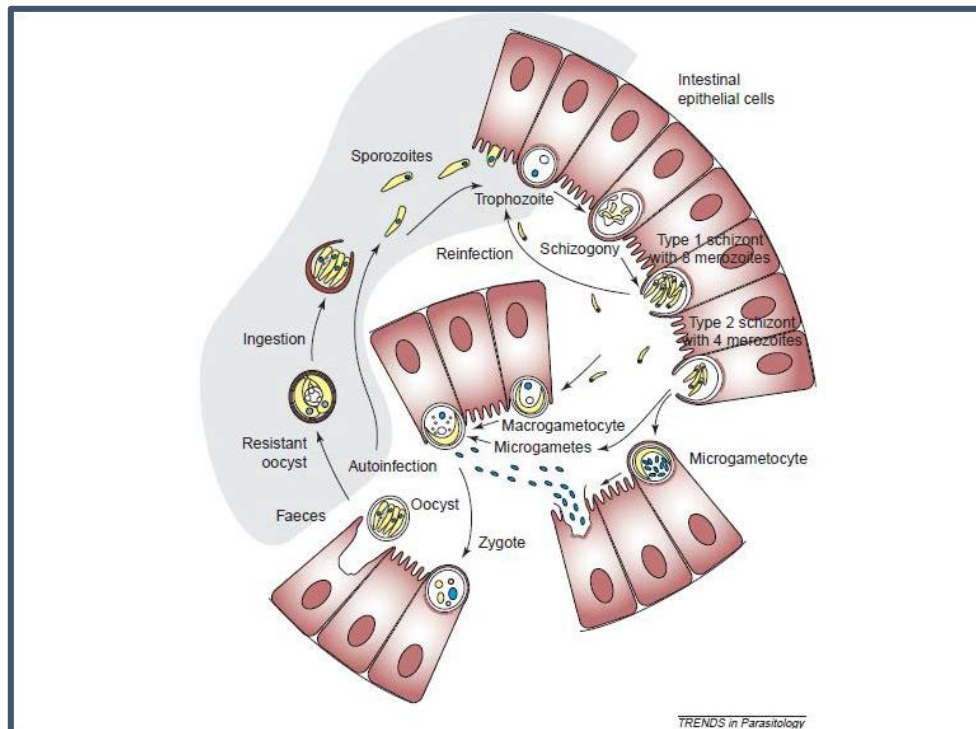


Figure 2 : Les différentes étapes du cycle parasitaire de *Cryptosporidium* spp. (d'après Smith et al. 2005)

1.1.1.c. La cryptosporidiose

Cryptosporidium spp. est l'agent de la cryptosporidiose. Le rapport 2013 de l'ECDC³ place la cryptosporidiose à la 5^e place des maladies gastro-intestinales en Europe avec plus de 5 500 cas répertoriés dans 21 pays. Les symptômes de la pathologie varient en fonction de l'âge et du statut immunitaire de la personne infectée. Les signes cliniques peuvent être absents mais des diarrhées profuses importantes ainsi que des nausées, des vomissements, des crampes abdominales et une perte de poids peuvent également être observés (O'Hara et Chen, 2011). Chez l'adulte immunocompétent, la maladie évolue généralement spontanément vers la guérison en 9 à 15 jours. Chez les jeunes enfants et les personnes immunodéprimées, les conséquences de la maladie peuvent être très graves et provoquer de sévères déshydratations (Slifko et al. 2000). A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement efficace contre la cryptosporidiose (Graczyk et al. 2011).

³ European Center for Disease prevention and Control

1.1.2. *Giardia* spp.

1.1.2.a. Classification

Giardia spp. est un protozoaire flagellé appartenant à la classe des *Zoomastigophorea*, à l'ordre des *Diplomonadida* et à la famille des *Hexamitidae*. Parmi les différentes espèces du genre, seule *G. duodenalis* (syn. *G. lamblia* ou *G. intestinalis*) est connue pour infecter l'Homme (Thompson 2000). Sur le plan génétique, cette espèce est caractérisée par 8 assemblages (nommés de A à H) dont seuls les assemblages A et B sont pathogènes pour l'Homme.

1.1.2.b. Cycle parasitaire

Le cycle de *Giardia* est très simple et ne comporte que peu d'étapes dans la multiplication du protozoaire (Fig. 3). La forme environnementale résistante, les kystes (12-15 μm), peut contaminer les hôtes par ingestion d'eau ou d'aliments souillés. Le dékystement a lieu dans l'intestin grêle où 2 trophozoïtes sont libérés et se multiplient par divisions asexuées dans la lumière de l'intestin de l'hôte. L'enkystement a lieu dans le colon et les 2 formes (kystes et trophozoïtes) peuvent se retrouver dans les selles (Thomson et Monis, 2004).

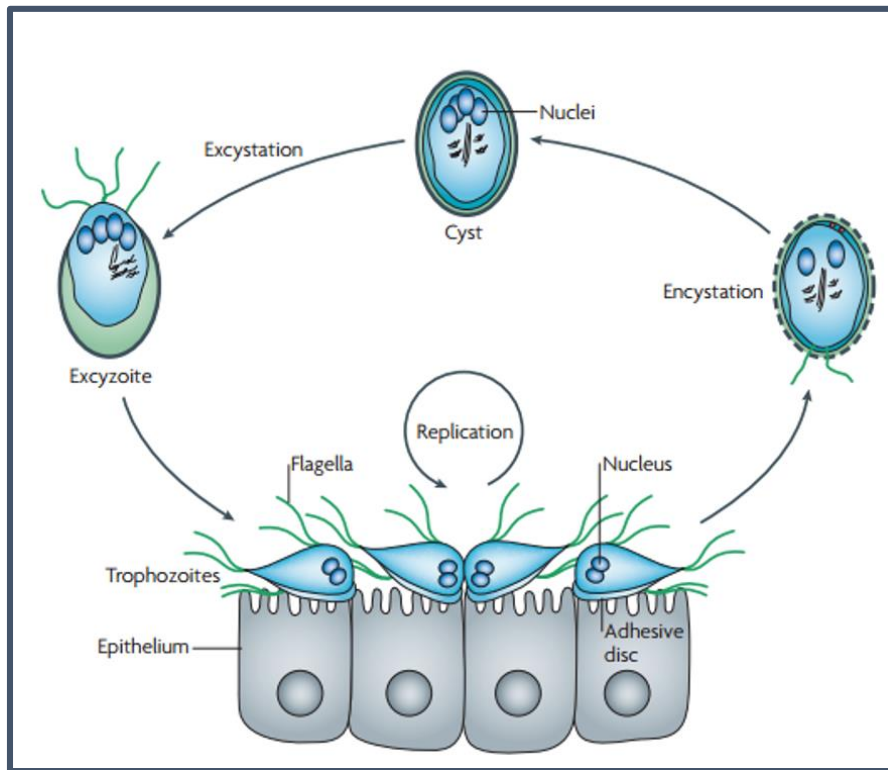


Figure 3 : Les différentes étapes du cycle de vie de *Giardia* spp. (d'après Ankarklev et al. 2010)

1.1.2.c. La giardiase

La giardiase est la pathologie associée à l'infection par *G. duodenalis* et se trouve à la 3^e place des infections intestinales en Europe. Elle peut être asymptomatique dans près de 90% des cas, ce qui rend difficile la détermination de la maladie. Malgré cela, plus de 16 000 cas ont été répertoriés ces dernières années en Europe (ECDC, 2013). Les symptômes sont peu spécifiques et caractérisés par des diarrhées, des flatulences, des crampes abdominales et/ou des malaises 1 à 3 semaines après la contamination. D'autres symptômes, plus graves mais rares, ont également été associés à la giardiase comme les vomissements, la fièvre, la perte de poids et l'anorexie (Gardner et Hill, 2001).

1.1.3. *Toxoplasma gondii*

1.1.3.a. Classification

Toxoplasma est un genre appartenant à la classe des *Coccidia* du *phylum* des *Apicomplexa*, à l'ordre des *Eimeriida* et à la famille des *Sarcocystidae*. Il n'y a qu'une seule espèce dans le genre qui est *T. gondii*. Historiquement, *T. gondii* est classé selon trois types génétiques principaux (*i.e.* I, II et III) provenant essentiellement d'Europe et d'Amérique du Nord. Cependant, des génotypes 'atypiques' ont été mis en évidence dans les pays tropicaux et subtropicaux (Ajzenberg et al. 2004) provoquant des formes de toxoplasmoses sévères même chez l'immunocompétent (Carne et al. 2009).

1.1.3.b. Cycle parasitaire

Il existe trois stades différents de *T. gondii* qui se développent chez deux types d'hôtes : l'hôte définitif représenté par un membre de la famille des félinés et l'hôte intermédiaire, mammifères ou oiseaux, ce qui lui procure un cycle parasitaire complexe (Fig. 4). La forme tachyzoïte qui est la forme infectante du parasite, se développe dans les cellules de l'hôte intermédiaire et de l'hôte définitif et se multiplie par divisions asexuées jusqu'à la rupture des membranes cellulaires. Après un nombre inconnu de divisions, les tachyzoïtes se transforment en bradyzoïtes qui se retrouvent dans les tissus sous une forme latente de kystes. Les bradyzoïtes se retrouvent préférentiellement dans les tissus musculaires et neuronaux tels que le cerveau, les yeux et le muscle cardiaque. L'hôte définitif (ou l'hôte intermédiaire) s'infecte principalement en ingérant des kystes contenus dans des proies, des tachyzoïtes ou des oocystes provenant d'eau ou d'aliments contaminés. Au niveau digestif, les parois des kystes ou des oocystes sont rompues libérant des bradyzoïtes ou des sporozoïtes qui se transforment rapidement en tachyzoïtes, ce qui confèrent un développement rapide du protozoaire. En outre, chez l'hôte définitif, la division sexuée peut produire des oocystes (10-12 μm) non sporulés qui sont excrétés avec les fèces. La sporulation a lieu dans l'environnement en fonction de l'humidité et de la température dans les 1 à 5 jours après l'excrétion et contribue

ainsi à la contamination de l'environnement. Un oocyste sporulé contient 2 sporocystes contenant chacun 4 sporozoïtes (Dubey 2004).

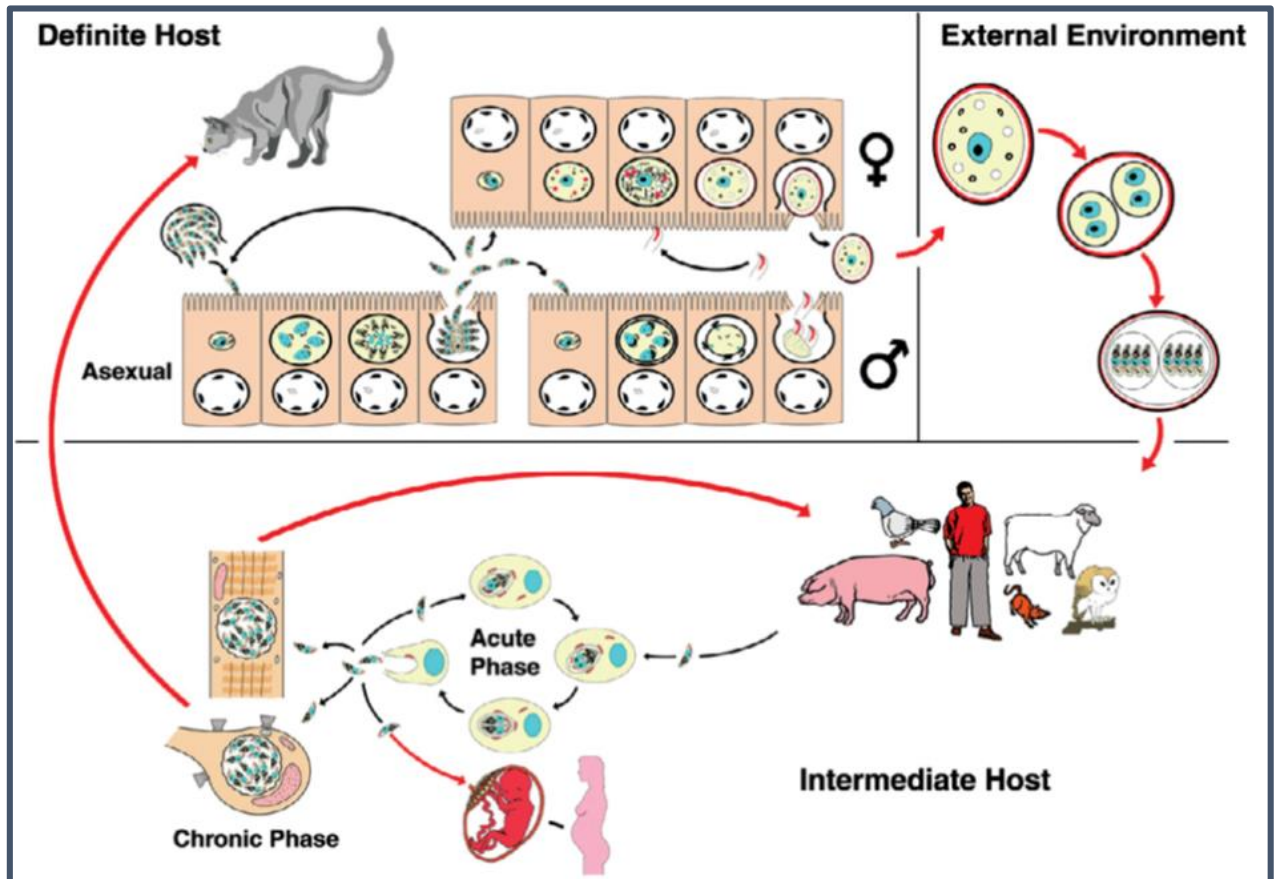


Figure 4 : Les différentes étapes du cycle de vie de *T. gondii* (d'après Fergusson 2009)

1.1.3.c. La toxoplasmose

La toxoplasmose est la maladie associée à l'infection par *T. gondii*. On estime qu'un tiers de la population mondiale est infectée par ce protozoaire (Miller et al. 2009). L'infection peut se faire par l'ingestion d'oocystes ou de kystes provenant de nourriture ou d'eau contaminée mais également *via* les greffes d'organes et les transfusions si le donneur est séropositif pour la toxoplasmose. Cette maladie est généralement asymptomatique mais, une fois infecté, l'individu le reste à vie. Il est parfois observé chez l'immunocompétent de la fièvre et des adénopathies. Chez les personnes immunodéprimées, l'infection toxoplasmique peut être associée à des lésions cérébrales, neuronales et oculaires sévères pouvant entraîner le décès

du patient si aucun traitement n'est institué. La toxoplasmose est également grave dans les cas d'infection durant la grossesse chez la femme séronégative en cas de transmission à son fœtus (toxoplasmose congénitale) (Jones et al. 2009).

1.2. *Dreissena polymorpha*

1.2.1. Biologie et écologie

Mollusque bivalve caractérisé par ses zébrures qui lui procurent son nom, la moule zébrée est originaire de la mer caspienne (Fig. 5). Son cycle de vie peut se caractériser principalement en deux phases, la première étant l'état larvaire qui est pélagique et libre alors qu'à la forme juvénile et adulte les dreissènes sont fixées grâce à leur byssus et sont plutôt benthiques. Les dreissènes évoluent en grappes d'individus sur des supports durs et immergés tels que les pierres, les épaves mais aussi les coques de bateaux ce qui lui a permis de coloniser l'Europe (Fig. 6) et jusqu'à l'Amérique du Nord (Mackie et Schloesser, 1996 ; McMahon 1996) avec des conséquences positives (*i.e.* augmentation de la biomasse des macrophytes et de l'abondance des macroinvertébrés) et négatives (diminution de la production de phytoplancton et de la biomasse du zooplancton) pour ses nouveaux habitats (MacIsaac 1996 ; Ricciardi 2003). Sa capacité de filtration est sélective (15-40 µm) (Ten Winkel et Davids, 1982) et permet aussi à la dreissène de modifier la composition de certains écosystèmes lorsqu'elle est présente en forte concentration (Lavrentyev et al. 1995).



Figure 5 : La moule d'eau douce ou moule zébrée (*Dreissena polymorpha*)

1.2.2. Utilisation en surveillance des milieux

La moule zébrée est une espèce très utilisée dans les études écotoxicologiques. Le maintien des dreissènes en laboratoire est aisé et leurs réponses physiologiques lors de stress d'origine biotique ou abiotique sont largement documentées (Karatayev et al. 2002 ; Buchini et al. 2003 ; Zupan et Kalafatić, 2003 ; Bolognesi et al. 2004 ; Smolders et al. 2004 ; Giambérini et Cajaraville, 2005 ; Voets et al. 2006 ; Binelli et al. 2008 ; Costa et al. 2008 ; Latjner et al. 2008 ; Faria et al. 2009 ; Minguez et al. 2009). Les dreissènes possèdent une grande tolérance aux pollutions, sont capables de filtrer de grandes quantités d'eau et d'accumuler les contaminants proportionnellement à la contamination du milieu (De Lafontaine et al. 2000 ; Quinn et al. 2004), ce qui leur procure des avantages certains pour une utilisation comme espèce sentinelle. Sur le terrain, les dreissènes peuvent être utilisées en biomonitoring passif (Camusso et al. 2001 ; LeGoff et al. 2006) ou actif (Boening 1999 ; Klobučar et al. 2003 ; Bervoets et al. 2004, 2005 ; Guerlet et al. 2007 ; Bourgeault et al. 2010 ; Palais et al. 2011) et permettent ainsi de discriminer des sites présentant différents types de contaminations très majoritairement de nature chimique. Cependant, les dreissènes ont également été utilisées pour mettre en évidence une contamination de l'eau de type biologique vis-à-vis de *C. parvum* et de *G. duodenalis* (Graczyk et al. 2004 ; Lucy et al. 2010).



Figure 6 : Distribution de la moule zébrée en Europe. En vert population d'origine, en rouge population introduite (d'après daisie : delivering alien invasive species inventories for Europe).

2. Provenance des organismes et conditions générales des expérimentations

2.1. Provenance des organismes

2.1.1. *Cryptosporidium parvum*

Les oocystes de *C. parvum* sont fournis par Waterborne® Inc. (Nouvelle-Orléans, Etats-Unis ; réf. #P102C). Les oocystes sont de la souche Iowa et proviennent de selles de veaux expérimentalement inoculés. Les échantillons ont été purifiés par gradient de sucrose et gradient de Percoll après extraction des fèces au diéthyléther par le fournisseur. Les oocystes ont ensuite été triés et numérés par un cytomètre-trieur. Les oocystes sont conservées dans du PBS à 4 °C jusqu'à leur utilisation dans les 6 mois qui suivent la réception.

2.1.2. *Giardia duodenalis*

Les kystes de *G. duodenalis* sont également fournis par Waterborne® Inc. (Nouvelle-Orléans, Etats-Unis ; réf. #P101). Les kystes proviennent de gerbilles expérimentalement inoculées. De même que pour *C. parvum*, les échantillons ont été purifiés par gradient de sucrose et gradient de Percoll puis triés/numérés au cytomètre-trieur. Les kystes sont conservés dans du PBS à 4 °C jusqu'à leur utilisation dans les 6 mois qui suivent la réception.

2.1.3. *Toxoplasma gondii*

Les oocystes de *T. gondii* ont été généreusement fournis par J.P. Dubey (USDA, Beltsville, USA). Les oocystes ont été obtenus à partir de fèces de chats expérimentalement contaminés puis purifiés par gradient de sucrose. Les oocystes proviennent de la souche ME49 de génotype II. Les oocystes sont conservés dans une solution aqueuse contenant 2 % d'H₂SO₄ à 4 °C jusqu'à leur utilisation dans l'année qui a suivi la réception.

2.1.4. *Dreissena polymorpha*

Les dreissènes utilisées pour les expositions proviennent du canal de l'est à Commercy (Meuse, Lorraine: N 48°45'26.13", E 5°36'14.51") pour les expérimentations du chapitre 1 et 2 pour les expérimentations au laboratoire ou du lac du Der au niveau du Port de Nuisement (Marne, Champagne-Ardenne : N 48°34'00", E 4°45'00") pour les autres expérimentations (caging et chapitre 3). Les dreissènes sont échantillonnées et calibrées entre 20 et 25 mm (ce qui correspond à un âge de 2-3 ans) pour faciliter les prélèvements d'hémolymphe.

2.2. Conditions d'expérimentations

Dans un souci de limiter les répétitions, il ne sera décrit ici que les informations les plus générales alors que les détails méthodologiques de chacune des expérimentations seront exposés dans les chapitres suivants organisés autour de plusieurs articles.

Stabulation des organismes :

Au laboratoire, les dreissènes sont lavées et mises en stabulation dans des aquariums en verre de 5 L dans un mélange d'eau du site de prélèvement et d'eau Cristaline Aurèle (source Jandun, France) préalablement ajustée en température pour atteindre celle du milieu au moment de l'échantillonnage. La température est alors régulée de $\pm 0,5$ °C par jour jusqu'à atteindre 12 ± 1 °C avec une aération constante et des cycles jour/nuit réglés sur 12h/12h. Les dreissènes sont gardées au minimum 10 jours en phase d'acclimatation avant les expérimentations. Durant cette phase, l'eau est renouvelée 2 fois par semaine et les individus sont nourris avec un mélange d'algues déshydratées *Chlorella pyrenoidosa* et fraîches *Scenedesmus obliquus* à raison de 100 000 cellules algales / jour / dreissène (Kraak et al. 1997). Les composés azotés (*i.e.* nitrites, nitrates, ammonium) sont contrôlés avant chaque changement d'eau.

2.2.1. Expérimentations en conditions contrôlées de laboratoire

2.2.1.a. Expérimentations *in vivo*

Les dreissènes sont réparties aléatoirement dans les aquariums en nombre suffisant pour assurer les expérimentations. Les aquariums sont équipés de bulleurs pour assurer l'aération durant les expositions. Des pompes sans filtre sont placées dans les aquariums pour maintenir une circulation de l'eau dans l'aquarium durant l'exposition. Des organismes dits témoins sont prélevés aléatoirement dans les aquariums avant chaque contamination pour vérifier que les individus ne présentaient pas les protozoaires d'intérêt au sein de leurs tissus au départ de l'exposition. Toutes les expérimentations sont réalisées en duplicat. Les prélèvements sont réalisés à différents temps en fonction des besoins de l'étude sur les dreissènes entières ou sur les organes (*i.e.* hémolymph, muscles, manteau, branchies, glande digestive et le reste des tissus). Durant les phases de dépuración, les dreissènes sont déplacées dans de nouveaux aquariums pour éviter tous risques de contaminations dues aux éventuels protozoaires qui persistent sur les parois des aquariums. L'intégralité de l'eau contaminée est

mise à ébullition avant d'être éliminée. Les aquariums et les pompes subissent plusieurs phases de décontamination : (1) séchage durant minimum 48h, (2) immersion dans de l'eau contenant du produit détergent durant minimum 24h, (3) rinçage par 3 passages en eau claire et (4) séchage.

2.2.1.b. Expérimentations *ex vivo*

L'hémolymphe des individus est prélevé directement dans le muscle adducteur après avoir formé une légère brèche de la coquille. Les échantillons sont gardés dans des tubes à hémolyse et sur glace afin de limiter l'agrégation cellulaire (Auffret et Oubella, 1997). Les hémolymphe sont poolés sur 6 individus puis observés au microscope afin de réaliser une numération sur une cellule de comptage de type Kova (Kova glasstic slides, VWR, Fontenay-sous-Bois, France).

2.2.2. Expérimentations en conditions *in situ*

Les dreissènes issues du lac du Der sont mises en stabulation au laboratoire comme décrit précédemment. Une semaine avant la campagne terrain, les dreissènes sont mises en cages à raison de 40 dreissènes par cage et gardées dans les aquariums afin de réduire le stress de la mise en cage. Durant le transport, les cages sont maintenues dans des boîtes fermées dans lesquelles une pastille d'oxygène est ajoutée pour éviter un stress hypoxique. Sur le terrain les cages sont maintenues pendant 1 mois par du fil de fer et des sardines de camping. La mortalité observée à la fin de l'expérimentation est de 2,3 % ($\pm$ 2.2). Une fois les cages prélevées et ramenées au laboratoire selon les conditions de transport décrites ci-dessus, l'intégralité des tissus est analysée pour la détection des protozoaires.

2.3. Analyses des protozoaires et des hémocytes de dreissènes par cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet l'analyse de cellules entraînées les unes derrière les autres dans un flux devant un laser. Grâce à la diffraction de la lumière à travers le laser, les paramètres morphologiques de la cellule (taille, complexité) peuvent être mesurés au niveau individuel. De plus, les cytomètres sont équipés de photomultiplicateurs capables de détecter plusieurs longueurs d'onde d'émission différentes ce qui permet la lecture de paramètres cellulaires après marquage des éléments avec des fluorochromes.

Les éléments analysés en cytométrie en flux (hémocytes et/ou oocystes) sont dans un premier temps, observés de manière directe sans aucun marquage afin de détecter et de calibrer la région d'intérêt et de supprimer les débris pouvant interférer avec l'analyse. La quantité de cellules par échantillon est ramenée à 10^5 dans du tampon PBS afin d'obtenir un volume final de 250 μ l quelles que soit les conditions testées. Les incubations avec les différents éléments sont réalisées à 16 °C sur le temps imparti en fonction des besoins de l'étude. Ensuite, afin de mesurer les différentes réponses, les éléments sont marqués à l'aide de différents fluorochromes ou d'anticorps monoclonaux.

2.3.1. Mortalité

A la fin du temps d'exposition lié aux besoins de l'étude, les éléments sont incubés 15 min avec 10 μ l d'iodure de propidium (IP, Sigma-Aldrich) à une concentration de 0,1 mg/ml dans un volume de 240 μ l de PBS (triplicat). L'IP est un fluorochrome de grande taille qui se fixe à l'ADN des échantillons uniquement lorsque les membranes cellulaires et nucléaires sont lésées. La lecture des échantillons est effectuée sur le capteur d'émission dans l'orange de 640 à 700 nm.

2.3.2. Capacité de phagocytose

La capacité de phagocytose est mesurée en incubant les hémocytes avec des billes de latex marquées à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) à raison de 5 billes par hémocyte pendant 4 h. A la fin de l'incubation, la fluorescence de la région d'intérêt est mesurée dans le capteur d'émission dans le vert de 500 à 550 nm.

L'échelle logarithmique est utilisée pour l'ensemble des signaux (taille, complexité, fluorescence). Les mesures sont effectuées sur $5 \cdot 10^3$ à 10^4 événements de la région d'intérêt préalablement définie. Des dots plots et des histogrammes de fluorescence sont générés et analysés avec le logiciel Fcs express 4 Plus software (version 4.07.0014, 2014, De Novo Software).

2.4. Traitement des tissus et détection des protozoaires

2.4.1. Digestion des tissus de dreissènes

Après la dissection, les échantillons (dreissènes entières ou organes hormis l'hémolymph) sont broyés dans une solution de trypsine 1X (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) pour faciliter la digestion des tissus et la libération des oocystes/kystes. Les échantillons sont ensuite incubés à 37 °C pendant 1 h 30 pour permettre l'action de l'enzyme. A la fin de l'incubation, les échantillons sont centrifugés à $1\,250 \times g$ pendant 5 min, le culot est récupéré et stocké à -80 °C jusqu'à l'étape suivante.

2.4.2. Détection des protozoaires

2.4.2.a. Lyse des oocystes/kystes

La forme oocyste ou kyste des protozoaires leur confère la particularité de survivre dans l'environnement à des conditions extrêmes. Avant de réaliser l'extraction d'ADN des protozoaires, il faut au préalable effectuer une phase de lyse des oocystes/kystes afin de casser leurs parois et accéder à l'ADN des protozoaires. La fragilisation des oocystes/kystes passe par des cycles de congélations à -80 °C pendant un minimum de 5 minutes en fonction de la taille et de la limpidité de l'échantillon et de décongélations à 95 °C pendant 4 minutes minimum. La destruction des parois se fait par un traitement à ultrasons pendant 1 min à une fréquence de 37 Hz (Ultrasonics 88155).

2.4.2.b. Extraction de l'ADN

L'ADN des échantillons est extrait avec le kit InstaGene Matrix (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) et selon les instructions du fabricant. Les échantillons sont culotés avant d'être incubés v/v avec l'InstaGene à 56 °C pendant 35 min. L'InstaGene est composé d'un tampon de lyse et de billes magnétiques capables de fixer les inhibiteurs de PCR contenus dans l'échantillon. Les échantillons sont ensuite vortexés pendant 10 sec et une phase de lyse à 99 °C pendant 8 min est réalisée. Une dernière centrifugation à 11 093 × g pendant 3 min permet de culoter les billes et les débris de l'échantillon. L'ADN contenu dans le surnageant est transféré dans de nouveaux tubes et conservés à -80 °C jusqu'à la prochaine étape.

2.4.2.c. PCR en temps réel

La détection des protozoaires a été réalisée grâce à la technique de PCR quantitative en temps réel de type Taqman. Cette technique utilise une sonde interne fluorescente spécifique du produit amplifié. Les amorces et les sondes utilisées pour la PCR sont détaillées dans le

tableau 1. Les amplifications par qPCR sont réalisées selon les instructions d'Actalia⁴ comme suit : 5 µl de l'ADN extrait des échantillons sont ajoutés à 20 µl de mix contenant 2X d'IQ supermix (Bio-Rad), 400 nM de chaque amorce et 200 nM de sonde. Un témoin négatif sans ADN a été ajouté à chaque plaque de qPCR pour contrôler l'absence de contamination extérieure qui peut produire une augmentation non spécifique de la fluorescence. Les échantillons sont transférés dans un détecteur CFX96 (Bio-Rad). L'ADN polymérase est activée après une phase de dénaturation de 3 min à 95 °C. Ensuite, 45 cycles de 15 sec à 95 °C suivis de 1 min à 60 °C sont réalisés.

Les résultats sont présentés en cycle seuil (threshold cycle : Ct). Le Ct correspond au cycle au cours duquel le signal d'émission de fluorescence devient significativement plus important que le bruit de fond de l'échantillon (Fig. 7). Le Ct est directement lié à la quantité d'ADN cible présent au début de la PCR. En effet, plus la quantité de matrice à amplifier est importante, plus le nombre de cycle requis pour dépasser le bruit de fond (Ct) sera faible.

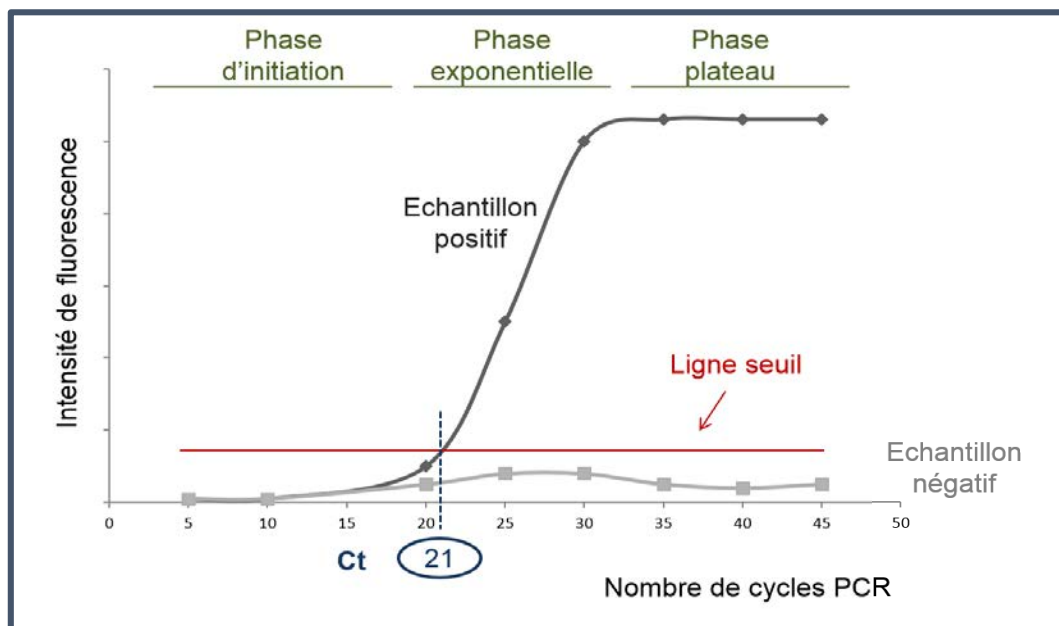


Figure 7 : Les différentes phases de la technique de qPCR qui permet la détermination du Ct d'un échantillon positif pour l'ADN cible.

⁴ Centre d'expertise agroalimentaire. Mise au point des protocoles de détections des protozoaires sur matrices alimentaires (voir partie Avant-propos).

Tableau 1 : Amorces et sondes utilisées pour la détection des protozoaires dans les tissus de *D. polymorpha* avec la technique de qPCR Taqman en temps réel.

Cibles	Référence GenBank	Séquence Amorces	Séquence Sondes	Références
Specific 452-bp <i>C.parvum/hominis</i> sequence (repeated 4x)	AF 188110	5'-CGCTTCTCTAGCCTTTTCATGT-3' 5'-CTTCACGTGTGTTTGCCAAT-3'	6FAM- CCAATCACAGAATCATCAGAATCGACT- BHQ1	(Fontaine et Guillot, 2002)
Small subunit ribosomal <i>G.duodenalis</i> RNA gene sequence (repeated 16x)	M 54878	5'-GACGGCTCAGGACAACGGTT-3' 5'-TTGCCAGAGGTGTCCG-3'	TxRd-CCCGCGGCGGTCCCTGCTAG-BHQ2	(Verweij et al., 2003)
<i>T.gondii</i> strain RH repeat region (repeated 200-300x)	AF 487550.1	5'-AGAGACACCGGAATGCGATCT-3' 5'-CCCTCTTCTCCACTCTTCAATTCT-3'	Cy3-ACGCTTTCCTCGTGGTGATGGCG-BHQ2	(Lélu et al., 2011)

3. Traitements statistiques des données

Les données ont été traitées à l'aide du logiciel de statistique SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Les résultats ont été traités à l'aide des tests non paramétriques Kruskal-Wallis et Mann-Whitney. Tous les résultats dont la significativité est établie le sont avec un intervalle de confiance à 95% ($p < 0.05$).

Chapitre 1 : Optimisation de la
détection des protozoaires
Cryptosporidium parvum, *Giardia*
duodenalis et *Toxoplasma gondii* en
conditions simple et complexe.

La recherche bibliographique a nettement souligné le manque d'information sur la recherche des 3 protozoaires d'intérêt en milieu continental. Les études disponibles utilisent la moule d'eau douce, *Dreissena polymorpha*, pour révéler la contamination biologique en *Cryptosporidium parvum* et *Giardia duodenalis* des cours d'eau. Cependant, aucune donnée n'est apportée pour le troisième modèle, *Toxoplasma gondii*.

La première partie de ce chapitre est consacrée à l'amélioration de la connaissance de la nature du toxoplasme afin de définir les conditions optimales de lyse de l'oocyste en vue de l'extraction de son ADN pour sa détection en qPCR. Différentes conditions de lyse ont été testées en conditions simples (oocystes dans du tampon phosphate de type PBS) alliant des traitements physiques et/ou enzymatiques et/ou chimiques afin d'accéder à l'ADN du toxoplasme. Puis la détection a été réalisée en PCR quantitative en temps réel afin de sélectionner le traitement le plus efficace applicable à *T. gondii* (Tableau 2 chap. 1.1).

Le second objectif de cette partie vise à mettre au point une méthode de détection simultanée des trois protozoaires à partir de la matrice dreissène : *T. gondii* mais aussi *C. parvum* et *G. duodenalis*, plus communément recherchés chez les mollusques. Les dreissènes ont été contaminées simultanément par les trois protozoaires à l'aide d'expositions *in vivo* au laboratoire. Plusieurs techniques de purification de la matrice ont été testées et évaluées pour libérer les parasites concentrés dans les tissus de dreissène en vue d'extraire l'ADN pour une détection en qPCR. (Tableau 2 chap. 1.2).

Tableau 2 : Les différentes conditions d'expérimentations présentées dans le chapitre 1.

N° Chapitre	Type exp	Pathogène(s)	Matrices	Réponse(s) mesurée(s)	Technique	Doses expérimentales	Phases exp	Traitement	Lyse	Extraction	N / condition	Résultats
1.1	ex vivo	T. gondii	PBS	Intensité de fluorescence	Cytométrie en flux	10 ⁴	-	Lavages	-	-	3	FL3/SSC + FL3/FSC + Gradient de fluorescence
				Nombre de cycle seuil	qPCR	5*10 ⁴		Purification CsCl	-	-		
								Lavages	6 cycles + 1 min US	-		
								Lavages	6 cycles + 1/5/10 min US	InstaGene	4	Ct
									1 / 5 / 10 min US			
				3 cycles + Prot K (+/- billes)								
1,6*10 ³	NaOCl + Prot K											
1.2	in vivo simultanée	les 3	Dreissènes entières	Nombre de cycle seuil	qPCR	560 oocystes_kystes /Dp/j	7 jours d'exposition	Délipidation + DE +/- IMS DE +/- IMS	6 cycles + 1 min US	InstaGene	4 pools de 3	Ct

Exp : expérimentation, Dp : *Dreissena polymorpha*, j : jour, DE : digestion enzymatique, IMS : séparation immunomagnétique, cycles : congélation/décongélation, US : ultrasons, Prot K : protéinase K, NaOCl : hypochlorite de sodium, Ct : cycle seuil

1. Evaluation de différents traitements de lyse sur les oocystes de *Toxoplasma gondii* : approches par cytométrie en flux et biologie moléculaire.

Ces dernières années, plusieurs équipes se sont intéressées au comportement de *T. gondii* dans différents milieux hydriques pour lequel peu d'informations étaient disponibles (Lindsay et al. 2003 ; Shapiro et al. 2009, 2010). Ces études ont mis en évidence une grande résistance de *T. gondii* envers les traitements généralement utilisés pour inactiver les protozoaires (Dauguschies et al. 2013). De plus, les propriétés de sa paroi confèrent aux oocystes une fluorescence naturelle sous UV. Le toxoplasme présente donc des avantages certains pour évaluer le comportement des protozoaires dans leur milieu. Pour ces raisons, les expérimentations suivantes ont été focalisées sur *T. gondii*. Dans un premier temps, le pouvoir discriminant de la technique de cytométrie en flux a été testé sur différentes populations d'oocystes. Dans un deuxième temps, plusieurs techniques de lyse des oocystes du toxoplasme ont été confrontées afin d'optimiser l'étape d'extraction d'ADN puis la détection par PCR quantitative.

Les oocystes de *T. gondii* ont été analysés par la technique de cytométrie en flux afin de déterminer l'effet des différents traitements utilisés pour la purification ou l'extraction des oocystes. Afin d'optimiser les analyses, il est important de travailler sur des échantillons les plus purs possible, c'est-à-dire dépourvus de débris qui pourraient interférer avec l'analyse. Trois échantillons issus de différentes populations de *T. gondii* ont donc été analysés au cytomètre (voir article n°2) :

- 1) des oocystes issus de fèces de chat, purifiés par des gradients de sucrose,
- 2) des oocystes 'purs' ayant subis une purification dans un gradient de chlorure de césium (CsCl) réalisée par A. Dumètre (UMR-MD3),

- **3)** des oocystes ayant reçu un traitement de lyse avec 6 cycles de congélation/décongélation suivis de 1 min d'ultrasons.

Les oocystes ont été incubés avec un marqueur fluorescent de viabilité, l'iodure de propidium (IP), pendant 15 min avant d'être analysés avec le cytomètre en flux. Les résultats indiquent une nette augmentation de la fluorescence en fonction des populations testées. Ainsi, les oocystes de la population **1** apparaissent avec une faible fluorescence alors que les oocystes de la population purifiée au CsCl (**2**) présentent un niveau de fluorescence intermédiaire et les oocystes lysés (**3**) indiquent un niveau de fluorescence maximum. Considérant *T. gondii*, l'intégration de l'IP ne représente pas nécessairement la viabilité du toxoplasme puisque la forme infectante, le sporozoïte, est contenu au sein des sporocystes eux même protégés dans l'oocyste. La plus forte intégration de l'IP dans les populations **2** et **3**, caractérisée par l'augmentation de la fluorescence, représente des sites de fixation supplémentaires pour l'IP certainement dus à une altération de la membrane des oocystes et des sporocystes. Ces résultats sont préliminaires mais ils indiquent le potentiel de la technique de cytométrie en flux pour discriminer différentes populations d'oocystes et pour déterminer l'état de dégradation des parois. En perspective, l'utilisation de la cytométrie en flux pourrait permettre de décrire l'état des oocystes de *T. gondii* après différents traitements menés au laboratoire (*i.e.* purification, extraction, viabilité) mais également sur des échantillons prélevés *in situ*, à la condition qu'ils soient au préalable concentrés et purifiés.

Les résultats de cytométrie indiquent une altération des parois des oocystes issus de la population **3** qui représente les oocystes traités en vue de l'extraction de l'ADN et d'une détection en qPCR. Cependant, une partie des oocystes, même altérés, restent visibles en cytométrie, ce qui suggère que l'ADN du toxoplasme n'est pas complètement accessible après le traitement. En vue d'approches moléculaires, les cycles de congélation/décongélation sont utilisés pour lyser la paroi des oocystes/kystes et accéder à l'ADN de protozoaires (Higgins et al. 2003 ; Yu et al. 2009 ; Kitajima et al. 2014). Cependant, la particularité du toxoplasme par rapport à *C. parvum* et *G. duodenalis* est de posséder une double protection des sporozoïtes

constituée des membranes de l'oocyste *et* des sporocystes ce qui contraint à compléter les cycles par des traitements complémentaires (Dumètre et Dardé, 2003).

Dans une deuxième partie, plusieurs conditions de lyse ont été testées dans le but d'obtenir une plus grande quantité d'ADN et de ce fait, améliorer le signal obtenu par qPCR (voir article n°2):

- **3)** oocystes ayant subis 6 cycles de chocs thermiques décrits précédemment suivis de 1 (condition 3.1), 5 (condition 3.5) ou 10 (condition 3.10) min d'ultrasons (US),
- **4)** oocystes ayant subis uniquement le traitement par ultrasons (1, 5 et 10 min respectivement pour les conditions 4.1, 4.5 et 4.10).
- **5)** oocystes ayant subis 3 cycles de chocs thermiques puis une digestion enzymatique avec de la protéinase K et une phase d'homogénéisation avec (condition 5.1) ou sans billes (condition 5).
- **6)** oocystes préalablement traités avec 3% d'hypochlorite de sodium (NaClO) avant la digestion à la protéinase K (condition 6).

Les résultats obtenus en Cycle seuil (Ct) moyen indiquent un Ct significativement plus important dans la condition **4** (Ct moyen de 23,6 ($\pm$ 0,4), 23,0 ($\pm$ 1,9) et 24,5 ($\pm$ 3,7) respectivement pour 1, 5 ou 10 min d'US) par rapport à la condition **3** (Ct moyen de 21,9 ($\pm$ 1,2), 21,6 ($\pm$ 0,9) et 21,1 ($\pm$ 1,9) après 1, 5 ou 10 min de traitement aux US respectivement). Puisque le Ct est inversement proportionnel à la quantité d'ADN dans l'échantillon, ces résultats confirment l'importance des cycles de congélation/décongélation pour casser les parois et accéder à l'ADN. De plus, pour la condition **3**, plus le temps du traitement par ultrasons est fort, plus le Ct moyen diminue. La quantité d'ADN cible est donc plus importante dans les échantillons ayant subis un temps de traitement d'US plus important. Cependant cette augmentation n'améliore pas significativement la détection.

Le traitement enzymatique à la protéinase K (**5**) améliore également la détection des oocystes puisqu'il permet de diminuer les cycles de congélation/décongélation à 3 au lieu de 6 (**3**) sans interférer sur la détection (Ct moyen de 25,6 ($\pm$ 0,3) et de 25,9 ($\pm$ 0,2) respectivement pour la condition **5** et **3**). Au contraire, l'ajout de billes pendant les étapes d'homogénéisation (**5.1**) ne

semble pas améliorer la détection (Ct de 27,7 ($\pm$ 0,2), ce qui est certainement imputable à une perte des oocystes durant les lavages. Finalement, la technique qui permet d'obtenir une meilleure détection est celle qui combine un traitement chimique 'NaClO/détergents' et une digestion enzymatique à la protéinase K (Ct de 23,53 ($\pm$ 0,2) pour la condition **6**).

**Article 2: Evaluation of lysis procedures on *Toxoplasma gondii* oocysts:
approach by flow cytometry and qPCR method.**

Soumis dans Applied and Environmental Microbiology (juillet 2014)

Mélissa Palos Ladeiro,^{a,b} Stéphanie La Carbona,^c Aurélien Dumètre,^d Aurélie Bigot-Clivot,^{a#}
Stéphane Betoulle,^a Jeanne Hohweyer,^b Catherine Cazeaux,^c Jitender P. Dubey,^e Isabelle
Villena,^b Alain Geffard,^a Dominique Aubert^b

Université de Reims Champagne Ardenne, Unité Stress Environnementaux et
BIOsurveillance des milieux aquatiques, UMR-I 02 (SEBIO), Reims, France^a ; Laboratoire de
Parasitologie-Mycologie, EA 3800, SFR CAP-Santé FED 4231, Hôpital Maison Blanche
Reims, France^b ; ACTALIA Sécurité des Aliments, Villers Bocage, France^c ; UMR-MD3
Infections Parasitaires, Transmission, Physiopathologie et Thérapeutique, Université d'Aix-
Marseille, Faculté de Pharmacie, Marseille, France^d ; United States Department of
Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville Agricultural Research Center, Animal
Parasitic Diseases Laboratory, Beltsville, USA^e

Running Title: *Toxoplasma gondii* oocysts lysis methods

#Address correspondence to Aurélie Bigot-Clivot, aurelie.bigot@univ-reims.fr.

Abstract

Contamination of environment by pathogens is a major concern for the regulatory authorities. The detection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* in terrestrial and aquatic environments is even more problematic because only cats can excrete the environmentally resistant oocysts. Flow cytometry (FCM) is increasingly used in environmental microbiology to detect and analyze pathogens because of its high speed data acquisition at the single-cell level. Our first aim was to evaluate flow cytometry as a tool to discriminate intact versus broken *T. gondii* oocysts following exposure to different physico-chemical treatments. We used FCM to determine the integrity of the oocyst wall by analyzing its natural autofluorescence and propidium iodide labeling. FCM analyses were performed on untreated oocysts, CsCl-purified oocysts, and oocysts subjected to 6 freeze-thaw cycles and 1 min sonication treatment. Secondly, we evaluated by qPCR the effectiveness of several lysis treatments to accurately disrupt the oocyst wall in view of molecular applications. We measured DNA concentration in samples and compared Ct (cycle threshold) value for each sample. Combining mechanical, enzymatic and chemical treatments appears to be the best method to break the *T. gondii* oocyst wall for DNA extraction purpose. These results highlight the usefulness of FCM to discriminate intact vs. broken oocysts following harsh physico-chemical treatments. Consequently, FCM could be a promising method for monitoring *T. gondii* oocysts in environmental samples and provide valuable information on the integrity, and so the possible viability, of the detected oocysts.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, oocysts, lysis, freeze-thaw, flow cytometry, qPCR

A. Introduction

Toxoplasma gondii is a coccidian parasite that infects all warm-blooded animals. One third of human population is infected by this pathogen. Clinical features can be more severe in immunocompromised people and fetus from non immune pregnant women (1). There are three infectious stages of *T. gondii*: the tachyzoite, the bradyzoite in tissue cysts, and the sporozoite present in oocysts (2). Several outbreaks of toxoplasmosis have been epidemiologically linked to consumption of water contaminated with *T. gondii* oocysts (3, 4, 5, 6). Hill et al. (7) recently identified a sporozoite-specific protein that differentiated oocyst versus tissue cyst infections and based on differential serological testing it has been suggested that oocyst induced infections are more common and clinically more severe than infections acquired by consumption of infected meat (8, 9).

Toxoplasma gondii, like other coccidia has a double layered oocyst wall allowing the enclosed sporozoites to survive harsh environmental conditions (10). A sporulated oocyst contains two sporocysts, each with four sporozoites (11). Since *T. gondii* oocysts are a threat to human population, many ways of oocysts inactivation have already been studied (for review see Dumètre and Dardé (12), 13, 14). However, the tough oocyst wall is resistant to different inactivation processes, including 5.25% (full strength) exposure to sodium hypochlorite solution (10).

Flow cytometry (FCM) is a quantitative method that permits measurements of physical or chemical characteristics of particles that pass through a focused laser beam. Thus, various parameters of an individual particle could be measured such as the forward angle light scatter (FSC), which provides information on the particle size, and the side angle light scatter (SSC) for information on the granularity and fluorescence of the particle (15). Additionally, some flow cytometers are capable to sort particles from different populations. Simple and rapid application of FCM is increasingly used in environmental microbiology studies (16).

Interestingly, the *T. gondii* oocyst is naturally blue fluorescent under UV excitation due to the presence of tyrosine-protein crosslinks in the oocyst wall and possibly in the sporocyst wall (17). This feature could be used directly in FCM analysis without need to label the oocyst wall. Zarlenga and Trout (18) reviewed methods to detect parasites in environmental samples of water. FCM technique appears to be not specific enough or sensitive to detect *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia duodenalis* cysts in environmental water samples because debris could impair the recovery. However, FCM seems to be useful in analyses of relatively clean samples.

Molecular tools, such as PCR assays, have been developed to detect environmental pathogens and assess their viability: quantitative PCR (qPCR) is a highly sensitive and specific method that permits to detect and quantify the pathogens in environmental samples whereas Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR) can detect specifically viable pathogens (19). However, PCR success is significantly related to the quantity and quality of the target DNA (20). Coccidian oocysts appear to be remarkably tough even if this robustness differ according to the genus (i.e. wall composition, presence of sporocysts (21)). Thus, it is necessary to break the oocyst wall for a consistent DNA extraction. Usually, freeze-thaw cycles were used to this purpose (22). In the case of the *T. gondii* oocyst, DNA extraction requires breaking the oocyst and the sporocyst walls to access the sporozoite DNA and thus, additional treatments have to be attempted to accurately break them (23).

First aim of this study was to discriminate intact versus broken *T. gondii* oocysts by using FCM. After inclusion with propidium iodide (PI), we measured the fluorescence (i.e. oocyst autofluorescence + PI labeling), the size (FSC) and the granularity (SSC) of (i) untreated oocysts (ii) oocysts purified on a discontinuous cesium chloride gradient and (iii) oocysts subjected to 6 freeze-thaw cycles followed by 1 min of sonication (US) (24). Our previous data underlined that the oocyst wall remains intact after these physical treatments and did not permit a consistent DNA extraction (unpublished data). Consequently, the second objective of the present study was to evaluate different methods for breaking the *T. gondii* oocyst wall in view

of molecular applications by (i) increasing US time or including beads during lysis procedure, (ii) incubating oocysts with proteinase K, and/or (iii) exposing the oocysts to a sodium hypochlorite solution. Then, we evaluated the DNA recovery for each condition by comparing by qPCR the cycle threshold (Ct) mean *per* condition.

B. Materials and methods

B.1. Oocysts

T. gondii oocysts were obtained in USDA (United States Department of Agriculture) by feeding tissue cysts of ME 49 or VEG strain to *Toxoplasma*-free cats as described by Dubey (25). The oocysts were floated from cat feces, washed, sporulated in 2% sulfuric acid as described (2). Oocysts were transported from USDA to France by air and stored at 4 °C until used. Oocysts of the VEG strain were further purified on CsCl gradient. Oocysts were stored at 4 °C in an aqueous solution containing 2 % H₂SO₄ and used within a year (Fig. 1).

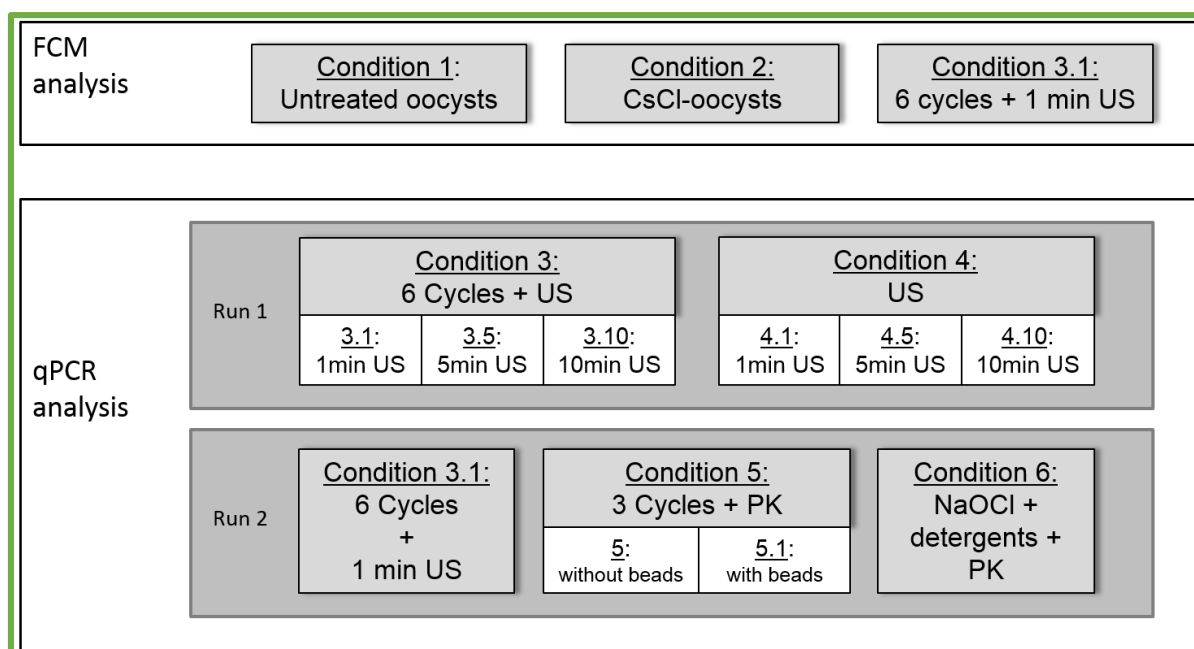


Fig. 1 : Experimental conditions for FCM and qPCR analysis (runs 1 and 2). CsCl: cesium chloride gradient; Cycles: freeze-thaw cycles; US: ultrasonic treatment; PK: proteinase K; NaOCl: sodium hypochlorite.

B.2. Experimental conditions

B.2.1. Condition 1: untreated oocysts

Prior to detection by FCM or DNA extraction, oocysts were washed three times in PBS at $3,600 \times g$ for 10 min to remove sulfuric acid.

B.2.2. Condition 2: oocysts purified by a CsCl gradient

A CsCl density gradient was performed according to Dumètre and Dardé (26). Briefly, freshly excreted oocysts were washed, twice in distilled water ($1200 \times g$, 10 min), once in Tris-EDTA (TE) buffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7.2–7.4), and suspended in TE buffer at a concentration of 4×10^7 oocysts/ml. A gradient was prepared in 7-ml ultracentrifuge tubes by overlaying 1.5 ml of CsCl 1.15 density with 1.5 ml of CsCl 1.10, 1.5 ml of CsCl 1.05 and 1 ml of oocysts in TE buffer. Following centrifugation at $16,000 \times g$, 60 min, 4 °C, the first 3 ml of supernatant including the 1.05/1.10 interface were collected and washed ($2500 \times g$, 15 min) once in 0.1 % Tween-80 dH₂O and once in distilled water alone. Oocysts were finally suspended in 2 % H₂SO₄ for storage until use. For FCM analysis, oocysts were washed three times in PBS at $3\,600 \times g$ for 10 min to remove sulfuric acid.

B.2.3. Condition 3: wall disruption by freeze-thaw cycles and sonication

Oocysts from condition 1 (5×10^4 in 50 µl per sample) were submitted to 6 freeze-thaw cycles consisting in freezing at -80°C for 5 min and thawing at 95°C for 4 min to weaken the wall. Then, samples were sonicated for 1 (condition 3.1), 5 (condition 3.5) or 10 min (condition 3.10) at 37 Hz (Ultrasonics 88155 water bath) to break the wall and then pelleted. Oocysts were kept in PBS at 4 °C until FCM analysis or DNA extraction.

B.2.4. Condition 4: wall disruption by sonication

Oocysts from condition 1 (5×10^4 in 50 μ l per sample) were sonicated for 1 (condition 4.1), 5 (condition 4.5) or 10 min (condition 4.10) as described above and kept in PBS at 4°C until DNA extraction.

B.2.5. Condition 5: enzymatic digestion by proteinase K

Oocysts from condition 1 (1.6×10^3 in 10 μ l) were submitted to 3 freeze-thaw cycles (-80°C, 5 min/ 95°C, 4 min) according to Villena et al. (27), and then incubated for 30 min at 37°C with proteinase K at a final concentration of 0.2 mg/ml. After addition of one volume of the InstaGene™ Matrix (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), oocyst wall disruption was achieved with (condition 5.1) or without glass beads (diameter 500 μ m: condition 5) in a cell homogenizer (Disruptor Genie, Scientific Industries) during 5 min. The oocysts were immediately processed for DNA extraction and qPCR.

B.2.6. Condition 6: chemicals and proteinase K

Oocysts from condition 1 (1.6×10^3 in 10 μ l) were treated as previously described for *Eimeria* oocysts (28). Briefly, oocysts were treated during 30 min on ice with a solution of sodium hypochlorite 3% in PBS (10). After 3 washings with PBS, oocysts were suspended in a lysis buffer (660 mM EDTA, 1.3 % N-lauroylsarcosine, 2 mg/ml proteinase K, pH 9.5) and incubated 45 minutes at 65°C. The oocysts were immediately processed for DNA extraction and qPCR.

B.3. Detection

B.3.1. Flow cytometry

To determine if FCM allows the discrimination of different oocyst subpopulations (intact vs. broken), aliquots of conditions 1, 2 and 3.1 (10^4 oocysts each) were suspended in 250 μ l of PBS. Samples were incubated 15 min with propidium iodide at 0.1 mg/ml. Experiments were realized in triplicate. Samples were then analyzed by a Becton Dickinson FACs Calibur (BD

biosciences, San Jose, USA) equipped with an argon ion laser (488 nm). Logarithmic signals were collected for all parameters with the followings settings: E_1 for the FSC, 250 V for the SSC and 520 V for the red fluorescence detector (FL3). Fcs express 4 Plus software (version 4.07.0014, 2014, De Novo Software) was used to analyze and merge the different dot plots or histograms.

B.3.2. DNA extraction

T. gondii DNA was extracted from the samples using an InstaGene™ Matrix kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and according to the manufacturer's instructions. Briefly, the oocysts were incubated with one volume of the matrix for 35 min at 56°C and vortexed at full speed for 10 s. After a boiling step for 8 min at 99°C, the matrix absorbs the cell lysis products that could interfere with the PCR amplification process. The samples were centrifuged at $11,093 \times g$ for 3 min and then the supernatants were carefully transferred to new tubes and stored at -80 °C until PCR experiments.

B.3.3. qPCR

Parasite detection was carried out by TaqMan qPCR in a CFX96 detector (Bio-Rad). We chose specific PCR primers and detection probe according to a partial sequence of *Toxoplasma gondii* strain RH repeat region (genbank accession number AF 487550.1) (29). Forward primer Toxoplasma F (5'-AGAGACACCGGAATGCGATCT-3'), reverse primer Toxoplasma R (5'-CCCTCTTCTCCACTCTTCAATTCT-3') and probe Toxoplasma P (Cy3-ACGCTTTCCTCGTGGTGATGGCG-BHQ2) were used (24). qPCR amplifications were performed as specified by the manufacturer's instructions in the following mixtures: 5 µL of extracted DNA sample were added to 20 µL of mix containing 2X iQ™ supermix (Bio-Rad), 400 nM of each primer and 200 nM of probe. A no-template control was executed. DNA polymerase was activated after an initial 3-min denaturation step at 95 °C. Then, the samples

were submitted to 45 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. Each sample was analysed in triplicate.

B.4. Statistical analyses

Comparisons between groups were realized using the non-parametric Mann-Whitney *U*-test. All statistical tests were performed using SPSS software for Windows v10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences were considered significant when $p < 0.05$.

C. Results

C.1. Flow cytometry

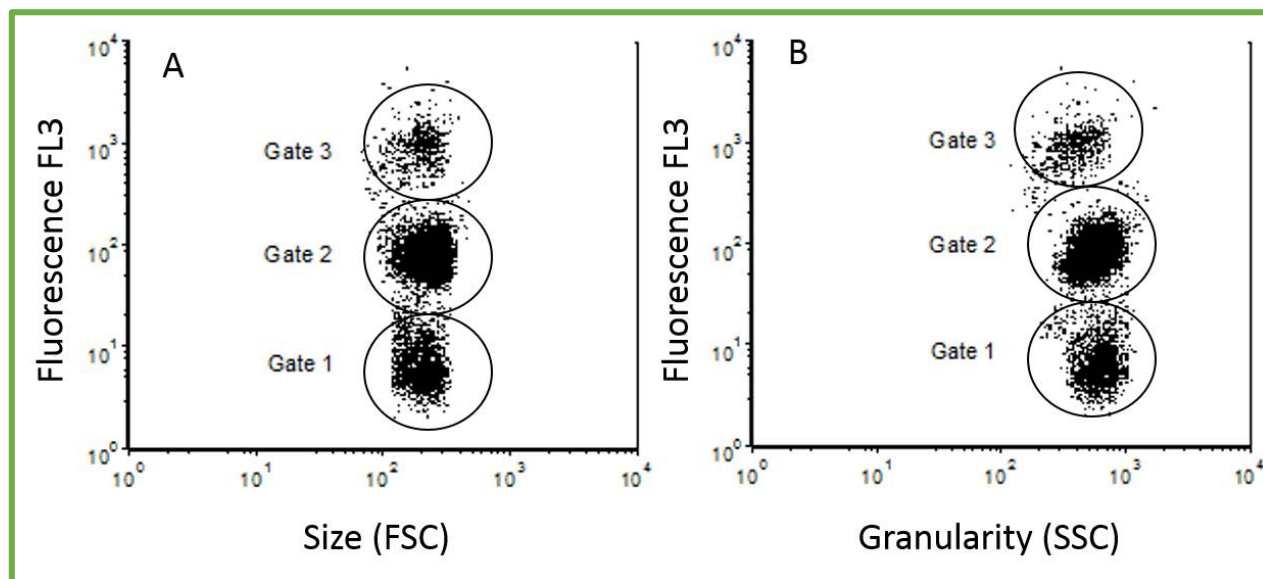


Fig. 2 : FSC/FL3 (A) and SSC/FL3 (B) dot plots of oocysts measured by flow cytometry after 15 min incubation with PI. Gate 1: untreated oocysts (condition 1); Gate 2, CsCl-purified oocysts (condition 2); Gate 3, oocysts subjected to freeze-thaw cycles and 1 min of sonication (condition 3.1).

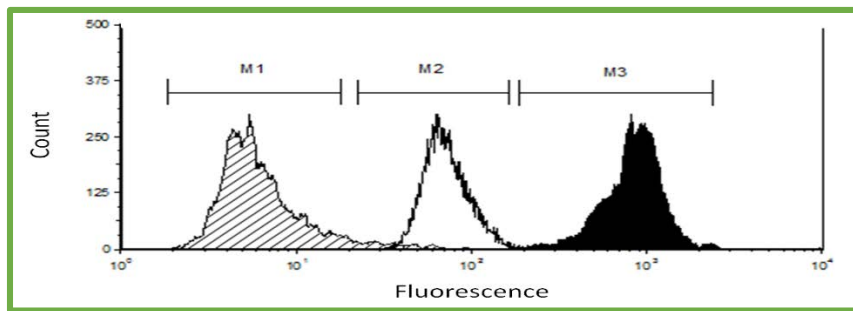


Fig. 3 : Merge of fluorescence histograms of oocysts obtained by FCM after 15 min incubation with PI. M1: untreated oocysts (condition 1); M2, CsCl-purified oocysts (condition 2); M3, oocysts subjected to freeze-thaw cycles and 1 min of sonication (condition 3.1).

Fresh untreated *T. gondii* oocysts, Cs-Cl-purified oocysts, and oocysts subjected to freeze-thaw cycles and 1 min of sonication were analyzed by FCM. Oocysts were first gated on SSC/FSC dot plots to remove other particles and debris in order to facilitate the analyses (unpublished data). The observed fluorescence represented the combination of natural fluorescence and the PI fluorescence since natural fluorescence of the oocysts was measurable in FL3 (data not shown). After incubation with PI, oocysts were gated using a FSC/FL3 (Fig. 2A) and SSC/FL3 (Fig. 2B). Untreated oocysts (gate 1) had a lower fluorescence level than CsCl-purified ones (gate 2). The highest fluorescence signal was recorded for oocysts submitted to 6 freeze-thaw cycles and 1 min of sonication (gate 3). Observation of FSC (Fig. 2A) and SSC (Fig. 2B) did not underline any significant variation in the size and granularity of oocysts from each condition. FL3 histogram was generated for each condition and merged to compare the level of fluorescence (natural + PI: Fig. 3). Again, the lowest fluorescence level was recorded for untreated oocysts and the highest for the oocysts subjected to freeze-thaw cycles and 1 min of sonication.

C.2. qPCR

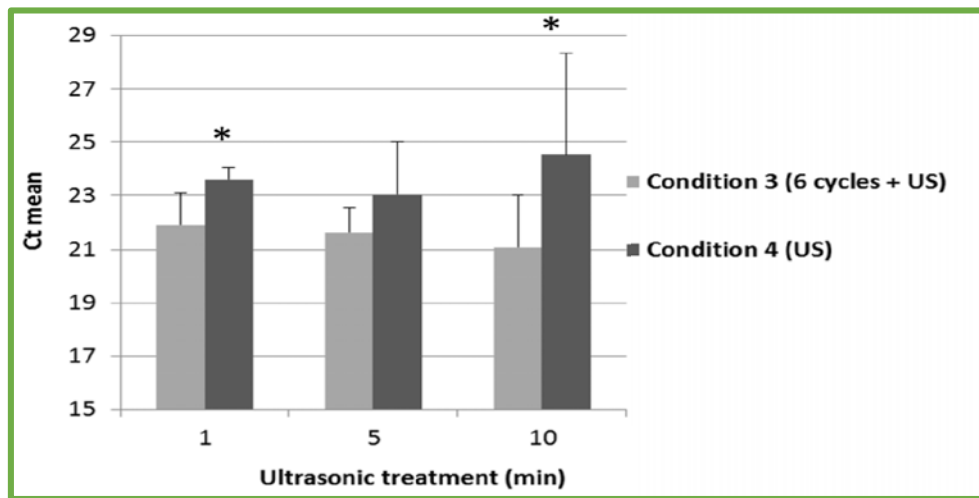


Fig. 4 : Ct mean (and standard deviation) obtained by TaqMan real-time qPCR on DNA extracted from *T. gondii* oocysts subjected to freeze-thaw cycle and sonication (US) treatment (condition 3) or sonication alone (condition 4). * Significant difference between conditions (N = 3 per condition, Mann-Whitney *U*-test, $p < 0.05$).

Firstly, qPCR was realized in order to evaluate the sonication treatment alone (condition 4) or in combination to freeze-thaw cycles (condition 3, Fig. 4). For both conditions, sonication was realized for 1, 5 or 10 min. Cycle threshold (Ct) value is defined as the point at which amplification curve of the samples crosses the threshold line. Thus, an early Ct value indicates high amount of DNA in sample. Irrespective of sonication duration, condition 3 gave lower Ct values than for condition 4 (Fig. 4), significantly following 1 and 10 min of sonication ($p < 0.05$). For the condition 3, Ct means were 21.9 ± 1.2 , 21.6 ± 0.9 , and 21.1 ± 1.9 respectively for 1, 5 or 10 min of sonication treatment. For condition 4, Ct means were 23.6 ± 0.4 , 23.0 ± 1.9 , and 24.5 ± 3.7 respectively for 1, 5 or 10 min of sonication treatment.

Secondly, the effect of enzymatic lysis (proteinase K) on the efficiency of DNA extraction was evaluated in combination of 3 freeze-thaw cycles (condition 5, Fig. 5) as previously described (27) instead of 6 cycles as performed in condition 3. Although less freeze-thaw cycles were performed, the Ct value was 25.6 ± 0.3 , which was similar to the one obtained with condition 3 (25.9 ± 0.2 ; Fig. 5). Following combination of mechanical treatment with glass beads (diameter 500 μm) and proteinase K incubation, Ct values increased to 27.7 ± 0.2 . This was also observed with smaller beads (106 μm ; data not shown). Finally, chemical treatments

(NaOCl and high detergent concentrations) combined to proteinase K significantly improved the efficiency of DNA extraction with a Ct of 23.5 ± 0.2 ($p < 0.05$), which corresponds to 5.46 times ($2^{2.45}$) more DNA amount than in condition 3.

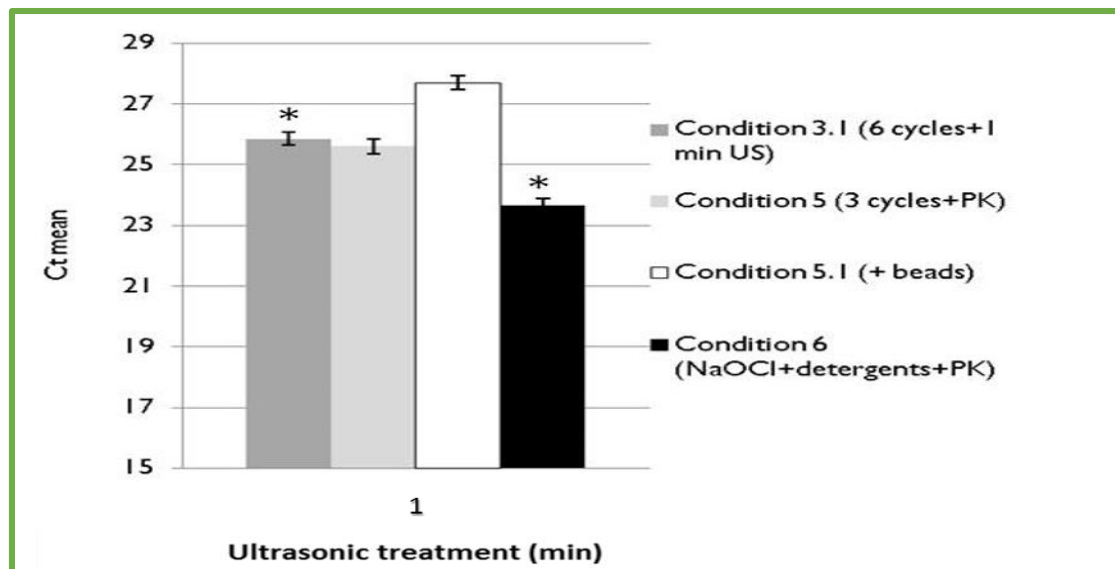


Fig. 5 : Ct mean (and standard deviation) obtained after TaqMan real-time qPCR on DNA extracted from *T. gondii* oocysts subjected to freeze-thaw cycle and sonication (US) (conditions 3), freeze-thaw cycle and proteinase K digestion without (condition 5) and with beads (condition 5.1), or chemical and enzymatic treatments (condition 6). * Significant difference between conditions (N = 4 per condition, Mann-Whitney U-test, $p < 0.05$).

D. Discussion

FCM appears to be a promising tool in environmental microbiology and has been used previously with coccidian parasites (30). Power et al. (31) combined immunomagnetic separation and FCM for the detection of *C. parvum* oocysts in feces. They found that this method was more sensitive than formol-ether concentration, which is commonly used for *C. parvum* investigations. Dixon et al. (32) proposed to combine FCM with immunofluorescence to improve the specific detection of *G. duodenalis* in fecal samples. Here, we used the exclusion dye propidium iodide (PI) that discriminates live and dead cells to facilitate detection

of *T. gondii* oocysts by FCM. In viability assay, dead cells cannot exclude PI because of damaged plasma membrane and become more fluorescent than living cells. PI has already been used for accessing the viability of protozoan cysts and oocysts such as the *C. parvum* oocysts that do not possess any sporocyst to protect their sporozoites (33, 34) in contrast to the *T. gondii* oocysts. In addition, the bilayered oocyst wall of *C. parvum* is cysteine-rich (35) whereas the bilayered *T. gondii* oocyst wall and probably the sporocyst wall contain cysteine- and tyrosine-rich proteins that confer the great robustness of these structures (36, 37). Consequently, the oocyst and sporocyst walls and then the sporozoite plasma membrane have to be altered to allow PI infiltration. The results of the present study reveal that FCM can detect PI-positive *T. gondii* oocysts subjected or not to different physical treatments (freeze-thaw cycles and sonication) in order to break their walls. CsCl-purified oocysts are more fluorescent than untreated ones suggesting that they integrated more PI and, consequently, that their wall was damaged. It is unlikely that *T. gondii* CsCl-purified oocysts were of VEG strain and untreated or frozen-thawed and sonicated oocysts were ME 49. Besides a possible effect of CsCl on the oocyst wall (yet to be determined), we cannot exclude others parameters, such as oocyst age or storage conditions, affecting the oocyst wall integrity. Vesey et al. (38) have analyzed unpurified *C. parvum* oocysts from bovine feces. They highlighted that FCM could determine if oocysts are intact or empty since intact oocysts had a higher FSC values. They explained the relatively small differences in SSC of the different oocyst populations by the fact that SSC of oocysts was mainly due to the highly reflective oocyst wall. Moreover, they observed an increase of the permeability of the oocyst outer wall during excystation process, which clearly confirms the integration of PI. Our results did not underscore neither fluctuations in FSC nor in SSC values suggesting that oocysts present in gates 1, 2 and 3 had the same size and granularity, but probably with more or less degraded walls. Our FCM profiles were in accordance with a previous study that use FCM combining to Nile red staining to discriminate the oocyst wall from the sporocysts of *T. gondii* (39). These results confirm that FCM could discriminate different oocyst subpopulations even with a small level of fragmentations of their

wall. Nevertheless, our FCM acquisitions had been realized on oocyst suspensions with a relatively high level of purity and represent one limitation of this study. Moreover, we also have to use combination of fluorescent dyes, such as DAPI and PI to measure other biological parameters (40). DAPI is a small fluorochrome that easily penetrates into the cells and stains selectively adenine- and thymine-rich region whereas PI is larger and can enter into the cells only if their plasma membrane is were damaged. Thus, DAPI+/PI- staining could represent viable sporulated oocysts and DAPI+/PI+ dead ones. In case of *T. gondii*, DAPI could not pass through intact oocyst and sporocyst walls. Also DAPI+/PI- represent viable oocysts but with crack in their oocysts and sporocyst walls. In case of sanitary biomonitoring, accurate risk management could not be limited only on detection of protozoa in environmental samples but also on their potential infectivity for people. In this purpose, FCM appears to be a relevant method to approach the oocyst viability with a high-throughput acquisition at the single-cell level.

FCM analyses underline that freeze-thaw cycles and sonication treatment alter the integrity of the oocysts wall. Oocysts are still observed in FSC and SSC dot plots for condition 3 (Fig. 2A and 2B) showing that oocysts are not entirely destroyed. The oocyst of *T. gondii* is known to resist to numerous physical and chemical treatments because of its robust wall (23, 41). It is composed of two layers that are not tightly linked: a thin outer layer and a thicker inner one. This latter provides the overall robustness of the oocyst wall (10, 42). Hence, access to DNA in sporozoites largely depends on the efficiency of the removal of these different layers or of the opening of the oocyst wall. Our protocol combines a series of freeze-thaw cycles to weaken the oocysts and sonication to break the oocyst and sporocyst walls. Obviously, these physical treatments alter the membrane integrity of the oocyst wall but some interrogations are expected about the access to sporozoite DNA in the sporocysts. Indeed, if some oocysts or sporocysts are still intact after the lysis treatment, we could not access to the DNA in view of amplification process and this will limit the detection by PCR method.

The second objective of this study was to improve DNA extraction in view of qPCR investigations. We combined different techniques including mechanical, and/or enzymatic and/or chemical lyses. Mechanical lyses included freeze-thaw cycles, sonication and/or glass beads. We observed that freeze-thaw cycles contributed to a great extent to improve DNA extraction since Ct values were lower than those without freezing-thawing irrespective of the sonication duration. Increasing sonication time slightly improved Ct values in our study (-0.8 Ct between 1 and 10 min sonication). Shaking oocysts with glass beads (condition 5.1) did not enhance release of DNA from oocysts and even induced DNA loss probably by adhesion to the beads (28, 43). In separate experiments, we performed enzymatic and/or chemical lyses in order to digest the wall proteins. Enzymatic lysis using proteinase K (condition 5) had a positive effect on DNA extraction since Ct values did not differ from condition 3 where more cycles were attempted. Pre-treating the oocysts with sodium hypochlorite solution, in order to remove the outer layer of the oocyst wall (10), and high concentrations of detergents significantly improved the release of DNA from the oocysts as a decrease of 2.45 Ct was observed. This protocol allowed to reach detection and quantification limits of 0.07 and 0.8 oocyst per reaction (data not shown). All together, these results demonstrate that physical and chemical treatments of the oocyst wall are required to enhance DNA extraction from the encapsulated *T. gondii* sporozoites. Thus, an optimal procedure to extract total DNA from oocyst should include at least 3 steps: (i) removal of the outer layer of the oocyst wall by hypochlorite sodium (ii) weakening of the inner layer by mechanical lysis combining 6 freeze-thaw cycles and at least 1 minute of sonication which favor the liberation of sporocysts and break of the sporocyst wall (44), (iii) digestion/solubilization of the inner layer of the oocyst wall, of the sporocyst wall and of the sporozoite membrane using proteinase K and detergents. A microscopic analysis should be conducted after the implementation of such a protocol to check if walls are efficiently altered following each of these steps. Freyre and Falcón (44) evaluated various methods for excystation of *T. gondii* sporozoites and recommended a final protocol combining Na₂CO₃, CO₂ and US for massive excystation of viable sporozoites. Moreover, they

found that no sporocysts were released when US were omitted from the procedure suggesting that a physical stimulus is needed to induce excystation. It is important to note that implementation of various treatments could be associated to a loss of DNA at each step, which could limit the gain in Ct values. Once again, our samples were sucrose-purified and conditions of DNA extraction were probably better than in environmental samples. Indeed, pathogens are diluted in environmental samples where high levels of PCR inhibitors are present (20). Methods that are able to enhance the detection level of few pathogens are essential to obtain accurate results. To complete this data, further experiments have to investigate freezing in liquid nitrogen, which was shown to improve DNA extraction from *G. duodenalis* cysts (45), increasing time and/or number of freeze-thaw cycles, and sonication duration and intensity. However, it is necessary to pay attention that such treatments are not excessively aggressive to damage DNA and impair PCR detection of such parasitic pathogens.

Here, we propose to use flow cytometry technique as a promising tool for the detection of oocysts present in environmental samples. In combination with vital dyes, it is possible to detect and to reveal the potential infectivity of oocysts in the same step. Coupling with the capacity of some cytometers to sort particles, oocysts could be separated for other complementary analysis such as microscopic analyses that bring a lot of information in general characteristics of oocysts or sporocysts wall. For molecular assays, our results demonstrate that a combination of mechanical, enzymatic and chemical lyses is essential to access *T. gondii* DNA.

Acknowledgements

This research was part of PhD thesis of senior author who was supported by grants from the region Champagne-Ardenne (projet INTERBIO). Financial support was provided by CNRS-INSU (Programme EC2CO, projet IPAD) and the Programme Interdisciplinaire de Recherche sur l'Environnement de la Seine (PIREN-Seine), and the region council of Basse-Normandie.

References

1. **Robert-Gangneux F, Dardé ML.** 2012. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**:264-296.
2. **Dubey JP.** 2010. *Toxoplasmosis of animals and humans*, 2nd Ed, CRC Press, Boca Raton, Florida. 1-313.
3. **Benenson MW, Takafuji ET, Lemon SM, Greenup RL, Sulzer AJ.** 1982. Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *New Engl. J. Med.* **307**:666–669.
4. **Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaac-Renton JL, Bell A, Eng SB, Marion SA.** 1997. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet* **350**:173–177.
5. **De Moura L, Bahia-Oliveira LMG, Wada MY, Jones JL, Tuboi SH, Carmo EH, Ramalho WM, Camargo NJ, Trevisan R, Graça RMT, Da Silva AJ, Moura I, Dubey JP, Garrett DO.** 2006. Waterborne toxoplasmosis, Brasil, from field to gene. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:326-329.
6. **Jones JL, Dubey JP.** 2010. Waterborne toxoplasmosis-Recent developments. *Exp. Parasitol.* **124**:10-25.
7. **Hill D, Coss C, Dubey JP, Wroblewski K, Sautter M, Hosten T, Muñoz-Zanzi C, Mui E, Withers S, Boyer K, Hermes G, Coyne J, Jagdis F, Burnett A, McLeod P, Morton H, Robinson D, McLeod R, Toxoplasmosis Study Group.** 2011. Identification of a sporozoite-specific antigen from *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* **97**:328-337.
8. **Boyer K, Hill D, Mui E, Wroblewski K, Karrison T, Dubey JP, Sautter M, Noble AG, Withers S, Swisher C, Heydemann P, Hosten T, Babiarz J, Lee D, Meier P, McLeod R.** 2011. Unrecognized ingestion of *Toxoplasma gondii* oocysts leads to congenital toxoplasmosis and causes epidemics in North America. *Clin. Infect. Dis.* **53**:1081–1089.
9. **Torrey EF, Yolken RH.** 2013. *Toxoplasma* oocysts as a public health problem. *Trends Parasitol.* **29**:380-384.

10. **Dumètre A, Dubey JP, Ferguson DJP, Bongrand P, Azas N, Puech P-H.** 2013. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **110**:11535–11540.
11. **Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA.** 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin. Microbiol. Rev. **11**:267–299.
12. **Dumètre A, Dardé ML.** 2003. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? FEMS Microbiol. Rev. **27**:651–661.
13. **Wainwright KE, Miller MA, Barr BC, Gardner IA, Melli AC, Essert T, Packham AE, Truong T, Lagunas-Solar M, Conrad PA.** 2007a. Chemical inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. J. Parasitol. **93**:925–931.
14. **Wainwright KE, Lagunas-Solar M, Miller MA, Barr BC, Gardner IA, Pina C, Melli AC, Packham AE, Zeng N, Truong T, Conrad PA.** 2007b. Physical inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. Appl. Environ. Microbiol. **73**:5663-5666.
15. **Vesey G, Hutton P, Champion A, Ashbolt N, Williams KL, Warton A, Veal D.** 1994. Application of flow cytometric methods for the routine detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. Cytometry **16**:1–6.
16. **Czechowska K, Johnson DR, van der Meer JR.** 2008. Use of flow cytometric methods for single-cell analysis in environmental microbiology. Curr. Opin. Microbiol. **11**:205–212.
17. **Belli SI, Smith NC, Ferguson DJP.** 2006. The coccidian oocyst: a tough nut to crack! Trends Parasitol. **22**:416–423.
18. **Zarlenga DS, Trout JM.** 2004. Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. Vet. Parasitol. **126**:195–217.
19. **Botes M, de Kwaadsteniet M, Cloete TE.** 2013. Application of quantitative PCR for the detection of microorganism in water. Anal. Bioanal. Chem. **405**:91-108.
20. **Loge FJ, Thompson DE, Call DR.** 2002. PCR detection of specific pathogens in water: a risk-based analysis. Environ. Sci. Tech. **36**:2754–2759.

21. **Mai K, Sharman PA, Walker RA, Katrib M, De Souza D, McConville MJ, Wallach MG, Belli SI, Ferguson DJP, Smith NC.** 2009. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **104**:281-289.
22. **Yu X, Van Dyke MI, Portt A, Huck PM.** 2009. Development of a direct DNA extraction protocol for real-time PCR detection of *Giardia lamblia* from surface water. *Ecotoxicol.* **18**:661-668.
23. **Villegas EN, Augustine SAJ, Villegas LF, Ware MW, See MJ, Lindquist HDA, Schaefer FW 3rd, Dubey JP.** 2010. Using quantitative reverse transcriptase PCR and cell culture plaque assays to determine resistance of *Toxoplasma gondii* oocysts to chemical sanitizers. *J. Microbiol. Methods* **81**:219–25.
24. **Palos Ladeiro M, Aubert D, Villena I, Geffard A, Bigot A.** 2014. Bioaccumulation of human waterborne protozoa by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): Interest for water biomonitoring. *Water Res.* **48**:148–155.
25. **Dubey, JP.** 1995. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *J. Parasitol.* **81**:410-415.
26. **Dumètre A, Dardé ML.** 2004. Purification of *Toxoplasma gondii* oocysts by cesium chloride gradient. *J. Microbiol. Methods* **56**:427–30.
27. **Villena I, Aubert D, Gomis P, Ferté H, Ingland JC, Denis-Bisiaux H, Dondon JM, Pisano E, Ortis N, Pinon JM.** 2004. Evaluation of strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4035-4039.
28. **Zhao X, Duszynski DW, Loker ES.** 2001. A simple method of DNA extraction for *Eimeria* species. *J. Microbiol. Methods* **44**:131–137.
29. **Reischl U, Bretagne S, Krüger D, Ernault P, Costa JM.** 2003. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect. Dis.* **3**:1–9.
30. **Bergquist PL, Hardiman EM, Ferrari BC, Winsley T.** 2009. Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology. *Extremophiles* **13**:389–401.

31. **Power M, Shanker S, Sangster N, Veal D.** 2003. Evaluation of a combined immunomagnetic separation/flow cytometry technique for epidemiological investigations of *Cryptosporidium* in domestic and Australian native animals. *Vet. Parasitol.* **112**:21–31.
32. **Dixon BR, Parenteau M, Martineau C, Fournier J.** 1997. A comparison of conventional microscopy, immunofluorescence microscopy and flow cytometry in the detection of *Giardia lamblia* cysts in beaver fecal samples. *J. Immunol. Methods* **202**:27–33.
33. **Campbell AT, Robertson LJ, Smith HV.** 1992. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3488–3493.
34. **Foster JC, Glass MD, Courtney PD, Ward LA.** 2003. Effect of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Food Microbiol.* **20**:351–357.
35. **Carey CM, Lee H, Trevors JT.** 2004. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res.* **38**:818–862.
36. **Possenti A, Cherchi S, Bertuccini L, Pozio E, Dubey JP, Spano F.** 2010. Molecular characterisation of a novel family of cysteine-rich proteins of *Toxoplasma gondii* and ultrastructural evidence of oocyst wall localisation. *Int. J. Parasitol.* **40**:1639–1649.
37. **Fritz HM, Bowyer PW, Bogyo M, Conrad PA, Boothroyd JC.** 2012. Proteomic analysis of fractionated *Toxoplasma* oocysts reveals clues to their environmental resistance. *PLoS One* **7**.
38. **Vesey G, Griffiths KR, Gauci MR, Deere D, Williams KL, Veal DA.** 1997. Simple and rapid measurement of *Cryptosporidium* excystation using flow cytometry. *Int. J. Parasitol.* **27**: 1353–1359.
39. **Everson WV, Ware MW, Dubey JP, Lindquist HDA.** 2002. Isolation of purified oocyst walls and sporocysts from *Toxoplasma gondii*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **49**: 344–349.
40. **Robertson LJ, Campbell AT, Smith HV.** 1992. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl. Environ. Microbio.* **58**: 3494–3500.

41. **Ware MW, Augustine SAJ, Erisman DO, See MJ, Wymer L, Hayes SL, Dubey JP, Villegas EN.** 2010. Determining UV inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts by using cell culture and a mouse bioassay. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 5140–5147.
42. **Speer CA, Clark S, Dubey JP.** 1998. Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* **84**: 505–512.
43. **Matthews KE, Keating A.** 1996. Bead transfection of adherent cells. Gene transfer into adherent mammalian cells using glass beads. *Mol. Biotechnol.* **5**: 259–261.
44. **Freyre A, Falcón J.** 2004. Massive excystation of *Toxoplasma gondii* sporozoites. *Exp. Parasitol.* **107**: 72–77.
45. **Adamska M, Leońska-Duniec A, Maciejewska A, Sawczuk M, Skotarczak B.** 2010. Comparison of efficiency of various DNA extraction methods from cysts of *Giardia intestinalis* measured by PCR and TaqMan real time PCR. *Parasite* **17**: 299–305.

2. Détermination d'une méthode commune de purification pour la détection des trois protozoaires à partir de la matrice dreissène.

2.1. Introduction :

Dans le cas des matrices complexes comme les mollusques bivalves, il est nécessaire d'avoir accès aux protozoaires (donc de digérer au mieux les tissus) tout en minimisant le volume final pour limiter la présence de résidus qui pourraient interférer avec la réaction de détection. Néanmoins, les trois étapes principales du processus de détection restent 1) la concentration des protozoaires dans l'échantillon, 2) la purification et 3) la détection, comme c'est le cas pour les matrices 'simples' de type *eau*.

La capacité de la moule d'eau douce, *D. polymorpha*, à accumuler et à concentrer *C. parvum* et *G. duodenalis* a déjà été démontrée dans plusieurs études au laboratoire comme sur le terrain (Graczyk et al. 2001, 2003, 2004 ; Lucy et al. 2008). Dans ces études, la technique utilisée pour concentrer *C. parvum* et *G. duodenalis* dans les chairs de dreissène est constituée d'une étape d'homogénéisation des tissus dans du tampon phosphate de type PBS et d'une filtration suivie d'une sédimentation de l'échantillon. Puis, une étape de purification sur un gradient de chlorure de césium est réalisée afin de détecter les protozoaires à l'aide de la technique d'immunofluorescence.

Au départ de ces travaux de thèse, il n'y avait aucune information dans la littérature sur l'accumulation de *T. gondii* par les dreissènes. Cependant l'accumulation de ce protozoaire avait été démontrée chez d'autres bivalves tels que la moule marine *Mytilus galloprovincialis* (Arkush et al. 2003), et l'huître *Crassostrea virginica* (Lindsay et al. 2001).

Les étapes de concentration et de purification sont matrice-dépendantes et il est nécessaire de tester leur efficacité, surtout dans les cas de matrices dites 'complexes' où une interaction matrice-protozoaires peut exister. Par exemple, dans le cas des huîtres et au vue de la grande

quantité de lipides dans les tissus, la délipidation à l'éther est souvent utilisée puisqu'elle permet d'obtenir des échantillons aux volumes plus faibles et donc plus concentrés. En effet, pour réaliser une extraction d'ADN, il est primordial de travailler sur un milieu simplifié et dépourvu de débris pour permettre une extraction optimale.

Le but de ce travail, réalisé en conditions contrôlées, est de définir une méthode unique de concentration et d'extraction d'ADN pour les trois protozoaires à partir des tissus de dreissènes. Différents critères ont été considérés, tels que 1) la faisabilité en routine (nombre d'étapes minimum et diminution des risques de contamination), 2) la taille du culot obtenu (le plus petit possible : concentration maximale) et 3) l'aspect du culot (présence ou non de débris).

2.2. Matériels et Méthodes

2.2.1. Conditions d'expositions des dreissènes aux protozoaires

Pour optimiser la détection des trois protozoaires dans la matrice « dreissène », une exposition simultanée à *C. parvum*, *G. duodenalis* et *T. gondii* a été réalisée sur 7 jours. Les dreissènes ont été aléatoirement divisées en 2 groupes de 35. Chaque groupe a été placé dans un aquarium de 5 L contenant 3 L d'eau de source et a reçu une surcharge quotidienne de 560 oocystes ou kystes de chaque protozoaire par dreissène. Les analyses ont été effectuées après 7 jours d'exposition sur l'intégralité des tissus mous des dreissènes (N = 4 pools de 12 dreissènes : Fig. 8).

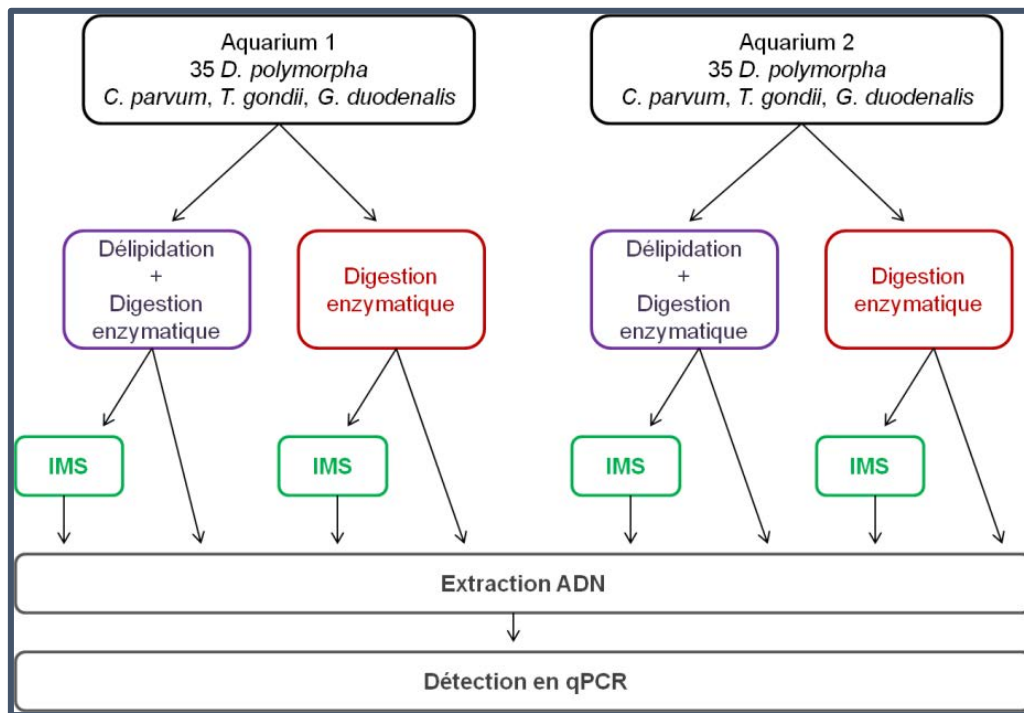


Figure 8 : Plan expérimental pour la validation d'une méthode commune pour la détection des protozoaires à partir des tissus de dreissènes.

2.2.2. Traitement des échantillons

2.2.2.a. Concentration et purification

i) Délipidation

La moitié des échantillons a subi une délipidation à l'éther diéthylique suivie d'une étape de digestion enzymatique à la trypsine. Les échantillons de chairs (dreissènes entières) sont homogénéisés dans du PBS avant d'ajouter l'éther à raison d'un volume d'éther pour 2 volumes de PBS. Les échantillons sont centrifugés à $1\,250 \times g$ pendant 5 min. Les culots obtenus sont lavés 3 fois dans du PBS avant l'étape suivante.

ii) Digestion enzymatique

Directement après la dissection ou après la phase de délipidation, les échantillons (dreissènes entières) sont broyés dans 2 volumes d'une solution de trypsine 1X (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Les échantillons sont ensuite incubés sous agitation à $37\,^{\circ}\text{C}$ pendant 1 h 30 puis centrifugés à $1\,250 \times g$ pendant 5 min. Le culot obtenu est divisé en 2. La

première moitié a subi une purification supplémentaire avec la technique de séparation immunomagnétique (pour *C. parvum* et *G. duodenalis*) alors que la deuxième moitié subit directement l'extraction d'ADN (Fig. 8).

iii) Séparation immunomagnétique

Les échantillons sont incubés dans des tubes de Leighton avec des billes magnétiques anti-*Cryptosporidium* et anti-*Giardia* et agités pendant 1 h sur un portoir rotatif à 40 RPM permettant le couplage billes-*Cryptosporidium* et billes-*Giardia*. Les échantillons sont ensuite transférés sur un portoir magnétique et des phases de contact statique de 10 minutes suivies de retournements manuels sont réalisées pour permettre l'adhérence du complexe bille-parasite sur les parois des tubes. Le surnageant est ensuite aspiré délicatement à l'aide d'une pipette pasteur puis éliminé. Afin de rompre les liaisons billes-parasites, 0,1 M d'HCl est ajouté aux échantillons. Les échantillons sont vortexés pendant 3 min puis un contact statique de 10 min est observé avant de transférer une dernière fois les tubes sur le portoir aimanté. Le surnageant qui représente les parasites libérés des billes, est alors récupéré, neutralisé avec 1 M de NaOH et stocké à 4 °C avant l'étape d'extraction de l'ADN (Fig. 1, partie Etat de l'art).

2.2.2.b. Détection des protozoaires

Les conditions de lyse efficaces pour *T. gondii* mises en évidence dans l'article précédent (condition 6 de l'article 2) étant susceptibles de dégrader l'ADN de *C. parvum* et *G. duodenalis*, les conditions de lyse utilisées sont celles déjà validées sur *C. parvum* constituée de 6 cycles de congélation/décongélation et 1 min de traitement à ultrasons (condition 3.1 de l'article 2 validée par le programme Protofood : ANR-09-ALIA-009-01 Contamination des mollusques bivalves et des végétaux par les protozoaires *Cryptosporidium*, *Giardia* et *Toxoplasma* : détection, persistance et impact des procédés).

La détection des protozoaires s'est basée sur une extraction d'ADN à l'aide d'un kit commercialisé (InstaGene Matrix, Bio-Rad) et d'une quantification par PCR quantitative pour la sensibilité et la spécificité propres aux approches biomoléculaires mise au point dans le projet ANR précédemment cité et comme décrits précédemment.

2.3. Résultats

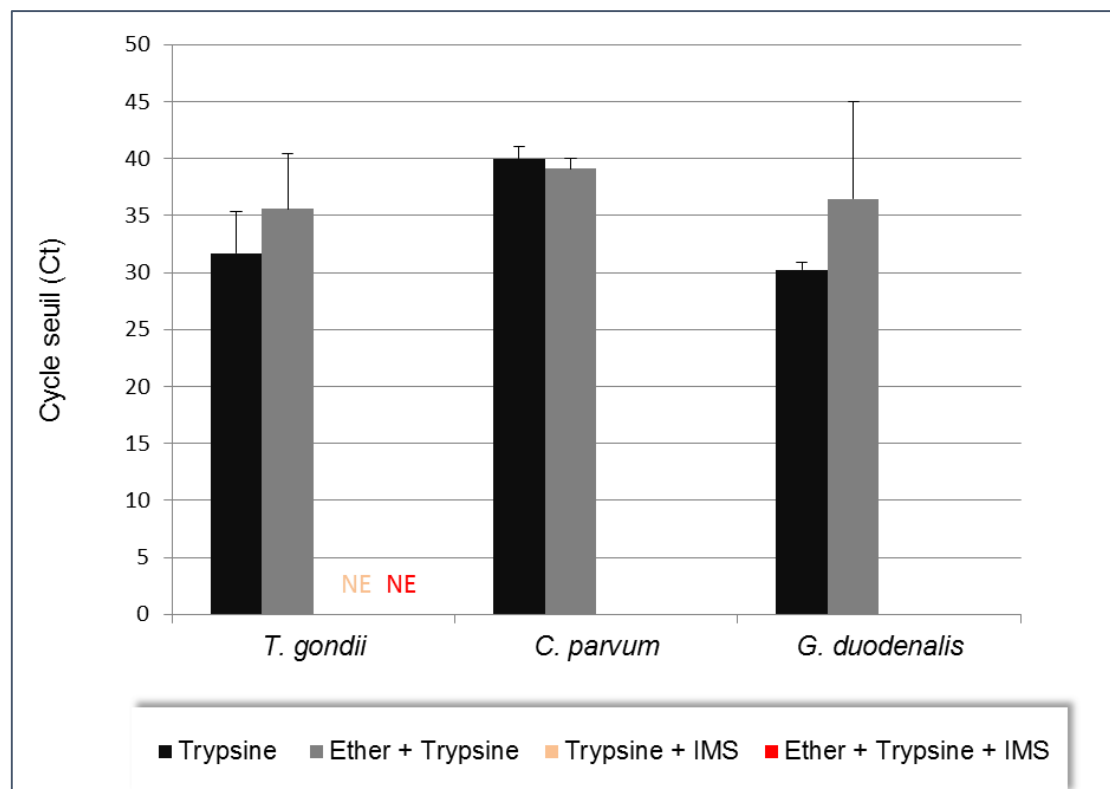


Figure 9 : Ct moyen (et écart-types) obtenus après 1 semaine d'exposition simultanée des dreissènes aux trois protozoaires à raison de 560 oocystes/kystes par dreissène et par jour. L'étape de purification est représentée par une digestion enzymatique à la trypsine seule (histogrammes noirs) ou une délipidation à l'éther suivie d'une digestion enzymatique (histogramme gris) en complément ou non de la séparation immunomagnétique. N = 2 pools de 6 dreissènes (NE : non effectué).

Après une semaine d'exposition simultanée aux protozoaires, l'ADN de *C. parvum*, *G. duodenalis* et de *T. gondii* a été recherché dans l'intégralité des tissus mous de dreissènes par PCR quantitative de type TaqMan simplex sans passer par l'étape d'IMS. Les résultats représentent les Cycle seuil (Ct) moyen obtenu par condition. Les signaux positifs obtenus confirment la capacité des dreissènes à accumuler les trois protozoaires après une semaine d'exposition au laboratoire (Fig. 9). De plus, la détection au sein des tissus est réalisable avec

les méthodes choisies avec, cependant, des efficacités de détection différentes selon les techniques de concentration et de purification appliquées.

Pour *T. gondii* et *G. duodenalis*, les Ct moyen obtenus après la digestion enzymatique s'élèvent à 31,7 ($\pm$ 3,6) et 30,2 ($\pm$ 0,6) respectivement. L'étape de délipidation à l'éther a pour conséquence d'augmenter le Ct à 35,6 ($\pm$ 4,8) pour *T. gondii* et à 36,4 ($\pm$ 8,5) pour *G. duodenalis*. De plus, la variabilité des résultats est plus importante si la délipidation est appliquée au traitement. En ce qui concerne *C. parvum*, les Ct moyen obtenus avec les deux méthodes sont comparables avec un Ct de 40,0 ($\pm$ 1,1) après une digestion à la trypsine et de 39,1 ($\pm$ 0,9) avec l'étape de délipidation supplémentaire.

La technique de séparation immunomagnétique n'a pas permis de détecter de signal pour l'ensemble des conditions (*C. parvum* et *G. duodenalis*).

2.4. Discussion

Les résultats de l'exposition *in vivo* des dreissènes aux protozoaires de façon simultanée démontrent une accumulation des trois protozoaires. De ce fait, l'accumulation du toxoplasme est démontrée pour la première fois par les dreissènes.

Vis-à-vis de la méthodologie, les organismes ont subis différents traitements de concentration et de purification des tissus. Dans un premier temps, il a été choisi de réaliser une étape de base de digestion enzymatique avec la trypsine sur les tissus de dreissènes. En effet, la digestion avec la trypsine semble plus efficace que la pepsine (Carey et al. 2004) pourtant couramment utilisée pour la digestion des tissus complexes. Ensuite deux techniques supplémentaires ont été confrontées en complément de la digestion enzymatique, une délipidation à l'éther en prétraitement et une séparation immunomagnétique (IMS) en post-traitement, en vue de purifier au maximum les échantillons.

La délipidation semble diminuer le taux de détection de *T. gondii* et de *G. duodenalis*. Ces observations laissent supposer une perte des oocystes/kystes durant les différentes étapes

de centrifugations et de lavages effectuées (Zarlenga et Trout, 2004). La détection de *C. parvum* ne semble pas être impactée par la délipidation.

La technique d'IMS n'a pas permis d'obtenir de signal pour la détection de *C. parvum* et *G. duodenalis* dans les tissus de dreissène pour les conditions testées. L'IMS est une technique relativement récente qui n'a pour l'instant été validée que pour la détection de *C. parvum* et *G. duodenalis* présents dans des matrices simples (McCuin et al. 2001). L'utilisation de l'IMS commence à être étendue à d'autres protozoaires comme *T. gondii* (Dumètre et Dardé, 2005, 2007) mais doit encore être développée et validée pour des matrices complexes, ce qui permettra d'obtenir une fraction purifiée des échantillons. En revanche, notre expérimentation a pris en compte l'intégralité des tissus mous des dreissènes. Afin d'améliorer l'action des billes magnétiques dans l'échantillon, il serait envisageable de simplifier la matrice en utilisant qu'une partie des organes au cours de futures expérimentations (Hohweyer et al. 2013).

Les principaux critères de sélection de la technique étaient la faisabilité en routine avec un minimum d'étape afin de limiter les pertes et de potentialiser la détection des protozoaires (Botes et al. 2013). La technique de digestion enzymatique à la trypsine semble être la méthode qui remplit au mieux les critères puisqu'elle permet préférentiellement de mettre en évidence les trois protozoaires dans les tissus de dreissène par rapport aux deux autres conditions testées. De plus, la taille acceptable du culot des échantillons obtenus après la digestion enzymatique (entre 100 et 150 μ l) permet d'optimiser la méthode de concentration/purification puisque la totalité du culot est analysé et que la perte des oocystes/kystes lors de l'intégralité du traitement est limitée.

Cependant les quantités détectées dans les organismes restent faibles par rapport à la quantité de protozoaires inoculée dans les aquariums (environ 4.10^3 oocystes/kystes par dreissène après 7 jours d'exposition) et sont proches de la limite de détection du protocole utilisé pour la qPCR (45 cycles PCR). La difficulté de mettre en évidence les protozoaires dans les matrices complexes est essentiellement due à l'absence de technique standardisée

disponible mais également à la propriété des oocystes/kystes. En effet, l'une des étapes clefs du processus de détection des protozoaires par qPCR est l'extraction de l'ADN des cibles (Sluter et al. 1997). Or, les protozoaires, et principalement les coccidies, sont dotés d'une paroi constituée de plusieurs couches qui leur confère une protection robuste pour survivre dans l'environnement extérieur (Belli et al. 2006 ; Mai et al. 2009). Cependant, toutes les coccidies ne possèdent pas la même résistance face aux traitements exercés puisqu'ils diffèrent au niveau de la structure même des parois (*i.e.* nombre de feuillettes, présence de sporocystes) ainsi que de leur composition biochimique (glycoprotéines pour *C. parvum* vs. tyrosine et cystéine pour *T. gondii*). Ce constat a des répercussions importantes pour la détection des protozoaires puisqu'un traitement de lyse inefficace ne permettra pas d'accéder à l'ADN des oocystes les plus résistants, alors qu'un traitement trop drastique pourra endommager l'ADN des moins résistants et avoir un impact direct sur la détection des protozoaires en qPCR. Dans notre étude, le protocole utilisé permet de détecter l'ADN des trois protozoaires, *C. parvum*, *G. duodenalis* et *T. gondii* à partir des tissus de dreissenés. Néanmoins, l'efficacité de détection doit être mesurée pour chaque protozoaire afin d'évaluer l'effet du traitement seul sur les résultats.

Dans cette première partie, des améliorations techniques ont été apportées à l'extraction et à la détection des trois protozoaires d'intérêt au sein des tissus de dreissène et en condition simple en ce qui concerne T. gondii.

Une caractérisation de l'intégrité du toxoplasme, pour lequel peu d'informations sont disponibles dans la littérature, a été rendue possible grâce à la technique de cytométrie en flux. L'approche par qPCR permet de confirmer l'importance de l'étape de fragilisation (chocs thermiques et temps de traitement par ultrasons) des oocystes de T. gondii. De plus, des traitements mécaniques, chimiques et enzymatiques sont nécessaires afin d'accéder à l'ADN du protozoaire et, in fine, d'améliorer la détection du toxoplasme en qPCR.

Une méthode commune pour la détection des trois protozoaires, constituée d'une étape de digestion enzymatique, d'extraction de l'ADN et de détection par qPCR, a été testée au laboratoire et démontre que les dreissènes sont capables d'accumuler les protozoaires et que la détection est possible au sein des tissus. Un compromis a cependant été réalisé entre la lyse complète du toxoplasme et la perte des deux autres protozoaires, moins résistants aux traitements de lyse, pour déterminer le traitement le plus efficace qui permet la détection simultanée des trois protozoaires à partir des dreissènes.

Chapitre 2 : Utilisation de la
dreissène comme matrice pour la
détermination de la contamination
biologique des milieux aquatiques
Cryptosporidium parvum, *Giardia*
duodenalis et *Toxoplasma gondii*.

Ce chapitre a pour but d'apporter des informations complémentaires et nécessaires sur l'utilité de la dreissène comme indicateur d'une contamination d'origine biologique des cours d'eau. En effet, pour utiliser une espèce en tant que système d'« alarme » de contamination, il est au préalable nécessaire de connaître le comportement de celle-ci vis-à-vis des cibles d'intérêt et d'en définir les caractéristiques de bioaccumulation ainsi que de connaître les limites des techniques utilisées pour la détection des protozoaires dans les matrices complexes.

Dans un premier temps, des expérimentations ont été conduites au laboratoire afin de 1) définir la cinétique d'accumulation des 3 protozoaires par la dreissène, 2) renseigner sur les capacités de dépuración pour le protozoaire présentant la plus forte accumulation, 3) tester les limites de détection au sein des différents organes de la dreissène et 4) déterminer le ou les organe(s) qui accumulent préférentiellement les protozoaires et l'intérêt potentiel de travailler sur un organe en particulier (Tableau 3 chap. 2.1 et 2.2).

La deuxième partie de ce chapitre détaillera les expérimentations réalisées *in situ* sur des populations de dreissènes afin de confirmer la bioaccumulation des protozoaires par les dreissènes en conditions naturelles (Tableau 3 chap. 2.3).

Tableau 3 : Les différentes conditions d'expérimentations présentées dans le chapitre 2.

N° Chapitre	Type exp	Pathogène(s)	Matrices	N / condition	Technique	Doses expérimentales	Phases exp	Traitement	Lyse	Extraction	Résultats
2.1	<i>In vivo</i> simultanée	les 3	Dreissènes entières	4 pools de 3	qPCR	561 oocystes_kystes /Dp/j	7 jours d'exposition	DE	6 cycles + 1 min US	InstaGene	Nombre moyen oocystes / kystes
	<i>In vivo</i> simples	les 3	Muscles Glande digestive Branchies	4 pools de 3		20 / 200 oocystes_kystes /Dp/j	7 jours d'exposition	DE			Nombre moyen oocystes / kystes
2.2	Dopage	<i>T. gondii</i>	Organes	6		100 / 500 / 1000 oocystes/organe	-	DE (sauf pour l'Hémolymphe)			% de détection (Observé/théorique)
	<i>In vivo</i>	<i>T. gondii</i>	Organes	4 pools de 3		1000 oocystes/Dp/j	21 jours d'exposition + 14 jours de dépuración	DE (sauf pour l'Hémolymphe)			Ct
			Eau	-		23 000 oocystes/L/j	21 jours d'exposition	Filtration sur cartouche			
2.3	<i>In situ</i>	les 3	Dreissènes entières	6 pools de 3		-	30 jours de caging	DE	6 cycles + 10 min US		Ct

Exp : expérimentation, Dp : *Dreissena polymorpha*, j : jour, DE : digestion enzymatique, cycles : congélation/décongélation, US : ultrasons, Prot K : protéinase K, Ct : cycle seuil.

1. Expositions simultanées *versus* simples des dreissènes aux trois protozoaires d'intérêts

Dans une première partie, une exposition simultanée aux trois protozoaires pendant 7 jours a été conduite au laboratoire. Ainsi les dreissènes ont été exposées à 560 oocystes de *T. gondii* et *C. parvum* et 560 kystes de *G. duodenalis* par jour et par bivalve. Puis, des expositions simples pendant 7 jours à deux doses de protozoaires (20 et 200 oocystes ou kystes par jour et par bivalve) ont été réalisées afin de déterminer la charge parasitaire au sein des organes les plus utilisés au cours des études écotoxicologiques : le muscle, la glande digestive et les branchies. Les résultats montrent, dans les deux types d'expositions (*i.e.* simple ou simultanée), une détection plus importante de l'ADN du toxoplasme dans les tissus de dreissène par rapport aux deux autres protozoaires. En effet, si on rapporte les résultats à la gamme d'étalonnage pour l'exposition simultanée, on mesure 31,2 ($\pm$ 29,1) oocystes de *T. gondii*, 8,7 ($\pm$ 12,2) kystes de *G. duodenalis* et 1,4 ($\pm$ 1,5) oocystes de *C. parvum* par dreissène. Pour les expositions simples, on mesure 0,2 ($\pm$ 0,4) et 22,4 ($\pm$ 30,3) oocystes de *T. gondii* et 0,1 ($\pm$ 0,3) et 0,7 ($\pm$ 0,7) kystes de *G. duodenalis* par dreissène pour les doses de 20 et 200 protozoaires respectivement. En ce qui concerne *C. parvum*, seule la plus forte concentration permet de détecter un signal qui représente 0,4 ($\pm$ 0,5) oocystes par dreissène.

Les profils d'accumulations sont identiques durant les deux expositions ce qui permet d'écarter un éventuel effet de compétition entre les protozoaires. Deux protozoaires, *G. duodenalis* et *T. gondii*, montrent un effet dose-dépendant dans leur accumulation par les dreissènes même si l'accumulation du toxoplasme reste nettement plus importante pour les deux concentrations testées. Du fait de la faible accumulation de *C. parvum* et de *G. duodenalis* lors des expérimentations, les données d'accumulation dans les organes ne sont présentées que pour l'exposition simple au toxoplasme pour la plus forte concentration (200 oocystes par dreissènes et par jour). Même si la détection du toxoplasme est mesurée pour les trois organes

et dès 24h d'exposition, les résultats indiquent une accumulation du protozoaire en plus grande quantité dans le muscle des individus avec 10,3 ($\pm$ 6,3) oocystes par muscle après 7 jours contre 3,6 ($\pm$ 12,4) par branchies et 5,6 ($\pm$ 11,3) par glande digestive. Cependant, les quantités mesurées au sein des organismes restent faibles pour les trois protozoaires par rapport à la charge inoculée dans les aquariums.

**Article 3: Bioaccumulation of human waterborne protozoa by zebra mussel
(*Dreissena polymorpha*): Interest for water biomonitoring.**

Paru dans Water Research (2014), 48:148-155.

Palos Ladeiro M.^{1,2}, Aubert D.², Villena I.², Geffard A.¹, Bigot A.^{1*}

¹*Université de Reims Champagne Ardenne, Unité Interactions Animal-Environnement, EA 4689, UFR Sciences Exactes et Naturelles, campus du Moulin de la Housse 51687 Reims Cedex 2, France*

²*Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, EA 3800, SFR CAP-Santé FED 4231, Hôpital Maison Blanche, 45 rue Cognacq Jay 51100 Reims, France*

Corresponding author*:

Bigot Aurélie, E-mail adress: aurelie.bigot@univ-reims.fr, tel: +333 26 91 33 28

Abstract:

Cryptosporidium parvum, *Giardia duodenalis* and *Toxoplasma gondii* are ubiquitous pathogens, which waterborne transmission has been largely demonstrated. Since they can be found in various watercourses, interactions with aquatic organisms are possible. Protozoan detection for watercourses biomonitoring is currently based on large water filtration. The zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, is a choice biological model in ecotoxicological studies which are already in use to detect chemical contaminations in water courses. In the present study, the zebra mussel was tested as a new tool for detecting water contamination by protozoa. *In vivo* exposures were conducted in laboratory experiments. Zebra mussel were exposed to various protozoan concentrations for one week. Detection of protozoa was realized by Taqman real time qPCR. Our experiments evidenced *C. parvum*, *G. duodenalis* and *T. gondii* oocyst bioaccumulation by mussels proportionally to ambient contamination, and significant *T. gondii* prevalence was observed in muscle tissue. To our knowledge, this is the first study that demonstrates *T. gondii* oocyst accumulation by zebra mussel. The results from this study highlight the capacity of zebra mussels to reveal ambient biological contamination, and thus to be used as a new effective tool in sanitary biomonitoring of water bodies.

Keywords: *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis*, *Toxoplasma gondii*, bioaccumulation, organotropism, *Dreissena polymorpha*

A. Introduction

Cryptosporidium spp and *Giardia* spp are the main protozoa associated with waterborne outbreaks (Fayer et al., 2004; Baldursson and Karanis, 2011) where ninety percent are associated with water (Guy et al., 2003). In Europe, an epidemiological study reported by the ECDC (European Centre for Disease prevention and Control, 2011) underline an increase of Cryptosporidiosis cases from 2006 to 2009, with 8,016 cases in 2009. A higher rate in the 0- to 4-year-old followed by the 5- to 14-year-old children was noted. Giardiasis cases have been stable over the last four years, with a total of 93,375 cases in 2009. Nonetheless, authors also emphasize the lack of reported cases in some countries, which does not allow for reliable results. In the USA, cryptosporidiosis and giardiasis are responsible cause over 2,700 and 3,500 hospital registrations per year and costs of \$45 million and \$35 million, respectively (Collier et al., 2012). *Toxoplasma gondii* infection is a common parasitic human infection although an efficient immune system keeps the parasite from causing illness. Toxoplasmosis is associated with two modes of transmission: a horizontal one *via* zoonoses, whereby foodborne parasites could represent 50% of transmission, and a vertical one from mother to foetus (Scallan et al., 2011). Infection could be due to an environmental protozoan form, the *oocysts*, or to a tissue form, the *cysts*. A recent study underlines that oocyst infection is an important and unrecognised source of congenital toxoplasmosis and leads to higher incidence and severity of ocular toxoplasmosis rather than tissue cyst infection (Boyer et al., 2011). Various meaningful outbreaks around the world are associated with *T. gondii* in water. In the USA, waterborne protozoa like *Toxoplasma* are responsible for almost 9,000 cases per year at a direct total healthcare cost of \$398 million (Karanis et al., 2007; Collier et al., 2012).

Water protozoan detection is presently based on the filtration of large amounts of water. Karanis et al. report a recent overview of water analysis towards *Toxoplasma*. They listed several methods from sample filtration to molecular tools and bioassays (Karanis et al., 2013).

These methods were optimized for water monitoring, which is a relatively pure matrix. Thus, results are not only based on protozoan prevalence in samples but also on the methods chosen to detect protozoa. However, protozoan paucity in results does not necessarily mean protozoan paucity in watercourses. Whatever the analytical methods chosen, water analysis is based on large quantities of water, is expensive, inaccurate and time-consuming (Toze, 1999). In watercourses, protozoa are subject to water characteristics that affect (oo)cyst transport dynamics. Indeed, dilution events and physicochemical parameters could influence spatial and temporal pathogen distribution. Shapiro et al. (2012) recently highlighted that *T. gondii* oocysts and surrogate attachment was greater in marine and estuarine waters, mainly due to salinity which alters the surface charge of *T. gondii* oocysts. Aggregation results in bigger particles likely to be more available to filter-feeder organisms such as aquatic invertebrates.

Depending on chemical contaminants, various biomonitoring programs use aquatic invertebrates to reveal water contamination (US Mussel Watch: Goldberg, 1986, The French Réseau d'Observation de la Contamination Chimique du littoral: <http://envlit.ifremer.fr/surveillance>; Besse et al., 2013). Organisms such as filter-feeders could accumulate and concentrate contaminants in high quantities directly in their tissues. Ecotoxicological studies have already used aquatic invertebrates such as the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, as sentinel species for the quality of freshwater ecosystems. In fact, zebra mussel are easy to collect in large numbers and to maintain in laboratory. They are sedentary and have a high filtration rate that allows for the bioaccumulation of both organic and inorganic contaminants in defined sites (Bervoets et al., 2005). In order to evidence new contamination types, a new method like bioaccumulation by invertebrates could be used as a tool for protozoan biomonitoring in watercourses. Since aquatic invertebrates are already routinely used in biomonitoring programs, they could also reflect biological contamination levels. *C. parvum* and *G. duodenalis* bioaccumulation by zebra mussel has already been demonstrated in previous studies (Lucy et al., 2008). There are no data in the literature about

T. gondii bioaccumulation by zebra mussel, but bioaccumulation by the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* (Arkush et al., 2003) and the oyster *Crassostrea virginica* (Lindsay et al., 2004) has been demonstrated.

The aim of this study is twofold: First, we attempted to underline the capacity of zebra mussel to bioaccumulate the three protozoa in a simultaneous *in vivo* exposure to 560 (oo)cysts of each pathogen in laboratory conditions. Thus, *T. gondii* accumulation was compared with the other two pathogens since *C. parvum* and *G. duodenalis* are known to be accumulated by zebra mussel. Second, single *in vivo* exposures were conducted to refine the previous results, using two pathogen concentrations: an environmental concentration of 20 (oo)cysts per mussel and per day (Graczyk et al., 2004) and a ten-fold higher concentration of 200 (oo)cysts per mussel and per day to point out a dose-response relationship of the three pathogens. Then, using the pathogen that has been accumulated in the highest proportion, organotropism was studied. Muscle as a hemolymph reservoir, gills which are the first structures in contact with the environment, and the digestive gland which is the major site of xenobiotic uptake, were analysed at various sampling times to understand how protozoa transit inside mussels.

B. Materials and methods

B.1. Exposure protocol

Purified *C. parvum* oocysts and *G. duodenalis* cysts preparations were purchased from Waterborne™, Inc. (New Orleans, LA, USA) and kept at 4°C until use. *T. gondii* oocysts were generously gifted by J.P. Dubey (USDA, Beltsville, USA). The oocysts were obtained from the feces of cats experimentally infected by strain ME49 genotype II. They were stored at 4°C in an aqueous solution containing 2% H₂SO₄ until use.

Zebra mussel between 20 and 25 mm long were collected at Commercy (Northeastern France) along the Meuse east channel (N48°45'26.13",E5°36'14.51"). They were acclimated in tanks for two weeks before exposure and analyses to ensure that they were protozoan-free on the sampling day and on the first exposure day (D0). The tanks were filled with Cristaline Aurèle (Jandun, France), drinking water at a constant temperature of $14 \pm 1^\circ\text{C}$ and with controlled aeration (Conductivity, $427 \pm 46 \mu\text{S/cm}$; Nitrates, $10 \pm 3,5 \text{ mg/L}$; Nitrites, 0 mg/L ; Ammonium, 0 mg/L). The mussels were fed *ad libitum* twice a week with a mixture of two species of microalgae, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*.

In a first set of experiments, mussels were randomly divided into 2 groups of 35 specimens each. Each group was placed in a 5 L tank that contained 3 L of spring water. For 7 days, the mussels were exposed to 560 (oo)cysts of each protozoan per mussel and per day in simultaneous exposure in order to compare the respective accumulation rates of the three pathogens. In a second set of experiments, mussels were randomly divided into 14 groups of 50 specimens each. Each group was placed in a 15 L tank that contained 4.5 L of spring water. The mussels were exposed to 20 and 200 (oo)cysts per mussel daily in single exposures to each protozoan. The two sets of experiments were carried out in duplicate tanks.

For both types of exposure, analyses were performed on 4 pools of 3 mussels or organs. For the first experiment, 12 mussels were collected per condition after 7 days' exposure to quantify parasites in whole soft tissues. In the second experiment, muscle, gills and digestive gland from mussels (4 pools of 3 organs) were dissected after 1, 3 and 7 days to quantify parasites organ by organ. All samples were treated using the same technique, and parasite quantification was carried out by Taqman real time qPCR (see below). When protozoan DNA was not detected by Taqman real time qPCR, the result was noted as "zero" in the statistical analyses.

B.2. Sample purification

Immediately after dissection, tissues (whole organism or organ) were ground with 10X trypsin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) diluted 10-fold to allow for tissue digestion and to facilitate (oo)cyst extraction. Samples were incubated at 37°C for 90 minutes. Suspensions were centrifuged at $1,250 \times g$ for 5 minutes, washed and kept at -80°C until protozoan extraction. The (oo)cyst wall is a complex protective barrier that allows for the long-term survival of protozoa in adverse environments. Before DNA extraction, a series of heat shock cycles consisting in freezing at -80°C and thawing at 95°C was repeated six times to break the wall and to access protozoan DNA. Then, DNA was extracted from the samples using an InstaGene™ Matrix kit according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Briefly, the samples were treated by ultrasonic treatment for one minute at 37 Hz (Ultrasonics 88155) and they were centrifuged at $92 \times g$ for one minute. The pellets were incubated with matrix for 35 minutes at 56°C and vortexed at full speed for 10 seconds. After a boiling cell lysis step for 8 minutes at 99°C, the matrix absorbs the cell lysis products that could interfere with the PCR amplification process. The samples were centrifuged at $11,093 \times g$ for 3 minutes and then the supernatants were carefully transferred to new tubes and stored at -80°C until detection by qPCR.

B.3. Parasite quantification

Parasite detection was carried out by Taqman real-time qPCR in a Chromo4 detector (Bio-Rad). Primers, probes and GenBank accession numbers are summarised in Table 6. To determine the numbers of protozoan DNA copies in our samples, a known DNA concentration of the positive control was diluted ten-fold starting at a 1:5 dilution to establish a reference curve. qPCR results were reported to the reference to determine DNA concentrations in our samples.

qPCR amplifications were performed as specified by the manufacturer's instructions in the following mixtures: 5 µL of extracted DNA sample were added to 20 µL of mix containing 2X

iQ™ supermix (Bio-Rad), 400 nM of each primer and 200 nM of probe. A no-template control was added. DNA polymerase was activated after an initial three-minute denaturation step at 95°C. Then, the samples were submitted to 45 cycles of 15 seconds at 95°C and one minute at 60°C. Each sample was analysed in duplicate.

B.4. Statistical analysis

Data from the control and experimental groups were compared using the non-parametric Mann-Whitney U-test. All statistical tests were performed using SPSS software for Windows v10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Table 6 : Primers and probes used for protozoan detection in tissues of *D. polymorpha* by Taqman real time qPCR.

Target	GenBank accession number	Primer sequence	Probe sequence	References
Specific 452-bp <i>C.parvum/hominis</i> sequence	AF 188110	5'-CGCTTCTCTAGCCTTTTCATGT-3' 5'-CTTCACGTGTGTTTGCCAAT-3'	6FAM-CCAATCACAGAATCATCAGAATCGACT-BHQ1	(Fontaine and Guillot, 2002)
Small subunit ribosomal <i>G.duodenalis</i> RNA gene sequence	M 54878	5'-GACGGCTCAGGACAACGGTT-3' 5'-TTGCCAGAGGTGTCCG-3'	TxRd-CCCGCGGCGGTCCCTGCTAG-BHQ2	(Verweij et al., 2003)
<i>T.gondii</i> strain RH repeat region	AF 487550.1	5'-AGAGACACCGGAATGCGATCT-3' 5'-CCCTCTTCTCCACTCTTCAATTCT-3'	Cy3-ACGCTTTCCTCGTGGTGATGGCG-BHQ2	(Reischl et al., 2003)

C. Results

C.1. Simultaneous exposure experiments

After one-week exposure, 4 pools of 3 mussels were dissected and treated by the same techniques. However, high variability was detected between pools. In fact, an average 1.4 ± 1.5 *C. parvum* oocysts and 8.7 ± 12.2 *G. duodenalis* cysts were detected in mussel tissues, while 31.2 ± 29.1 *T. gondii* oocysts were detected in whole organisms (Fig. 6). For *T. gondii* and *C. parvum*, all and three out of four pools contained protozoan DNA, respectively. For *G. duodenalis*, DNA was detected in only two out of four pools and results were not statistically significant, although DNA amounts were higher than *C. parvum* (Table 7).

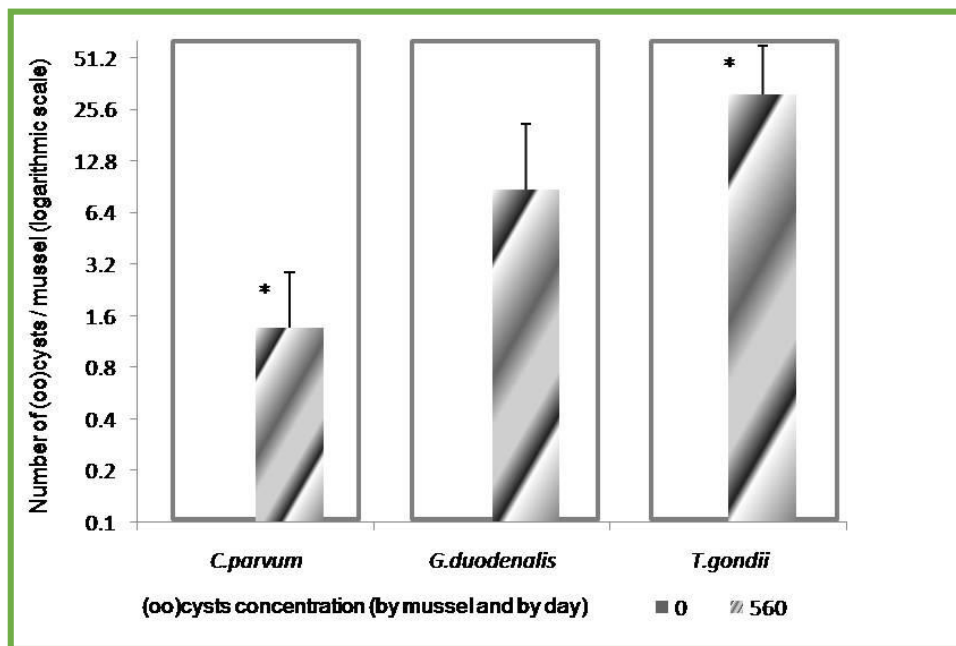


Fig. 6 : Mean number (and standard deviation) of (oo)cysts detected in zebra mussel tissue after 7 days of exposure in laboratory experiment (N = 4 pools of 3 mussels) in a simultaneous exposure to 560 (oo)cysts per mussel and per day (logarithmic scale). * represent significant differences with control. Mann-Whitney U-test $p < 0.05$

Table 7 : Number of pools where protozoan DNA was detected / total of pools analysed for simultaneous and single exposures (1 pool = 3 mussels or organs)

Exposure dose (protozoa/ mussel/ day)	20	200	560
Protozoa			
<i>C.parvum</i>	0/4	2/4	3/4
<i>G.duodenalis</i>	2/4	4/4	2/4
<i>T.gondii</i>	2/4	4/4	4/4

C.2. Single exposure experiments

A second laboratory experiment was carried out with an environmental concentration of pathogens (20 (oo)cysts per mussel and per day) and a ten-fold higher concentration (200 (oo)cysts per mussel and per day). After a one-week exposure, protozoan DNA was detected in mussel tissues for all conditions except for the *C. parvum* lower concentration. Nevertheless, a dose-response relationship was observed after exposure to *G. duodenalis* and *T. gondii* (oo)cysts (Fig. 7). Indeed, means of 0.1 ± 0.3 *G. duodenalis* cysts and 0.2 ± 0.4 *T. gondii* oocysts were detected per mussel after one week at the lower concentration of 20 (oo)cysts per mussel and per day, whereas 0.7 ± 0.7 cysts and 22.4 ± 30.3 oocysts were detected at the concentration of 200 (oo)cysts per mussel and per day. Similarly to the first experiment, variations between pools are presented in Table 7. Contrary to the simultaneous experiment, *G. duodenalis* DNA was detected in all pools for the higher dose of exposure and *C. parvum* in only two.

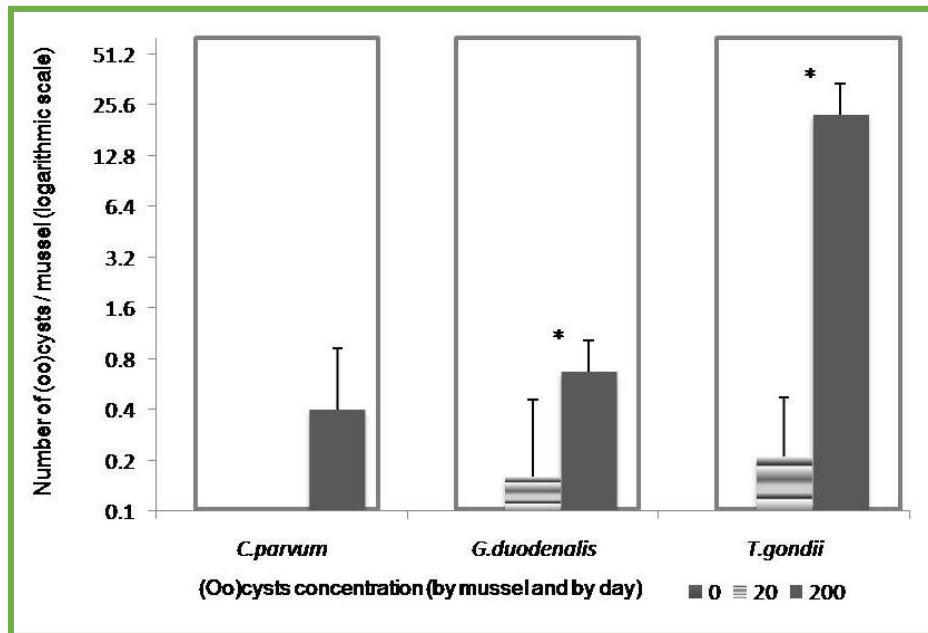


Fig. 7 : Mean number (and standard deviation) of (oo)cysts detected in *Dreissena polymorpha* tissue after 7 days of exposure in laboratory experiment (N = 4 pools of 3 mussels) in single exposures to 20 and 200 (oo)cysts per mussel and per day (logarithmic scale). * represent significant differences with control. Mann-Whitney U-test $p < 0.05$

C.3. Organ localization of *T. gondii* oocysts after single exposure experiments

As exposure to *C. parvum* and *G. duodenalis* resulted in very low bioaccumulation by mussels, we focused our organ localization experiment on *T. gondii* and on the higher dose of exposure.

Protozoan DNA was already detected significantly after only one day exposure in all organs tested (Fig. 8). Protozoan DNA was significantly detected in the gills and digestive gland in higher proportions than in the control on the first and third sampling days. For these two organs, high standard deviations (Table 8) did not allow us to display relevant results on the seventh sampling day although an upward trend was clearly observed.

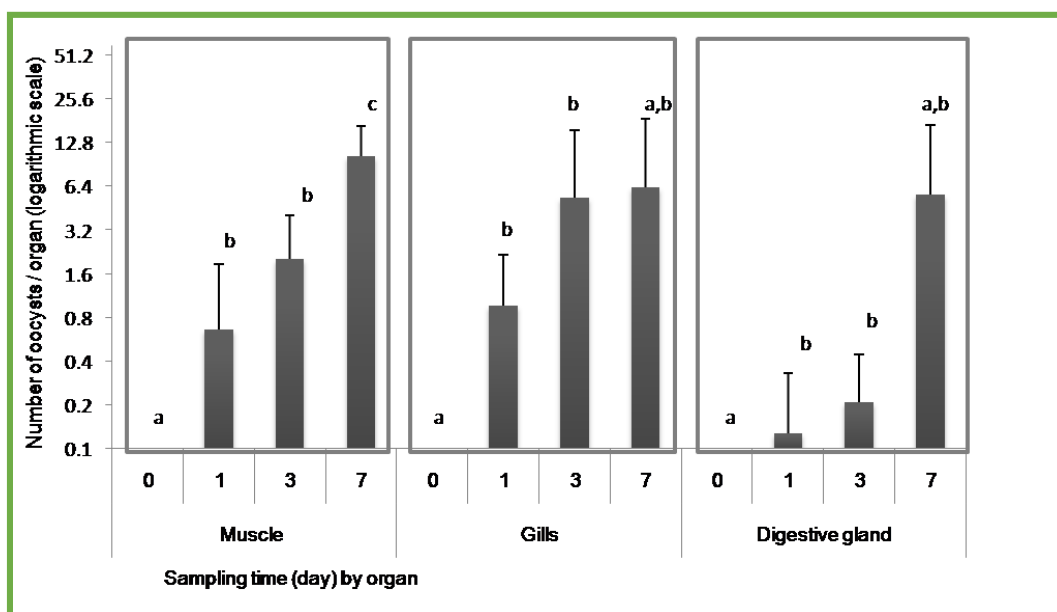


Fig. 8 : Mean number (and standard deviation) of oocysts detected in mussel organ (muscle, gills and digestive gland) after 1, 3 and 7 days of exposure to 200 *T. gondii* oocysts per mussel and per day (logarithmic scale). Different letters represent significant differences between number of oocysts detected with Mann-Whitney U-test $p < 0.05$ (N=4 pools of 3 organs).

Table 8 : Number of pools where *T. gondii* DNA was detected / total of pools analysed after single exposure experiments to 200 *T. gondii* oocysts per mussel and per day.

Tissue \ Time (days)	Time (days)		
	1	3	7
Muscle	3/4	4/4	4/4
Gills	3/4	3/4	2/4
Digestive gland	3/4	3/4	1/4

D. Discussion

Various authors had highlighted that marine invertebrates are able to accumulate *C. parvum* and *G. duodenalis* (oo)cysts in their tissue. Marine ecosystem is largely studied because many marine organisms are a human food resource. The presence of protozoa in seafood could be a potential hazard source for humans. In freshwater watercourses, less information is available in literature. However, protozoan accumulation by organisms deprived of economic interest could represent an opportunity to reveal the biological contamination of watercourses. The zebra mussel has already been used in laboratory and field experiments (Graczyk et al., 2008). Our results complete the existing freshwater data (Graczyk et al., 2003) since we characterise the ability of zebra mussel to accumulate *C. parvum* and *G. duodenalis* using one environmental concentration and two higher doses. We also underline that *T. gondii* is bioaccumulated by zebra mussel. Our study highlights a high sensitivity of the technique we used for *T. gondii* and *G. duodenalis*, since protozoa were detected with as low an environmental concentration as 20 (oo)cysts per mussel and per day, which is particularly interesting for water biomonitoring. Moreover, our results point out a higher concentration of *T. gondii* than other protozoa in mussel tissues. Whatever the mode of exposure (simultaneous or single), *T. gondii* DNA was largely detected in higher concentrations than *G. duodenalis* and *C. parvum* DNA. However, the concentrations detected at the end of exposure were almost similar with 200- (although not all organs were taken into account) or 560-(oo)cyst exposure. This result could be due to (i) saturation by mussels which stop their feeding filtration if their environment is too hostile, (ii) a matrix effect or, (iii) competition between parasites with different transmission strategies. *C. parvum* and *G. duodenalis* are horizontally transmitted (from person to person) but *T. gondii* can be transmitted both horizontally and vertically. Competition between parasites occurs when parasites use various transmission strategies and even when they use different host tissues to survive (Ben-Ami et al., 2011). These hypotheses

will have to be confirmed with further experiments (i) with a larger range of protozoan concentrations, (ii) with a simplified matrix and, (iii) with single and simultaneous co-exposures.

C. parvum was detected in lower concentrations whatever the exposure. *C. parvum* is a small-size organism of 4-5µm whereas *T. gondii* and *G. duodenalis* are three times larger (Palos Ladeiro et al., 2013). As filter-feeder organisms, zebra mussel could sort particles in water according to their food preferences and select 15- to 40-µm particles (Ten Winkel and Davids, 1982). Nonetheless, the low DNA concentrations of all three parasites detected in mussel tissues could be due to a lack of practical and sensitive methods for purifying and detecting protozoan DNA in a complex matrix. Recent studies had evaluated the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *T. gondii* in water. LAMP assay used a set of 4 specific primers which recognize 6 distinct sequences in the target DNA (Sotiriadou and Karanis, 2008). This method appears to be very sensitive for a rapid diagnostic of *T. gondii* in water and more sensitive than qPCR (Krasteva et al., 2009). Moreover, LAMP technique has been evaluated for the detection of *C. parvum* and *G. duodenalis* (Gallas-Lindemann et al., 2013). It would be interesting to evaluate the LAMP assay in mussel tissue.

In 2007, Downey and Graczyk presented an experiment whereby different tissue collections were tested to improve *C. parvum* oocyst recovery from *C. virginica* tissue. Tissue samples were homogenised and purified using diethyl ether, isolated by immunomagnetic separation and quantified by indirect immunofluorescence. When the samples were spiked with oocysts, the most efficient method was reached when hemolymph was separated from the whole tissue during homogenization and purification (Downey and Graczyk, 2007). These conclusions underline the complexity of the matrix used and the need to simplify it. Nevertheless, it is conceivable to use a few organs instead of whole tissue to facilitate detection in molluscs. As we see in our results, (oo)cyst quantification in mussel organs (muscle, gills and digestive gland) individually exposed to 200 (oo)cysts per day was similar to whole tissues exposed to 560 (oo)cysts per day. Furthermore, many studies have investigated protozoan transit in

various organisms. Fayer et al. established that *C. parvum* oocysts were preferentially accumulated in eastern oyster (*C. virginica*) gills and hemocytes (Fayer et al., 1997). In clams (*Tapes decussatus*), authors found the highest number of oocysts in clam intestines (Gómez-Couso et al., 2003). An experimental study exhibits most *Toxoplasma* RNA in Mediterranean mussel (*M. galloprovincialis*) digestive glands after a depuration time (Arkush et al., 2003). In our experiment, most of *T. gondii* DNA was detected in zebra mussel muscle at the end of one-week exposure. High variations between studies could be explained by different exposure conditions (laboratory or field), exposure routes (food or water) and by different lifestyles among organisms (fresh or marine, diet, behaviour). Organotropism certainly depends on fluid transport within organisms. As organs are bathed in hemolymph, hemolymph could bring high quantities of protozoa into organs, above their absorption capacity.

Concerning *T. gondii*, our results not only point out accumulation proportionally to ambient protozoan contamination but also to sampling time, even with an environmental dose. This dose-response relationship is the first step suggesting that zebra mussel could be used as sentinel specie for protozoan biomonitoring. This point of view has already been pointed out in previous studies about *C. parvum* and *G. duodenalis* (Graczyk et al., 2008; Lucy et al., 2008) but, as far as we know, this is the first study concerning *T. gondii*. Nonetheless, it seems essential to complete these results by a depuration experiment in order to underline how long protozoa could be detected in mussel tissue (Arkush et al., 2003). If mussels can concentrate pathogens over a long period of time and since they are sedentary, they could be used as an integrative matrix for water biological contamination assessment. It is also conceivable to use organisms in active biomonitoring according to caging processes to avoid the influence of biometric parameters such as size, historic contamination level and organism availability (Bigot et al., 2010). Since water analyses are time-consuming, expensive and do not allow for routine biomonitoring, other complementary tools like protozoan prevalence in zebra mussel could be used to reveal protozoan contamination in watercourses.

Anyhow, these conclusions highlight some biological questions as the consequences of the presence of (oo)cysts on invertebrate homeostasis are still poorly studied, although zebra mussel have been used as a biological tool for chemical biomonitoring. Presently, biological responses used as biomarkers are useful tools for biomonitoring research because they could be an early warning against various contaminations, before irreversible damage is caused to individuals or populations. Thus, zebra mussel have been used to discriminate sites that fluctuate because of endocrine disruptors (Matozzo et al., 2008), genotoxic compounds (Le Goff et al., 2006), trace metals (Bourgeault et al., 2011), and even because of pesticides (Riva et al., 2010). In ecotoxicological studies, it is important to take into account most of the factors that could interfere with biological results. The scientific community now admits many biotic or abiotic elements as confounding factors in biological responses (Forbes et al., 2006), but non-specific parasitism is still poorly investigated. However, protozoa could be present in high densities in various watercourses and our results underline the capacity of zebra mussel to concentrate *C. parvum*, *G. duodenalis* and *T. gondii* in their tissues. Although zebra mussel are not protozoan-host-specific, non-self elements can affect them and their biological responses. We observed a significant prevalence of *T. gondii* oocysts in muscle tissue; we now have to confirm this prevalence in muscle or in the hemolymph. Indeed, hemolymphatic cells are involved in various functions like wound and shell repair, nutrient digestion, transport and excretion (Cheng, 1981). If protozoa interfere with hemocytes, immunological and defence functions are likely to increase at the expense of other important functions such as survival, energy or reproduction (Sousa et al., 2010). Our experiment lasted one week and was carried out with high pathogen concentrations. Long-time exposures to lower doses are necessary to complete zebra mussel accumulation data and to point out the impact of pathogens on whole organisms. Since biological impacts are still poorly understood, future *ex vivo* exposure will make it possible to improve our understanding of non-specific pathogen and cell interactions as hemocytes play an important role in invertebrate immunity and defence.

Conclusions

As sedentary organisms, aquatic invertebrates could reflect ambient contaminations of watercourses. Moreover, their wide distribution contributes to making them choice organisms for ecotoxicological studies. Protozoa are present in various watercourses in high quantities but their behaviour depends on water parameters (physicochemistry, flow, rainfalls). To reveal protozoan contamination, new tools have to be developed since water analyses are still inaccurate and do not yield relevant results. Our results underline the capacity of zebra mussel to accumulate *C. parvum*, *G. duodenalis* and *T. gondii* in their tissues proportionally to the ambient concentration. Localization of protozoa seems to be higher in muscle tissue, which contains hemolymph, and was time and dose dependant. Detection of protozoa in muscle tissue appears to be more relevant than others organs. Moreover, further investigations will permit to confirm these accumulation in muscle or in hemolymph in order to choose the relevant organ for routine biomonitoring. Zebra mussel could therefore be used as in chemical biomonitoring to highlight biological contaminations and could be a new effective tool in the sanitary assessment of water bodies. Moreover, chemical and biological stresses could have an important impact on organism homeostasis. Presently, non-specific parasitism is not taken into account in ecotoxicological studies, but as a biotic factor it could be a source of misinterpreted results.

Acknowledgements

The authors thank Stéphanie La Carbona and Catherine Cazeaux, ADRIA Normandie, for optimizing the real-time quantitative PCR procedure. We are grateful to Emilie Dupuis and Jeanne Hohweyer, laboratoire de parasitologie-mycologie de Reims Champagne-Ardenne, for helpful assistance in sample treatment and analyses.

We thank Annie Buchwalter for her careful English revision and the two anonymous reviewers which had largely improve this manuscript with their constructive comments.

This PhD work was supported by grants from the “Région Champagne-Ardenne” (projet INTERBIO). Financial support was provided by CNRS-INSU (Programme EC2CO, projet IPAD) and the Programme Interdisciplinaire de Recherche sur l’Environnement de la Seine (PIREN-Seine).

References

- Arkush, K.D., Miller, M.A., Leutenegger, C.M., Gardner, I.A., Packham, A.E., Heckerroth, A.R., Tenter, A.M., Barr, B.C., Conrad, P.A., 2003. Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *International Journal for Parasitology* 33, 1087–1097.
- Baldursson, S., Karanis, P., 2011. Waterborne transmission of protozoa parasites: Review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Research* 45, 6603-6614.
- Ben-Ami, F., Rigaud, T., Ebert, D., 2011. The expression of virulence during double infections by different parasites with conflicting host exploitation and transmission strategies. *Journal of Evolutionary Biology* 24, 1307–1316.
- Bervoets, L., Voets, J., Covaci, A., Chu, S., Qadah, D., Smolders, R., Schepens, P., Blust, R., 2005. Use of transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) to assess the bioavailability of microcontaminants in flemish. *Environmental Science and Technology* 39, 1492–1505.
- Besse, J.P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O., 2013. Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: towards the determination of threshold values. *Water Research* 47, 650–660.
- Bigot, A., Vasseur, P., Rodius, F., 2010. SOD and CAT cDNA cloning, and expression pattern of detoxification genes in the freshwater bivalve *Unio tumidus* transplanted into the Moselle river. *Ecotoxicology* 19, 369–376.
- Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Priadi, C., Ayrault, S., Tusseau-Vuillemin, M.H., 2011. Bioavailability of particulate metal to zebra mussels: biodynamic modelling shows that assimilation efficiencies are site-specific. *Environmental Pollution* 159, 3381–3389.
- Boyer, K., Hill, D., Mui, E., Wroblewski, K., Karrison, T., Dubey, J.P., Sautter, M., Noble, A.G., Withers, S., Swisher, C., Heydemann, P., Hosten, T., Babiarz, J., Lee, D., Meier, P., McLeod, R., 2011. Unrecognized ingestion of *Toxoplasma gondii* oocysts leads to congenital toxoplasmosis and causes epidemics in North America. *Clinical Infectious Diseases* 53, 1081–1089.
- Cheng, T.C., 1981. Bivalves. In Ratcliffe NA, Rowley AF (eds) *Invertebrate blood cells* vol 1. Academic New York, 233-300.
- Collier, S.A., Stockman, L.J., Hicks, L.A., Garrison, L.E., Zhou, F.J., Beach, M.J., 2012. Direct healthcare costs of selected diseases primarily or partially transmitted by water. *Epidemiology and Infection* 140, 2003–2013.
- Downey, A.S., Graczyk, T.K., 2007. Maximizing recovery and detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts from spiked eastern oyster (*Crassostrea virginica*) tissue samples. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6910–6915.
- European Centre for Disease prevention and Control. 2011. Annual epidemiological report: Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data. Available at: <http://www.ecdc.europa.eu>

- Fayer, R., Farley, C.A., Lewis, E.J., Trout, J.M., Graczyk, T.K., 1997. Potential Role of the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*, in the Epidemiology of *Cryptosporidium parvum*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2086–2088.
- Fayer, R., Lindsay, D., Cole, R.A., Lindsay, D.S., Dubey, J.P., Thomas, N.J., Miller, M., Conrad, P., Gardner, I., Kreuder, C., Mazet, J., Jessup, D., Dodd, E., Harris, M., Ames, J., Worcester, K., Paradies, D., Grigg, M., Lewis, E.J., Trout, J.M., Xiao, L., Howard, D.W., Palmer, R., Ludwig, K., Tyler, S.S., 2004. Zoonotic protozoa in the marine environment: A threat to aquatic mammals and public health. *Veterinary Parasitology* 125, 131–135.
- Fontaine, M., Guillot, E., 2002. Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. *FEMS Microbiology Letters* 214, 13–17.
- Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 272–280.
- Gallas-Lindemann, C., Sotiriadou, I., Mahmoodi, M.R., Karanis, P., 2013. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in different water resources by Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Acta Tropica* 125, 231–236.
- Le Goff, J., Gallois, J., Pelhuet, L., Devier, M.H., Budzinski, H., Pottier, D., André, V., Cachot, J., 2006. DNA adduct measurements in zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, Pallas. Potential use for genotoxicant biomonitoring of fresh water ecosystems. *Aquatic Toxicology* 79, 55–64.
- Gómez-Couso, H., Freire-Santos, F., Ortega-Inarrea, M.R., Castro-Hermida, M.E., Ares-Mazas, M., 2003. Environmental dispersal of *Cryptosporidium parvum* oocysts and cross transmission in cultured bivalve molluscs. *Parasitology Research* 90, 140–142.
- Golberg, E.D., 1986. The mussel watch concept. *Environmental Monitoring and Assessment* 7, 91–103.
- Graczyk, T.K., Conn, D.B., Marcogliese, D.J., Graczyk, H., de Lafontaine, Y., 2003. Accumulation of human waterborne parasites by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*). *Parasitology Research* 89, 107–112.
- Graczyk, T.K., Conn, D.B., Lucy, F., Minchin, D., Tamang, L., Moura, L.N.S., DaSilva, A.J., 2004. Human waterborne parasites in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from the Shannon River drainage area, Ireland. *Parasitology Research* 93, 385–391.
- Graczyk, T.K., Lucy, F.E., Tamang, L., Minchin, D., Miraflor, A., 2008. Assessment of waterborne parasites in Irish river basin districts – use of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as bioindicators. *Aquatic Invasions* 3, 305–313.
- Guy, R.A., Payment, P., Krull, U.J., Horgen, P.A., 2003. Real-Time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5178–5185.
- Karanis, P., Kourenti, C., Smith, H., 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *Journal of Water and Health* 5, 1–38.
- Karanis, P., Aldeyarbi, H.M., Mirhashemi, M.E., Khalil, K.M., 2013. The impact of the waterborne transmission of *Toxoplasma gondii* and analysis efforts for water detection: an overview and update. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 86–99.

- Krasteva, D., Toubiana, M., Hartati, S., Kusumawati, A., Dubremetz, J.F., Widada, J.S., 2009. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a diagnostic tool of toxoplasmosis. *Veterinary Parasitology* 162, 327–331.
- Lindsay, D.S., Collins, M.V., Mitchell, S.M., Wetch, C.N., Rosypal, A.C., Flick, G.J., Zajac, A.M., Lindquist, A., Dubey, J.P., 2004. Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Parasitology* 90, 1054–1057.
- Lucy, F.E., Graczyk, T.K., Tamang, L., Miraflor, A., Minchin, D., 2008. Biomonitoring of surface and coastal water for *Cryptosporidium*, *Giardia*, and human-virulent microsporidia using molluscan shellfish. *Parasitology Research* 103, 1369–1375.
- Matozzo, V., Gagné, F., Marin, M.G., Ricciardi, F., Blaise, C., 2008. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: a review. *Environment International* 34, 531–545.
- Palos Ladeiro, M., Bigot, A., Aubert, D., Hohweyer, J., Favennec, L., Villena, I., Geffard, A., 2013. Protozoa interaction with aquatic invertebrate: interest for watercourses biomonitoring. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 778–789.
- Reischl, U., Bretagne, S., Krüger, D., Ernault, P., Costa, J.M., 2003. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infectious Diseases* 3, 1–9.
- Riva, C., Binelli, A., Parolini, M., Provini, A., 2010. The Case of Pollution of Lake Maggiore: a 12-Year Study with the Bioindicator Mussel *Dreissena polymorpha*. *Water, Air, and Soil Pollution* 210, 75–86.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M., 2011. Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases* 17, 7–15.
- Shapiro, K., Silver, M.W., Largier, J.L., Conrad, P.A., Mazet, J.A.K., 2012. Association of *Toxoplasma gondii* oocysts with fresh, estuarine, and marine macroaggregates. *Limnology and Oceanography* 57, 449–456.
- Sotiriadou, I., Karanis, P., 2008. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Toxoplasma gondii* in water samples and comparative findings by polymerase chain reaction and immunofluorescence test (IFT). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 62, 357–365.
- Sousa, T., Domingos, T., Poggiale, J., Kooijman, S.A.L.M., 2010. Dynamic energy budget theory restores coherence in biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 365, 3413–3428.
- Toze, S., 1999. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water Research* 33, 3545–3556.
- Ten Winkel, E.H., Davids, C., 1982. Food selection by *Dreissena polymorpha* Pallas (Mollusca: Bivalvia). *Freshwater Biology* 12, 553–558.
- Verweij, J.J., Schinkel, J., Laeijendecker, D., van Rooyen, M.A.A., van Lieshout, L., Polderman, A.M., 2003. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Molecular and Cellular Probes*, 17, 223–225.

2. Détermination de la cinétique d'accumulation de *Toxoplasma gondii* par les dreissènes et de l'efficacité de la méthode de détection.

Considérant la quantité importante de données présentes dans la littérature pour l'accumulation de *C. parvum* et *G. duodenalis* par des mollusques bivalves et, *a contrario*, le manque de données vis-à-vis du toxoplasme, deux expérimentations supplémentaires ont été réalisées avec *T. gondii*. La première a pour but de définir les limites de la technique de détection de *T. gondii* dans les tissus de dreissènes mise en place dans le chapitre précédent. Pour cela, une expérience de dopage a été réalisée sur les tissus (hémolymphes, muscle, glande digestive, branchies, manteau et le reste des tissus principalement composé de la gonade et du pied) avec différentes concentrations de *T. gondii* soit 100, 500 et 1 000 oocystes par tissus pour les groupes 1, 2 et 3 respectivement. Les résultats dénotent un effet « organe » avec une détection facilitée au sein du manteau, du muscle et des branchies par rapport au témoin positif constitué d'oocystes dans du tampon PBS. Alors que la quantité de protozoaires retrouvée dans les tissus est cohérente par rapport aux charges inoculées (5 fois plus et 10 fois plus importante dans le groupe 2 et 3 respectivement par rapport au groupe 1), la détection dans l'hémolymphes, la glande digestive et le reste des tissus est significativement plus faible par rapport au témoin positif. Il est donc nécessaire de réaliser des études complémentaires afin de déterminer la présence d'inhibiteurs de PCR au sein des différentes matrices pour améliorer la détection.

La deuxième expérimentation combine une phase d'exposition de 21 jours à une forte concentration de toxoplasme à une phase de dépuraison de 14 jours. La concentration de 1 000 *T. gondii* par dreissène et par jour a été choisie pour caractériser au mieux le potentiel d'accumulation des organismes et surtout pour souligner un potentiel effet de la dépuraison. La recherche de l'ADN du toxoplasme a été conduite au sein de tous les organes des individus après 24 h d'exposition puis à raison d'un prélèvement par semaine durant les 5

semaines d'expérimentation. La recherche de protozoaires a également été effectuée dans l'eau des aquariums après chaque changement d'eau (une fois par semaine pendant la phase d'exposition).

Les résultats soulignent une accumulation temps-dépendante avec une prépondérance au sein du manteau et de l'hémolymphe des individus à la fin de la période d'exposition [valeurs de Ct respectivement de 32,6 ($\pm 1,3$) et 34 ($\pm 1,4$)] mais également à la fin de la période de dépuration [respectivement 34,1 ($\pm 0,7$) et 36,3 ($\pm 0,9$)]. Au niveau du muscle des individus, la détection est plus faible avec des valeurs de Ct de 34,4 ($\pm 0,8$) et 38,8 ($\pm 1,2$) à la fin des périodes d'exposition et de dépuration respectivement. L'hémolymphe étant prélevée au sein du muscle adducteur, les résultats confirment une accumulation des protozoaires au sein même de l'hémolymphe et non du muscle des individus comme l'indiquaient les résultats de l'expérimentation précédente (Article 3). De plus, considérant les résultats de l'expérimentation de dopage, la quantité de protozoaires présente dans l'hémolymphe est certainement sous-estimée.

Néanmoins, il est important de noter que l'ADN du toxoplasme est retrouvé au sein de l'ensemble des tissus au bout de 14 jours de dépuration en eau claire ce qui souligne le caractère intégrateur des dreissènes suite à une exposition à *T. gondii*.

Article 4: Assessment of *Toxoplasma gondii* levels in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) by real time qPCR: an organotropism study.

Soumis dans Environmental Science and Pollution Research (juillet 2014)

Palos Ladeiro M.^{1,2}, Bigot-Clivot A.^{1*}, Aubert D.², Villena I.², Geffard A.¹

¹ Université de Reims Champagne Ardenne, Unité Stress Environnementaux et BIOSurveillance des milieux aquatiques, UMR-I 02 (SEBIO), Reims, France

² Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, EA 3800, SFR CAP-Santé FED 4231, Hôpital Maison Blanche Reims, France

Corresponding author*:

Bigot-Clivot Aurélie

E-mail address: aurelie.bigot@univ-reims.fr

Telephone: +333 26 91 33 28

Abstract:

Water quality is a public health concern that calls for relevant biomonitoring programs. Pathogen detection in water is presently based on large filtration, concentration and immunofluorescence microscopy. Recently, molecular tools such as PCR have been developed and appear more sensitive than conventional techniques to detect pathogens in watercourses or environmental samples. Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) has already demonstrated a capacity to accumulate and concentrate various human waterborne pathogens. First, using the spiking method, we evaluate the detection level of *T. gondii* DNA in zebra mussel organs using real time PCR. Overall, lower detection were recorded in hemolymph, digestive gland and remaining tissues (gonad and foot). Second, *in vivo* experiment was performed with 1,000 *T. gondii* oocysts per mussel and per day for 21 consecutive days followed by 14 days of depuration time in protozoa-free water. *T. gondii* DNA were detected in all organs but higher concentrations were found in hemolymph and mantle tissues, and were still detected at the end of the depuration period. Even if our results need to be strengthened, they suggest that zebra mussel is a potential new tool for measuring *T. gondii* concentrations and real time PCR is a suitable method for pathogen detection in complex matrices.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, zebra mussel, *in vivo*, organotropism, real time PCR, detection

A. Introduction

Toxoplasma gondii is the main parasite responsible for worldwide zoonoses (Tenter et al. 2000). As a coccidian parasite, it has a complex life cycle. Asexual division occurs within felids and warm-blooded organisms whereas sexual division occurs only in felids. *T. gondii* is the causative agent of toxoplasmosis. It has three infectious stages: the tachyzoite, the bradyzoite in tissue cysts and sporozoite present into the environment-resistant form oocysts (Dubey 2004). In immunocompetent people, toxoplasmosis is generally asymptomatic but it can cause severe clinical diseases in immunocompromised people and in case of congenital toxoplasmosis, such as blindness, mental retardation, encephalitis or systemic infection in the fetus (Jones and Dubey, 2010). *T. gondii* seroprevalence has been decreasing in childbearing women for several years, which is worrying for their children. Oocyst infection is an important source of toxoplasmosis and leads to higher ocular toxoplasmosis incidence and severity than tissue cyst infection (Boyer et al. 2011).

T. gondii was detected in a large variety of marine mammals, suggesting that they are exposed to the parasite. For example, type X *T. gondii* was detected in terrestrial and marine wildlife in the same region of California (Miller et al. 2008). The authors suggest that trophic transfer could be an important transmission route, with aquatic invertebrate preys as a vehicle of *T. gondii* oocysts for exposure. More recently, *T. gondii* was detected in shrimps, crayfish and fish in various regions of China (Zhang et al. 2014). In water samples, pathogen detection consists in filtering large quantities of water, and then concentrating, purifying and finally detecting the pathogens. This latter step can be qualitative using bioassays (Villena et al. 2004), or infection of cultured cells (Miller et al. 2008). A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method has recently been developed and seems to be very sensitive for a rapid detection of *T. gondii* in water (Sotiriadou and Karanis, 2008). Quantitative methods exist using

flow cytometry, microscopy (Shapiro et al. 2010) or molecular tools (Skotarczak 2010). Simple, reproducible and specific, this latter ones such as polymerase chain reaction methods are increasingly used to detect pathogens within a few hours (Yang and Rothman, 2004). For quantitative purposes, real time PCR can be an interesting approach since the amplification and the detection of PCR products are coupled in the same step. To detect pathogens in watercourses with a sanitary impact on human health, PCR approaches can bring a rapid response that allows for immediate action by the authorities (Botes et al. 2013). Aubert and Villena (2009) proposed a strategy for the detection of *T. gondii* in natural water samples. They used water filtration and real time PCR for oocyst detection and mouse bioassay for determining parasite infectivity. They found that 7.7% of water samples were positive for *T. gondii* DNA, including drinking water, whereas none of these samples were positive by bioassay, suggesting that real time PCR was more sensitive than the mouse assay or that the samples contained non viable pathogens.

Although water samples are relatively simple, easy-to-handle matrices, water samplings alone cannot reflect the existing contamination in watercourses. Because of rainfall, flow rate and physico-chemical parameters, the risk of false negatives due to sampling plans subsists. Aquatic organisms can act as paratenic hosts by filtering, concentrating and accumulating pathogens in their tissues. Indeed, many studies underline the accumulation of human waterborne pathogens by marine invertebrates in laboratory conditions or in field studies (Palos Ladeiro et al. 2013). Marine invertebrates have an important impact on human health and an economic interest as human food. In freshwater watercourses, the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*), has recently been used as a sentinel specie for *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* (Lucy et al. 2008). *Dreissena polymorpha* is sedentary, has a high filtration rate and is used in ecotoxicological studies as a sentinel specie for chemical biomonitoring to reveal the quality of freshwater ecosystems. Previous studies underline *T. gondii* accumulation by zebra mussel over one week of laboratory experiments with low oocyst

concentrations (20 oocysts per mussel and per day) (Palos Ladeiro et al. 2014). However, oocyst detection in environmental matrices such as vegetables or aquatic invertebrate animals is more complex than in water because oocysts are hard to extract as they can interact with cells and be internalised in tissues (Hohweyer et al. 2013). Thus, isolation and extraction steps appear more complex in organisms than in water and the choice of relevant organs is crucial to obtain accurate results (Willis et al. 2013).

First aim of this experiment was to determine the level of *T. gondii* DNA in zebra mussel tissues. To that purpose, hemolymph, muscle, digestive gland, gills, mantle and remaining tissues (for the most part gonad and foot) were spiked with several *T. gondii* oocysts doses. DNA levels in samples were determined comparing Ct values in organs with positive control ones. Our second objective was to determine whether zebra mussel can internalise *T. gondii* after exposure and depuration steps and which organs could be used in biomonitoring programs. For that purpose, zebra mussels were exposed to *T. gondii* oocysts *in vivo* in laboratory conditions for 21 days followed by 14 depuration days. Oocyst detection was also attempted in water tank by comparing the two matrices (water vs. zebra mussel).

B. Materials and methods

B.1. Detection level

T. gondii oocysts were generously gifted by J.P. Dubey (USDA, Beltsville, USA). The oocysts were obtained from the feces of cats experimentally infected by strain ME49 genotype II. They were stored at 4 °C in an aqueous solution containing 2 % H₂SO₄ until use.

To determine the detection level of the purification and quantification techniques, 6 clean mussels per condition and replicate (N=6) were dissected organ by organ. A known oocyst concentration was added to the samples (organs and positive controls: Fig. 9). For the first group, 100 oocysts were added to each sample, 500 oocysts for the second group and 1,000 oocysts for the third group (according to Esmerini et al. 2010). Immediately after dissections, purification and DNA detection steps are attempted as described below.

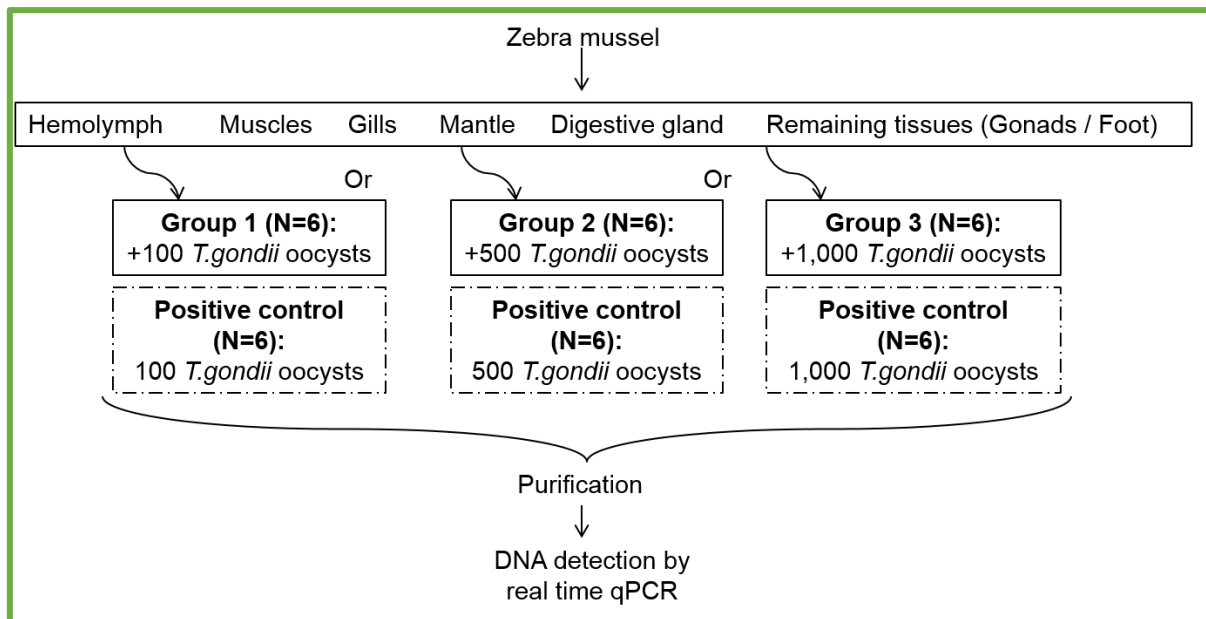


Fig. 9: Detection level protocol: After dissection of zebra mussel' tissues, spiked experiments were realized to each samples (N = 6 *per* conditions) with 100 *T. gondii* oocysts (group 1), 500 oocysts (group 2) or 1,000 oocysts (group 3). Samples purification and detection by real time PCR were realized to determine the DNA level by organ

B.2. *In vivo* experiment

Zebra mussels between 20 and 25 mm long were collected at Commercy (northeastern France) along the Meuse east channel (N48°45'26.13", E5°36'14.51"). They were acclimated in tanks for two weeks before exposure. Four pools of 3 mussels were analysed randomly to ensure that they were *T. gondii* oocyst-free on the sampling day and on the first exposure day (D0). The tanks were filled with Cristaline Aurèle (Jandun, France) drinking water at a constant temperature of 14 ± 1 °C and with controlled aeration (Conductivity, 382 ± 8 µS/cm; Nitrates, 27 ± 17 mg/L; Nitrites, 0.6 ± 0.4 mg/L; Ammonium, 2 ± 1.4 mg/L). The mussels were fed *ad libitum* twice a week with a mixture of two species of microalgae, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. Tank water was removed weekly and oocyst amounts were spiked again to maintain the previous oocyst concentrations in the tanks.

Mussels were randomly divided into 2 groups (control and exposed) in duplicate tanks of 70 specimens each. Each group was placed in a 5 L tank that contained 3 L of Cristaline Aurèle water for the first exposure week and 2 L until the end of the experiment to ensure the same quantity of oocysts *per* organism and *per* liter. For 21 days, the mussels were exposed to zero (negative control) or 1,000 *T. gondii* oocysts *per* mussel and *per* day. Then, the mussels were transferred into new tanks filled with clean water and left there for 14 days for the depuration period.

Mussel tissue analyses were performed on 4 pools of 3 organs *per* condition and *per* samplings. Hemolymph was withdrawn from the posterior adductor muscle and then, muscle, gills, digestive gland, mantle and remaining tissues (gonads and foot) were dissected after 1, 7, 14 and 21 days of exposure and after 7 and 14 days of depuration to detect *T. gondii* DNA organ by organ. Water filtration was previously described by Villena et al. (2004). Briefly, tank water was entirely filtered after 8, 15 and 22 days of exposure using Mini Profile capsules (Pall Corporation, USA). Elution of particulate matter was performed over 24 hrs in an elution buffer

(10 mM Tris, 1 mM EDTA and 3.5 mM sodium lauryl sulfate) and centrifuged at $1500 \times g$ for 15 min without brake. Pellets were stored at -80°C until purification and DNA detection.

B.3. Sample purification

Immediately after dissection, organs (except hemolymph) were ground with 1X trypsin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) to allow tissue digestion and to facilitate oocyst extraction. Samples were incubated at 37°C for 90 min. Suspensions were centrifuged at $1,250 \times g$ for 5 min, washed and kept at -80°C . The oocyst wall is a complex protective barrier that allows for the long-term survival of protozoa in adverse environments. Before DNA extraction, a series of heat shock cycles consisting in freezing at -80°C for at least two hours and thawing at 95°C for 15 min was repeated six times to break the wall and to access *T. gondii* DNA (Villena et al. 2004). Then, the samples were treated by ultrasonic treatment for 1 min at 37 Hz (Ultrasonics 88155) and they were pelleted. DNA was extracted from the pellets using an InstaGene™ Matrix kit according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The pellets were incubated with the matrix for 35 min at 56°C and vortexed at full speed for 10 s. After a boiling cell lysis step for 8 min at 99°C , the matrix absorbs the cell lysis products that could interfere with the PCR amplification process. The samples were centrifuged at $11,093 \times g$ for 3 min and then the supernatants were carefully transferred to new tubes and stored at -80°C until detection by real time PCR.

B.4. DNA detection by real time PC

Parasite detection was carried out by TaqMan real-time PCR in a CFX96 detector (Bio-Rad). We chose specific primers and detection probe according to a partial sequence of *Toxoplasma gondii* strain RH repeat region (genbank accession number AF 487550.1) (Reischl et al. 2003). Forward primer *Toxoplasma* F (5'-AGAGACACCGGAATGCGATCT-3'), reverse primer *Toxoplasma* R (5'-CCCTCTTCTCCACTCTTCAATTCT-3') and probe *Toxoplasma* P (Cy3-ACGCTTTCCTCGTGGTGATGGCG-BHQ2) were used (Palos Ladeiro et al. 2014).

Real time PCR amplifications were performed as specified by the manufacturer's instructions in the following mixtures: 5 µL of extracted DNA sample were added to 20 µL of mix containing 2X iQ™ supermix (Bio-Rad), 400 nM of each primer and 200 nM of probe. A no-template control was executed. DNA polymerase was activated after an initial 3-min denaturation step at 95 °C. Then, the samples were submitted to 45 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. Each sample was analysed in duplicate.

When DNA was not detected by Taqman real time PCR because results are under the detection limit, the Ct values were noted as "46" in the statistical analyses.

B.5. Statistical analyses

Data from the positive control and experimental groups were compared using the non-parametric Mann-Whitney *U*-test. Correlations between the exposure/depuration steps were determined using Spearman Rank correlation analysis. All statistical tests were performed using SPSS software for Windows v10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences were considered significant when $p < 0.05$.

C. Results and Discussion

C.1. Detection level

Parasites detection has so far only been based on the water matrix. However, the literature brings some discrepancy on the results of pathogen detection in water. Recovery levels of protozoa such as *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* was approximately 36 and 28% respectively using filtration and 15 and 64% using flocculation when detection was carried out with microscopy analyses (Gallas-Lindemann et al. 2013). Using molecular tools such as real time PCR, recovery was approximately 45 and 50% respectively (Peng et al. 2012). For *G. duodenalis* recovery was between 0 and more than 70% depending on the extraction protocol (Yu et al. 2009), suggesting a major importance of the concentration and extraction methods in use. On the other hand, another study underlines negative results in freshwater spiked with *T. gondii* (10 to 1,000 oocysts per liter) and TaqMan PCR or conventional PCR for detection (Shapiro et al. 2010). Thus, pathogen detection in water is far from being routinely used because no satisfying technique is currently available. Also, pathogen behaviour is altered by water characteristics, particularly pathogen settling, mobility and interactions with other particles (Dumètre et al. 2012). In freshwater, *T. gondii* oocysts are hydrophilic, with negative charges that confer oocysts a high mobility (Shapiro et al. 2009). Consequently, water samplings are not time-representative and cannot be used to reveal biological contaminations reliably. As the matrix is a fluctuating medium, other relevant tools have to be developed to reliably reveal biological contaminations of watercourses (Roslev et al. 2010) such as sentinel species. Esmerini et al. (2010) had underscored *Toxoplasma gondii* oocysts detection in whole mussel or oyster tissues from 10 to 5,000 oocysts in a spiking experiment. Here, level of *T. gondii* was determined in an organotropism study, after direct injection of oocysts into the samples for three concentrations, 100, 500 and 1,000 oocysts. Our results point out variable detection levels according to organs (Table 9).

Table 9: Mean Ct values and standard deviations (N = 6) determined after spiking 100, 500 and 1,000 *T. gondii* oocysts in zebra mussel tissues (mantle, muscle, gills, hemolymph, digestive gland and the remaining tissues) or in PBS (positive control). Significant differences with the positive control, Mann-Whitney U-test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Sample Group (oocysts)	Positive control	Mantle	Muscle	Gills	Hemolymph	Digestive gland	Remaining tissues (Gonads / Foot)
1 (100)	34.3 ± 1.1	34 ± 1.6	33 ± 2.6	34.3 ± 2.1	37.3 ± 1.7 *	35.6 ± 2.7	34.1 ± 0.1
2 (500)	30.4 ± 0.4	31.9 ± 1.7 **	31.8 ± 1.1 *	31.5 ± 0.3 **	33.7 ± 0.5 **	32.3 ± 0.8 **	33.3 ± 1.6 *
3 (1,000)	30.1 ± 0.1	32.1 ± 4.5	30.9 ± 1.6	31.4 ± 1.1 **	32.4 ± 0.7 **	33.4 ± 1.8 **	31.4 ± 0.5 **

For the first group (100 oocysts), Ct values were ranked as follows: muscle (33 ± 2.6) < mantle (34 ± 1.6) < gills (34.3 ± 2.1) < remaining tissues (34.1 ± 0.1) < digestive gland (35.6 ± 2.7) < hemolymph (37.3 ± 1.7). Ct value is defined as the point at which amplification curve of the samples crosses the threshold line. An earlier Ct value indicates higher amount of DNA in sample. Thus, concerning the first group, higher detection were observed in muscle, mantle and gills. For the second group (500 oocysts), detection levels were better in mantle (31.9 ± 1.7), gills (31.5 ± 0.3) and muscle (31.8 ± 1.1) tissues with lower Ct mean than in hemolymph (33.7 ± 0.5), digestive gland (32.3 ± 0.8) and the remaining tissues (33.3 ± 1.6). For the third group, highest recoveries were in muscle (30.9 ± 1.6), gills (31.4 ± 1.1) and remaining tissues (31.4 ± 0.5). Thus, as compared to the respective positive controls, detection was generally better in mantle, gills and muscle tissues. Conversely, hemolymph, digestive gland and remaining tissues displayed lower detection levels than the controls. One of the main limitations of the PCR method is the presence of PCR inhibitors in the samples that causes poor DNA recovery after the purification and extraction steps (Loge et al. 2002). There are no data in the literature about levels of PCR inhibitors in various organisms or organs. As we know, sample interference such as suspended organic matter could interfere with DNA extraction and amplification and thus impair the accuracy and sensitivity of the method (Green and Field, 2012). New techniques based on Kinetic Outlier Detection have recently appeared to emphasize PCR inhibition (Bar et al. 2012), and others exist aimed at reducing the effect of

PCR inhibitors (Jiang et al. 2005). Further studies have to be conducted in this field, in laboratory conditions, to understand if divergence between mussel organs is due to different levels of PCR inhibitors or to a lack of satisfying purification and extraction steps in these matrices. Downey and Graczyk (2007) obtained different recovery results, for *C. parvum* detection, ranging between 11 and 50% depending on the isolation method they used but also on the selected organs for detection. Indeed, these steps are essential for obtaining accurate pathogen detection results. Another cause for low detection could be the very hard *T. gondii* oocyst wall. In fact, the Ct values of positive controls were 34.3 ± 1.1 , 30.4 ± 0.4 and 30.1 ± 0.1 for the first, second and third group, respectively. This observation underline that there exist a strong variability between groups since Ct values for the second and the third group are in the same range while the third group is twice more concentrated. These results are very surprising since positive controls represent free oocysts in PBS without factors that could interfere with detection. Thus, extraction and detection in positive samples displays a high variability probably due to the oocysts conditions at the end of lysis steps. In this study, we performed a series of 6 heat shock cycles consisting in freezing at -80°C and thawing at 95°C and an ultrasonic treatment to break the oocyst wall and to access to *T. gondii* DNA. In previous studies, we underlined a deleterious effect on oocyst walls but healthy oocysts were still observed after this treatment (data not shown). Improving the extraction step is therefore essential to reach a relevant recovery level in real time PCR detection. Longer thawing times and ultrasonic treatments, freezing in liquid nitrogen or including beads during vortexing steps would make it possible to thoroughly break oocyst walls in the samples.

C.2. *In vivo* experiment

Previous studies underline the capacity of zebra mussel to bioaccumulate and concentrate human waterborne pathogens such as *C. parvum* and *G. duodenalis* in their tissues and thus serve as a bioindicator specie for these protozoans (Graczyk 2008, Lucy et al. 2008). More recently, we showed that zebra mussel could also bioaccumulate and concentrate *T. gondii*

oocysts in higher concentrations than *C. parvum* and *G. duodenalis* during simultaneous or single week exposure experiments (Palos Ladeiro et al. 2014). Moreover, *T. gondii* DNA was found in significantly higher amounts in muscle tissue than in digestive gland and gills. In this paper, we complete the existing data by experiments over a longer exposure time of 21 days, and with 2 weeks of depuration time using the same protocol than in previous study. The results of the *in vivo* exposure of zebra mussel to 1,000 *T. gondii* oocysts underline a time response relationship in the accumulation of oocysts. The Ct values determined in whole tissues on days 1, 7, 14 and 21 were 42.8 ($\pm$ 2.3), 40.9 ($\pm$ 3.1), 37.7 ($\pm$ 3.6) and 35.4 ($\pm$ 1.8), respectively. To clarify the results, they were presented as 1/Ct (Fig. 10) where a significant positive correlation was observed between exposure time and dose ($r_s = 0.695$, $p < 0.001$). Moreover, a significant negative correlation was found between the maximum exposure level and the end of the depuration time ($r_s = -0.525$, $p < 0.02$) with 39.5 ($\pm$ 3.6) Ct value. None of the negative controls has yielded positive results on real time PCR. These results argue in favour of using zebra mussel as a possible tool to detect protozoan contamination in water, since zebra mussel can concentrate *T. gondii* in their tissue for at least 2 weeks post inoculation. Although environmental pathogen transport is partially known for some protozoans, scarce data are available in the literature about the behaviour of *T. gondii* oocysts in water. As sedentary organisms, zebra mussel can accumulate and concentrate oocysts directly in their tissues and could reflect biological contamination levels over several weeks.

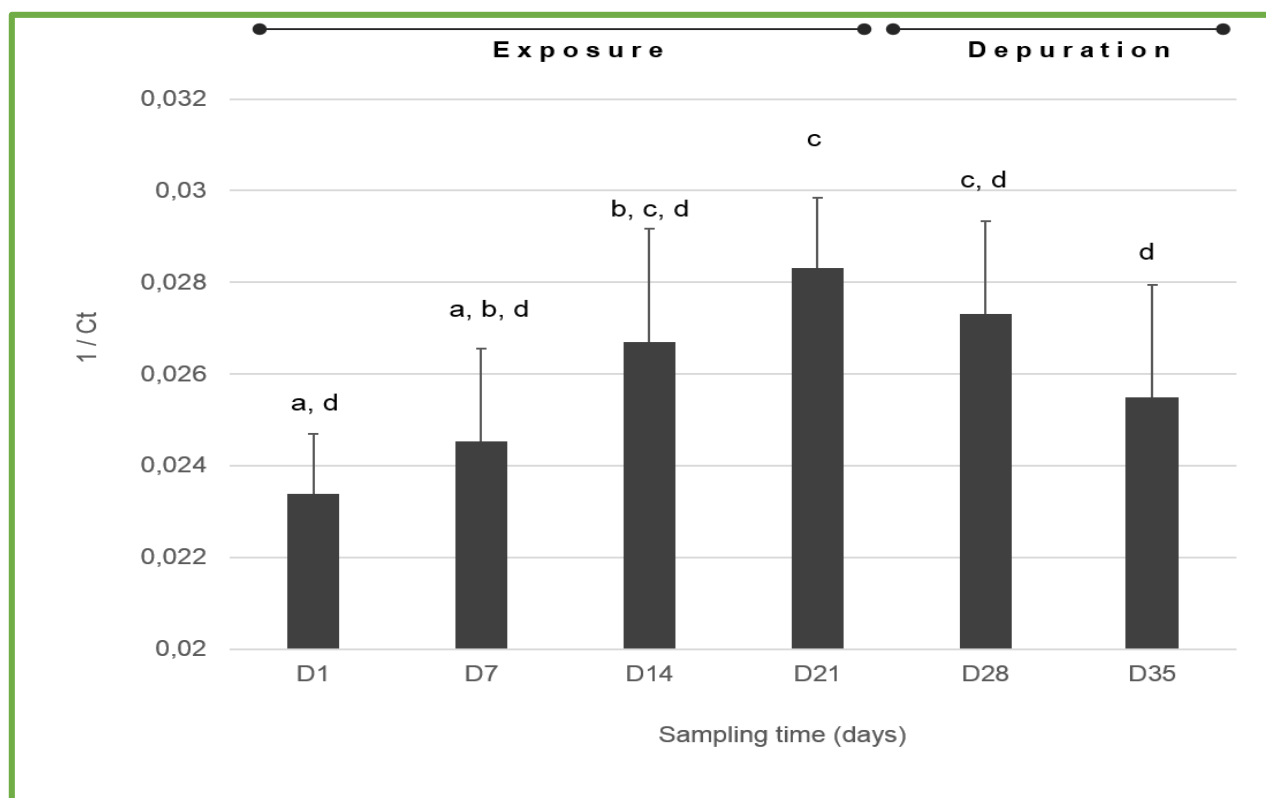


Fig. 10 : Mean numbers and standard deviations (N = 4 pools of 3) of 1/Ct values determined *per* mussel after 21 days of exposure to 1,000 protozoa *per* mussel and *per* day and 14 days of depuration in clean water. Letters represent significant differences between exposure times. Mann-Whitney U-test $p < 0.05$

Our second objective was to determine the most relevant organ of zebra mussel for detecting protozoa exposure. Since no data are available in the literature about *T. gondii* distribution in aquatic freshwater organisms, we performed an organotropism study to understand protozoa compartment in zebra mussel. Thus, *T. gondii* oocysts were investigated organ by organ and hemolymph, muscle, gills, digestive gland, mantle and remaining tissues (gonads and foot) were analysed. Moreover, every week, tank water was removed and detection of oocysts in water was performed. Oocyst quantities in the different organs and standard deviations are summarised in Table 10.

Table 10 : Mean Ct values and standard deviations (N = 4 pools of 3) determined in zebra mussel organs after 21 days of *in vivo* exposure to 1,000 oocysts per mussel and per day and 14 days of depuration in clean water. * Negative controls were ND (Not detected) throughout the experiment

Days	Organs	Mantle	Hemolymph	Gills	Muscle	Digestive gland	Remaining tissues (Gonads / Foot)
Exposure	1	36.4 ± 1.8	36.9 ± 0.6	37.9 ± 1.1	37.3 ± 1.5	40.4 ± 0.9	ND
	7	35.4 ± 2.1	37.9 ± 3.4	38.0 ± 0.1	37.1 ± 1.4	36.1 ± 3.9	37.7 ± 6.1
	14	34.7 ± 1.4	36.3 ± 1.0	35.7 ± 2.9	33.7 ± 0.8	40.6 ± 3.2	35.5 ± 1.8
	21	32.6 ± 1.3	34.0 ± 1.4	35.3 ± 1.9	34.4 ± 0.8	34.5 ± 1.5	35.7 ± 1.8
Depuration	28	32.9 ± 0.3	35.7 ± 1.1	36.5 ± 2.2	35.5 ± 1.5	36.6 ± 3.7	37.9 ± 1.9
	35	34.1 ± 0.7	36.3 ± 0.9	38.3 ± 1.4	38.8 ± 1.2	38.1 ± 1.1	41.8 ± 0.8
Negative control *		ND	ND	ND	ND	ND	ND

After 21 days of exposure, higher *T. gondii* DNA was detected in mantle and hemolymph tissues with Ct values of 32.6 (± 1.3) and 34 (± 1.4) respectively. The Ct values for the other organs were higher throughout the experiment that represent lower DNA in the samples. Our results do not underline any saturation throughout the exposure period and we detected protozoan DNA in all tissues after 2 weeks in clean water while water was changed twice a week, which suggests an interaction with organs. *T. gondii* was recently detected in aquatic organisms *i.e.* shrimps, crayfish and fish in China but only 6 of 3,432 organisms were *T. gondii*-DNA-positive after DNA extractions from digestive tracts and PCR detection (Zhang et al. 2014). The authors conclude that *T. gondii* levels in Chinese water are low although health hazards for the population still exists. Even if organotropism needs to be examined in other

species, our results underscore low level of *T. gondii* DNA in the digestive glands of mollusks after *in vivo* exposure, suggesting that these results are possibly underestimated. At the end of the depuration time, *T. gondii* DNA was detected by real time PCR in all zebra mussel organs, with higher quantities in mantle and hemolymph tissues with Ct means values of 34.1 (± 0.7) and 36.3 (± 0.9) respectively (Table 10). Therefore, these latter organs seem to be suitable to highlight current or previous water contaminations at least 2 weeks after the occurrence of the contaminating event. Indeed, as it is the largest organ in mussel and is directly in contact with water, the mantle could accumulate contaminants in higher proportions than other organs. Since all organs are bathed in hemolymph, we can hypothesise that higher pathogen quantities in the hemolymph could be explained by the fact that mussels protect themselves against pathogens through organ washes until pathogens are entirely eliminated by phagocytosis or encapsulation. Graczyk et al. (1997) had already demonstrated that phagocytosis is an important phenomenon in retention of pathogen since hemocytes of *Corbicula fluminea* could retain 81.6% of the spiked dose of 1.13×10^5 *C. parvum* after 120 min of incubation in an *in vitro* study. Consequently, since we did not detect pathogens in tank water, we could not reject the hypothesis of a detrimental effect on pathogens by mussel defense. Indeed, Allam and Paillard (1998) highlight functional hemocytes in extrapallial fluid of clam, *Ruditapes philippinarum*, as one of first defense against pathogens. Villalba et al. (2004) had reviewed the host-pathogen interactions in case of infection of oysters by *Perkinsus* spp. and they highlighted that hemolymph could serve as a way to dispersal of parasites among molluscs organisms. Nevertheless, one limitation of our study was that we did not consider pathogens in mussel' pseudofeces. Pseudofeces are the way for filter-feeders species to reject unwanted particles and a recent study underlines the pseudofeces discharge area as an important route of infection (Allam et al. 2013). For biomonitoring purposes, we need to develop simple, rapid and convenient tools for field applications and the hemolymph could complete these conditions. Indeed, even if a low detection level was emphasized, the hemolymph could reflect past or present contamination by protozoa and is time integrative.

Hemolymph sampling is rapid, non invasive for organisms and directly available for protozoa extraction since no purification step with trypsin is needed.

T. gondii could not multiply in cold-blooded organism such as mussels. However, interaction of protozoa, as a passive material, with a sentinel species such as the zebra mussel raises biological questions that are even more acute as regards to invertebrates' key-cells such as hemocytes. Hemocytes play an important role in organisms' homeostasis. They are involved in immunity responses, wound and shell repair, nutrient transport (Cheng 1981). Besides, *T. gondii* DNA recovered for *in vivo* experiment are extremely low compared with the theoretical spiked conditions of 21×10^3 per mussel for the entire experiment. Surprisingly, all over the exposure period, no *T. gondii* DNA was detected in the tank water by our method. This observation is in agreement with other laboratory experiments where a large gap was observed between the quantities of oocysts recovered in tissues and the amounts of oocysts spiked in tanks, and where no oocyst was found in water or in sediment after a 5 week-long exposure to *C. parvum* and *G. duodenalis* (Graczyk et al. 2003). The gap between the concentrations of oocysts spiked in tanks and final recovery values raise some questioning about pathogens' accessibility to organisms in laboratory conditions. Interactions with glass tanks and with organic components (algae and biofilms) seem important to assess in further studies to understand if all spiked protozoa are truly available for organisms. Nevertheless, whether for simple or complex matrices, no study reaches 100% pathogen recovery. Therefore, it is all the more necessary to improve the purification and extraction steps to accurately reveal contaminations in a water monitoring context.

Conclusion

As a consequence of water characteristics, rainfall, and pathogen mobility in water, dissemination of protozoa in watercourses is difficult to characterize. Additionally, contamination by protozoa is a public health issue that has been rising over the years. As a result, other tools than water samplings are truly needed to point out real water contamination levels. Zebra mussels are already used for chemical biomonitoring purposes and for detecting other human waterborne pathogens, *i.e.* *C. parvum* and *G. duodenalis*. They could be a new tool to highlight *T. gondii* contamination in watercourses. Our results not only underscore their capacity to accumulate *T. gondii* proportionally to the contamination of water, but also the presence of protozoa in their tissues up to 14 days post inoculation. Furthermore, hemolymph appears to be one of the tissue that concentrates the highest quantities of oocysts during *in vivo* experiment. DNA extraction was not totally in perfect running because a lot of issues need to be improved to better pathogens detection in complex matrices however zebra mussel already emerges as an interesting and relevant tool to reveal biological contaminations in watercourses.

Acknowledgements

The authors thank Stéphanie La Carbona and Catherine Cazeaux, ACTALIA, Villers Bocage, France, for optimising the real-time quantitative PCR procedure. We are grateful to Annie Buchwalter for the English revision.

This PhD work was supported by grants from the “Région Champagne-Ardenne” (projet INTERBIO). Financial support was provided by the CNRS-INSU (Programme EC2CO, projet IPAD) and the Programme Interdisciplinaire de Recherche sur l'Environnement de la Seine (PIREN-Seine).

References

- Allam B, Paillard C (1998) Defense factors in clam extrapallial fluids. *Dis Aquat Org* 33:123-128
- Allam B, Carden WE, Ward JE, Ralph G, Winnicki S, Pales Espinosa E (2013) Early host-pathogen interactions in marine bivalves: Evidence that the alveolate parasite *Perkinsus marinus* infects through the oyster mantle during rejection of pseudofeces. *J Invertebr Pathol* 113:26-34
- Aubert D, Villena I (2009) Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne Region, France. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:290–295
- Bar T, Kubista M, Tichopad A (2012) Validation of kinetics similarity in qPCR. *Nucleic Acids Res* 40:1395–1406
- Botes M, de Kwaadsteniet M, Cloete TE (2013) Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. *Anal Bioanal Chem* 405:91–108
- Boyer K, Hill D, Mui E, Wroblewski K, Karrison T, Dubey JP, Sautter M, Noble AG, Withers S, Swisher C, Heydemann P, Hosten T, Babiarz J, Lee D, Meier P, McLeod R (2011) Unrecognized ingestion of *Toxoplasma gondii* oocysts leads to congenital toxoplasmosis and causes epidemics in North America. *Clin Infect Dis* 53:1081–1089
- Cheng TC (1981) Bivalves, p 233–300. *In* Ratcliffe NA, Rowley AF (eds), *Invertebrate blood cells*, vol 1. Academic, New York
- Downey A S, Graczyk TK (2007) Maximizing recovery and detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts from spiked eastern oyster (*Crassostrea virginica*) tissue samples. *Appl Environ Microbiol* 73:6910–6915
- Dubey JP (2004) Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol* 126:57–72
- Dumètre A, Aubert D, Puech P-H, Hohweyer J, Azas N, Villena I (2012) Interaction forces drive the environmental transmission of pathogenic protozoa. *Appl Environ Microbiol* 78:905–912

- Esmerini PO, Gennari SM, Pena HF (2010) Analysis of marine bivalve shellfish from the fish market in Santos city, São Paulo state, Brazil, for *Toxoplasma gondii*. Vet Parasitol 170:8-13
- Gallas-Lindemann C, Sotiriadou I, Plutzer J, Karanis P (2013) Prevalence and distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater and the surface, drinking and ground waters in the Lower Rhine, Germany. Epidemiol Infect 141:9–21
- Graczyk TK, Fayer R, Cranfield MR, Conn DB (1997) *In vitro* interactions of Asian freshwater clam (*Corbicula fluminea*) hemocytes and *Cryptosporidium parvum* oocysts. Appl Environ Microbiol 63:2910-2912
- Graczyk TK, Conn DB, Marcogliese DJ, Graczyk H, de Lafontaine Y (2003) Accumulation of human waterborne parasites by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*). Parasitol Res 89:107–112
- Graczyk TK (2008) Assessment of waterborne parasites in Irish river basin districts – use of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as bioindicators. Aquat Invasions 3:305–313
- Green HC, Field KG (2012) Sensitive detection of sample interference in environmental qPCR. Wat Res 46:3251–3260
- Hohweyer J, Dumètre A, Aubert A, Azas N, Villena I (2013) Tools and methods for detecting and characterizing *Giardia*, *Cryptosporidium* and *Toxoplasma* parasites in marine mollusks. J Food Prot 76:1649–1657
- Jiang J, Alderisio KA, Singh A, Xiao L (2005) Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. Appl Environ Microbiol 71:1135–1141
- Jones JL, Dubey JP (2010) Waterborne toxoplasmosis-recent developments. Exp Parasitol 124:10–25
- Loge FJ, Thompson DE, Call DR (2002) PCR detection of specific pathogens in water: a risk-based analysis. Environ Sci Tech 36:2754–2759

- Lucy FE, Graczyk TK, Tamang L, Miraflor A, Minchin D (2008) Biomonitoring of surface and coastal water for *Cryptosporidium*, *Giardia*, and human-virulent microsporidia using molluscan shellfish. *Parasitol Res* 103:1369–1375
- Miller MA, Miller WA, Conrad PA, James ER, Melli AC, Leutenegger CM, Dabritz HA, Packham AE, Paradies D, Harris M, Ames J, Jessup DA, Worcester K, Grigg ME (2008) Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: new linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *Int J Parasitol* 38:1319–1328
- Palos Ladeiro M, Bigot A, Aubert D, Hohweyer J, Favennec L, Villena I, Geffard A (2013) Protozoa interaction with aquatic invertebrate: interest for watercourses biomonitoring. *Environ Sci Pollut Res* 20:778–789
- Palos Ladeiro M, Aubert D, Villena I, Geffard A, Bigot A (2014) Bioaccumulation of human waterborne protozoa by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): Interest for water biomonitoring. *Wat Res* 48:148–155
- Peng P, Jia RB, Liu YM, Li L (2012) Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water supply by quantitative real-time PCR. *Adv Mater Res* 518-523:3707–3711
- Reischl U, Bretagne S, Krüger D, Ernault P, Costa JM (2003) Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect Dis* 3:1–9
- Roslev P, Bukh AS, Iversen L, Sønnerbo H, Iversen N (2010) Application of mussels as biosamplers for characterization of faecal pollution in coastal recreational waters. *Wat Sci Tech* 62:586–593
- Shapiro K, Largier J, Mazet JAK, Bernt W, Ell JR, Melli AC, Conrad PA (2009) Surface properties of *Toxoplasma gondii* oocysts and surrogate microspheres. *Appli Environ Microbiol* 75:1185–1191

- Shapiro K, Mazet JAK, Schriewer A, Wuertz S, Fritz H, Miller WA, Largier J, Conrad PA (2010) Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts and surrogate microspheres in water using ultrafiltration and capsule filtration. *Wat Res* 44:893–903
- Skotarczark B (2010) Progress in the molecular methods for the detection and genetic characterization of *Cryptosporidium* in water samples. *Ann Agric Environ Med* 17:1–8
- Sotiriadou I, Karanis P (2008) Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Toxoplasma gondii* in water samples and comparative findings by polymerase chain reaction and immunofluorescence test (IFT). *Diagn Microbiol Infect Dis* 62:357–65
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM (2000) *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30:1217–1258
- Villalba A, Reece KS, Camino Ordás M, Casas SM, Figueras A (2004) Perkinsosis in molluscs: a review. *Aquat Living Resour* 17:411–432
- Villena I, Aubert D, Gomis P, Ferte H, Ingland J, Denis-bisiaux H, Dondon J, Pisano E, Ortis N, Pinon J (2004). Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. *Appl Environ Microbiol* 70:4035–4039
- Willis JE, McClure JT, Davidson J, McClure C, Greenwood SJ (2013) Global occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in shellfish: Should Canada take a closer look? *Food Res Int* 52:119–135
- Yang S, Rothman RE (2004) Review PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *The Lancet* 4:337–348
- Yu X, Van Dyke MI, Portt A, Huck PM. 2009. Development of a direct DNA extraction protocol for real-time PCR detection of *Giardia lamblia* from surface water. *Ecotoxicol.* 18:661–668
- Zhang M, Yang Z, Wang S, Tao L, Xu LX, Yan RF, Song XK, Li XR (2014) Detection of *Toxoplasma gondii* in shellfish and fish in parts of China. *Vet Parasitol* 200:85–88

3. La dreissène comme indicateur de contamination biologique des masses d'eau. Approche *in situ*.

Cette partie 'Expositions in situ' a été réalisée en collaboration avec Elodie Kerambrun (post-doctorante du projet « AccTox » dans le CPER Aqual, financement de la région Champagne-Ardenne).

3.1. Introduction

La prise en charge des eaux usagées est réalisée par les stations d'épuration des eaux (STEP) qui visent à nettoyer les eaux avant leur relargage dans l'environnement. Les STEP comprennent toutes une succession de dispositifs qui permettent de libérer les eaux des résidus solides, biologiques et chimiques. Cependant les procédés de traitements diffèrent selon les installations. Généralement, les eaux usées passent par trois phases avant d'être rejetées (Fig. 10). La phase de prétraitement consiste à séparer les débris les plus grossiers (dégrillage) avant de séparer l'eau des sables et des graisses (dessablage et déshuilage-dégraissage). Ensuite, les matières en suspension sont agglomérées par des agents flocculants puis séparées des eaux par traitements physico-chimiques (décantation et flottation). Enfin, les traitements biologiques permettent d'extraire la matière organique dissoute grâce à des microorganismes de type bactéries aérobies (lagunage naturel, boues activées, biofiltres ou lits bactérien). Les eaux ainsi épurées sont rejetées dans le milieu naturel.

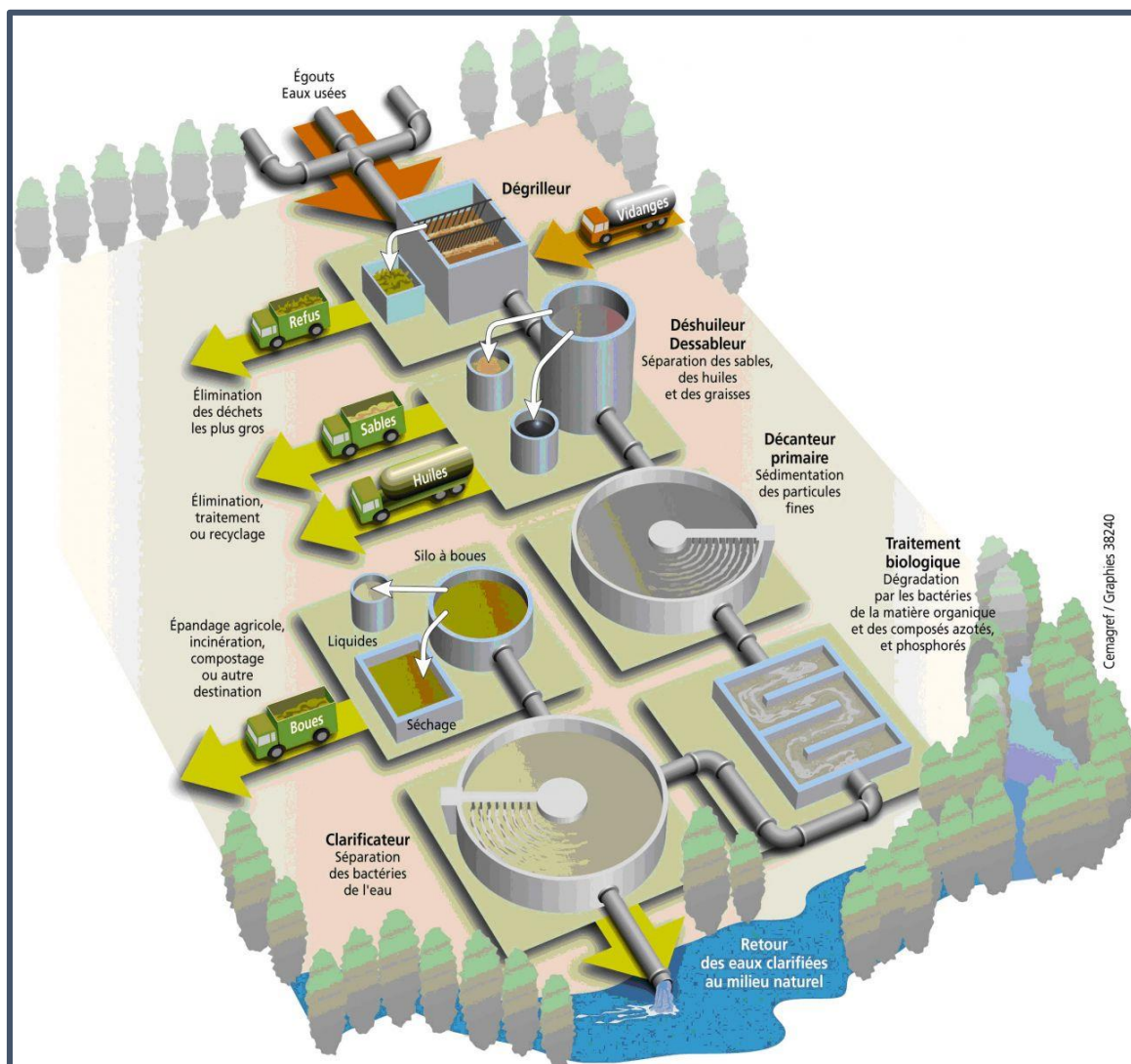


Figure 10 : Schéma de fonctionnement d'une station d'épuration des eaux usées à boues activées (source : www.irstea.fr)

Les objectifs de la présente étude sont doubles. Dans un premier temps, il s'agit de tester l'accumulation des trois parasites, *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis* par les dreissènes en conditions naturelles. Dans un deuxième temps, et puisque de précédentes études ont confirmé la présence de microorganismes protozoaires comme *C. parvum* et *G. duodenalis* dans les rejets de STEP (Castro-Hermida et al. 2008), l'influence de ces dernières sur la contamination biologique des masses d'eau sera considérée.

Afin de répondre à ces deux objectifs simultanément, les dreissènes ont été encagées et positionnées sur les sites d'intérêts préalablement définis. L'encagement est un outil de

biomonitoring actif qui permet d'utiliser une même population positionnée sur différents sites d'études indépendamment de la présence de moules zébrées autochtones dans le milieu. La technique de caging permet également de maîtriser le temps d'exposition ce qui procure l'avantage de contrôler un minimum les conditions d'expositions naturelles (Salazar et Salazar, 2000 ; Martel et al. 2003). Ainsi, les organismes sont contrôlés au départ de l'étude afin de s'assurer qu'ils n'étaient pas préalablement contaminés par les protozoaires d'intérêt. Si un signal positif est détecté en qPCR pour la présence des protozoaires dans les tissus de dreissènes, celui-ci reflète nécessairement une contamination pendant la durée de l'exposition sur les sites d'études. L'encagement de bivalves est déjà utilisé pour mettre en évidence la contamination fécale des cours d'eau (*Escherichia coli*, entérocoques : Roslev et al. 2010).

3.2. Matériels et Méthodes

Les dreissènes ont été encagées et placées pendant un mois en amont et en aval de 5 STEP des régions Champagne-Ardenne et Picardie de septembre à octobre 2013. Les sites d'intérêts choisis sont Reims (Marne), Epernay (Marne) et Charleville-Mézières (Ardennes) pour la région de Champagne-Ardenne et Creil (Oise) et Soissons (Aisne) pour la région de Picardie (Fig. 11). De plus, un site supplémentaire aux alentours de Charleville-Mézières a été ajouté à l'échantillonnage (Monthermé) car il possède une forte activité récréative (camping et activités nautiques) et représente potentiellement un risque pour la santé des occupants. Les organismes ont été analysés avant la mise en cage afin de vérifier l'absence de contamination naturelle par les protozoaires au départ des expérimentations. Les cages ont été placées en duplicat sur chaque site (11 sites = 22 cages).



Figure 11 : Sites d'encagement des dreissènes en amont et en aval des stations d'épurations des eaux (STEP) des villes de Creil et Soissons pour la région de Picardie, et Epernay, Reims et Charleville-Mézières en Champagne-Ardenne. Des dreissènes ont également été encagées sur le site de Monthermé dans les Ardennes. Cinq cours d'eau sont ainsi analysés : l'Oise, l'Aisne, la Marne, la Vesle et la Meuse.

Une fois les cages ramenées au laboratoire, 3 pools constitués de l'intégralité des tissus mous de 3 dreissènes chacun issus d'une cage et 3 pools issus de la deuxième cage ont été analysés. Les échantillons ont subi une digestion enzymatique à la trypsine avant l'étape de lyse des oocystes qui consiste en 6 cycles de congélation-décongélation (-80 °C/95 °C) suivis de 10 min d'ultrasons. L'extraction de l'ADN des échantillons a été réalisée avec le kit InstaGene et la détection des protozoaires est réalisée par qPCR.

3.3. Résultats

Tableau 4 : Nombre de pool positifs sur nombre de pool analysés (N = 6 pools de 3 dreissènes entières) après détection de l'ADN des parasites dans les tissus de dreissènes en qPCR. Les dreissènes ont été encagées 1 mois en amont et en aval de 5 STEP des régions de Picardie et de Champagne-Ardenne ainsi qu'au niveau du site de Monthermé dans les Ardennes de septembre à octobre 2013 (ND = non détecté).

Région	Ville	Site	<i>T. gondii</i>	<i>C. parvum</i>	<i>G. duodenalis</i>
Champagne-Ardenne	Reims	Amont	0/6	ND	
		Aval	0/6		
	Epernay	Amont	0/6		
		Aval	0/6		
	Charleville-Mézières	Amont	0/6		
		Aval	0/6		
	Monthermé		1/6 (Ct = 40,1)		
Picardie	Creil	Amont	0/6		
		Aval	1/6 (Ct = 40,68)		
	Soissons	Amont	0/6		
		Aval	1/6 (Ct = 40,66)		

Les résultats des expérimentations de caging sont présentés en Ct dans le tableau 4. L'ADN de *T. gondii* est détecté par qPCR (un puit sur 2) pour 3 des sites échantillonnés avec des Ct de 40,1, 40,68 et 40,66 respectivement pour les villes de Monthermé, Creil et Soissons (sites aval). Les résultats sont négatifs concernant *C. parvum* et *G. duodenalis* sur les 6 sites échantillonnés.

3.4. Discussion

Les résultats obtenus à la suite de l'étude de biomonitoring actif des dreissènes pendant un mois se sont révélés positifs pour trois des sites échantillonnés : Monthermé, Creil et Soissons. Cependant, seul l'ADN de *T. gondii* a été détecté dans les tissus de dreissènes. Les signaux détectés sont faibles et représentent une petite quantité de protozoaires dans les tissus.

Néanmoins il est important de noter que les signaux positifs détectés pour les sites de Creil et Soissons concernent les cages situées en aval des STEP.

Dans notre étude, seul l'ADN de *T. gondii* a été détecté dans les tissus de dreissènes avec la technique de détection précédemment mise en place. Ces observations sont en accord avec les résultats des expérimentations effectuées au laboratoire puisque l'ADN du toxoplasme a été systématiquement détecté en plus grande quantité dans les tissus de dreissènes par rapport à *G. duodenalis* et *C. parvum* et ce, que ce soit pour les expositions simples ou simultanée réfutant l'hypothèse d'une éventuelle compétition entre les trois parasites étudiés. Une précédente étude sur la détection des trois protozoaires *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis* dans différents cours d'eau de la région Champagne-Ardenne n'a pas montré de corrélation entre la présence de *T. gondii* et les deux autres protozoaires (Aubert et Villena, 2009). Étonnamment, l'étude de Aubert et Villena met en évidence la présence d'ADN de *T. gondii* dans seulement 7,7 % des échantillons alors que l'ADN de *G. duodenalis* est détecté à hauteur de 21 % des échantillons et celui de *C. parvum* dans 19 % des cas avec la technique de filtration de l'eau sur cartouche. En conditions naturelles, les fluctuations quotidiennes de la matrice eau (physico-chimie, débit) imposent un important effort d'échantillonnage et peuvent empêcher la détection. La présence d'ADN de *T. gondii* dans les tissus de dreissènes révèle les capacités et l'utilité des invertébrés comme outil complémentaire à la détection. Cependant, les organismes sont également soumis à d'autres stress (chimique ou biologique) qui peuvent limiter l'accumulation par les dreissènes en diminuant leur capacité de filtration (Reeders et al. 1989 ; Cranford 2001 ; Loayza-Muro et Elías-Letts, 2007).

Puisque les oocystes de *T. gondii* sont plus robustes que ceux de *C. parvum* ou les kystes de *G. duodenalis*, et que peu d'information est disponible sur la présence du toxoplasme dans les eaux continentales, le temps du traitement à ultrasons effectué pour la campagne terrain est 10 fois plus important que celui utilisé lors des expérimentations en laboratoire (10 min vs. 1 min). Des études complémentaires sont nécessaires afin de déterminer l'effet d'un tel

traitement sur les oocystes de *C. parvum* et les kystes de *G. duodenalis*. En outre, il est important de noter que les oocystes et kystes sont affaiblis par les traitements réalisés par les STEP. Un traitement de lyse supplémentaire trop agressif pourrait endommager l'ADN présent dans l'échantillon et limiter la détection des protozoaires par qPCR.

Enfin, pour renforcer cette étude, il semble primordial de vérifier la viabilité et l'infectiosité des protozoaires retrouvés à la sortie de STEP (Robertson et al. 2000). En effet, les propriétés des oocystes/kystes confèrent aux protozoaires une protection envers les traitements utilisés pour l'assainissement des eaux. Plusieurs études ont montré l'inefficacité de la désinfection pour l'inactivation de ces protozoaires (Betancourt et Rose, 2004 ; Briancesco et Bonadonna, 2005). Or, dans un contexte de biosurveillance des milieux, il est non seulement nécessaire de détecter les microorganismes mais aussi de déterminer leur pouvoir infectieux en vue de définir le risque pour les populations. En fonction du type de traitement utilisé par les STEP, l'élimination des protozoaires sera plus ou moins efficace (Kitajima et al. 2014). Cheng et al. (2009) ont montré une diminution de 97 % à 64 % d'oocystes de *C. parvum* et *C. hominis* et de 100 % à 98 % de *G. duodenalis* en fonction des traitements utilisés par les stations de traitements des eaux en Irlande. Ainsi, il a été montré qu'un traitement secondaire à l'aide d'une oxydation active est plus efficace qu'un traitement par boues activées pour éliminer les kystes de *G. duodenalis* (Cacció et al. 2003). Cependant, malgré cette considérable réduction, environ 8 oocystes et 3 kystes par litre sont encore détectés viables, dans les effluents finaux avant leur rejet dans l'environnement. Il est intéressant de noter que dans cette étude, 100 % des eaux entrantes sont positives pour la présence de *C. parvum/hominis* et 75 % pour *G. duodenalis*. Une autre équipe a mesuré les taux de microorganismes (bactéries, virus et parasites) de quatre STEP tous les mois pendant un an dans différentes régions de Suède. Les résultats ont souligné la présence de *G. duodenalis* pour tous les prélèvements d'eaux entrantes effectués et dans 5 échantillons sur 19 pour *C. parvum* (Ottoson et al. 2006). Néanmoins, cette étude a utilisé la méthode 1623 de l'US EPA pour la détection des oocystes et des kystes et souligne une efficacité de détection assez faible dans les eaux non traitées

avec cette technique de l'ordre de 15 % et 25 % respectivement. Malgré le faible taux de détection, la présence de protozoaires viables à la sortie des dispositifs de traitement des eaux pourrait entraîner un risque de contamination pour les populations *via* les eaux récréatives puisque la dose infectante relative à ces protozoaires est faible. En effet, même si la dose réellement infectante pour contracter la cryptosporidiose n'est pas connue, il est admis qu'elle varie de un (Gale 2001) à quelques dizaines d'oocystes (Fayer et al. 2000) et doit certainement dépendre de l'état physiologique et de l'immunocompétence de l'hôte.

Pour terminer, la non détection de l'ADN de *C. parvum* et de *G. duodenalis* dans les chairs de dreissènes ne permet pas de conclure sur l'absence de ces deux protozoaires dans le milieu. Il est impératif d'augmenter la sensibilité de notre technique afin de pouvoir obtenir des résultats pertinents. Les cinétiques d'accumulations de ces deux parasites ont été définies au laboratoire sur une semaine d'exposition et doivent être renforcées avec des temps d'accumulation plus longs suivis de périodes de dépuration pour vérifier l'effet des dreissènes sur les oocystes de *C. parvum* et les kystes de *G. duodenalis*.

Les informations obtenues au sein de ce chapitre confirment la possible utilisation de la moule zébrée comme espèce sentinelle des contaminations biologiques des cours d'eau. En effet, les dreissènes sont capables d'accumuler et de concentrer les protozoaires et particulièrement le toxoplasme dans leurs tissus.

De plus, en ce qui concerne T. gondii, l'accumulation est temps- et dose-dépendante et reste mesurable au minimum 14 jours après l'exposition avec une accumulation préférentielle au sein du manteau et de l'hémolymphe des individus. Considérée comme une matrice simple, l'hémolymphe procure des avantages certains en surveillance puisque le prélèvement ne nécessite ni le sacrifice de l'animal ni l'étape de digestion enzymatique des tissus.

En conditions naturelles, l'ADN du toxoplasme a été détecté dans les tissus de dreissènes en aval de stations d'épuration des eaux de 2 villes sur 5 échantillonnées ainsi que sur un site présentant d'importantes activités nautiques.

L'utilisation des dreissènes peut être envisagée avec les stratégies de biosurveillance active et passive pour révéler la présence de T. gondii dans un contexte de surveillance sanitaire des masses d'eaux.

Chapitre 3 : Etudes des réponses
cellulaires et immunologiques des
hémocytes de la moule zébrée lors
d'expositions *ex vivo* à
Cryptosporidium parvum et
Toxoplasma gondii.

Il a été montré que les oocystes (de *T. gondii*) étaient retrouvés en grande partie au sein de l'hémolymphe après une période d'exposition mais également après deux semaines de dépuration. Cette observation soulève des interrogations quant à l'interaction entre les cellules hématocytaires, garantes de l'intégrité immunitaire des organismes et les protozoaires. Notre objectif a été de déterminer les effets des interactions entre les oocystes de *T. gondii* et de *C. parvum* et les hématocytes de dreissenés par la méthode de cytométrie en flux. Différentes stratégies ont été mises en place dans l'évaluation des effets biologiques en fonction des protozoaires. Le toxoplasme ayant pratiquement la même taille que les hématocytes (10-12 μm pour les oocystes vs. 8-12 μm pour les hématocytes), seuls les effets au niveau cellulaire (abondance et mortalité des hématocytes) ont été déterminés sur l'ensemble de la population hématocytaire avec cependant, une distinction entre les hyalinocytes (H) et les granulocytes (G). Les ratios oocyste:cellule testés sont faibles avec 1 oocyste pour 4 hématocytes (1:4), 1 pour 2 (1:2) et 1 pour 1 (1:1). Concernant *C. parvum*, la petite taille des oocystes (4-5 μm) permet d'envisager une éventuelle phagocytose des oocystes par les hématocytes. L'efficacité de phagocytose a été mesurée et comparée après une exposition à des billes de latex fluorescentes ou à des oocystes-FITC de *C. parvum*. Les expositions ont été réalisées avec des ratios oocyste:cellule plus élevés, 1:1, 5:1 et 10:1. Les réponses biologiques abordées sont de type cellulaire (mortalité des hématocytes) et immunologique (capacité de phagocytose) et sont centrées sur les cellules qui participent activement à ce processus : les granulocytes (Tableau 5).

Tableau 5 : Les différentes conditions d'expérimentations présentées dans le chapitre 3.

Type exp	Pathogène(s)	Matrices	N / condition	Réponse(s) mesurée(s)	Technique	Conditions expérimentales		Traitement	Résultats
						Dose (oocyste:hémocyte)	Temps (h)		
ex vivo	T. gondii	Hémocytes	3 pools de 6 Hémolymphes	Abondance H/G	Cytométrie en flux	1:4	1 h	Incubation IP	% de cellules mortes
				Mortalité totale/H/G		1:2	3 h		
						1:1			
	Mortalité G			1:1		1 h			
				2:1		2 h			
				10:1		4 h			
	C. parvum			Phagocytose		5:1	4 h	Marquage Anticorps Fluorescent	% de phagocytes + % de cellules ayant phagocyté 3 oocystes et plus
						1:1			
5:1									
	10:1								

Exp : expérimentation, H : hyalinocytes, G : granulocytes

1. Introduction

Les bivalves sont dotés d'un système circulatoire semi-ouvert, c'est-à-dire que l'hémolymphe circule dans les vaisseaux et le cœur mais également au travers des organes (Cochennec-Laureau et al. 2003). Les cellules clefs du maintien de l'homéostasie des organismes invertébrés sont les hémocytes. En effet, les fonctions des hémocytes sont variées et représentent des activités essentielles telles que le transport et la digestion des nutriments, la respiration, l'excrétion, les réparations aussi bien de l'organisme que de la coquille (biominéralisation) et les défenses immunitaires (Cheng, 1981).

Les hémocytes sont présents au sein de l'hémolymphe mais des études ont également mis en évidence la présence d'hémocytes au sein des liquides extrapalléaux ayant des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles similaires (Allam et Paillard, 1998). D'autres études ont mis en évidence l'augmentation du nombre d'hémocytes dans le liquide extrapalléal après des situations de stress ce qui confirme le rôle des cellules hémocytaires au sein des premières lignes de défense des invertébrés (Trinkler et al. 2011). Les hémocytes de bivalves sont généralement divisés en 2 types cellulaires à savoir les granulocytes représentés par des cellules de grande taille dotées de larges granules et les hyalinocytes qui sont des cellules de petite taille et dépourvues de granules (Bachère et al. 1995 ; Hine 1999). Cependant, leur origine n'est pas clairement définie et la distinction entre les populations hémocytaires des bivalves est un sujet controversé au sein de la communauté scientifique. Deux hypothèses sont proposées à savoir que les deux populations (hyalinocytes et granulocytes) sont clairement définies et distinctes selon l'hypothèse de Cheng (1981) ou, dans celle de Mix (1976), la population de hyalinocytes est capable de prolifération et de maturation en granulocytes.

L'immunité des invertébrés repose uniquement sur l'immunité innée (ou non spécifique) contrairement aux organismes vertébrés qui possèdent une immunité dite acquise (ou

spécifique) en complément. Cependant, quelques études ont mis en évidence un phénomène d' « amélioration de l'immunité » (comparé au phénomène de mémoire chez les vertébrés) chez des organismes invertébrés puisque une réinfection à un même challenge bactérien (homologue) entraîne une réduction des taux d'infections ou une augmentation significative des taux de survie/fécondité des organismes par rapport à ceux ayant subi une réinfection hétérologue (Rowley et Powell, 2007 pour revue). L'immunité innée repose sur deux types de réponses mais néanmoins complémentaires, les réponses à médiation cellulaire et les réponses à médiation humorale (Koutsogiannaki et Kaloyianni, 2010 ; Perez et Fontanetti, 2011). Les réponses humorales sont constituées de différents effecteurs comme les enzymes hydrolytiques lysosomales, les lectines, les inhibiteurs de protéases ou encore les peptides antimicrobiens (Canesi et al. 2002 ; Beutler 2004 ; Tiscar et Mosca, 2004). Le système phénoloxydase (Renwrantz et al. 1996) et la capacité de production rapide d'espèces réactives de l'oxygène, ERO, participent également à l'homéostasie immunitaire (Beaven et Paynter, 1999 ; Dang et al. 2011).

Les réponses de type cellulaire reposent principalement sur l'hémocytose, l'encapsulation ou la phagocytose.

Le phénomène d'hémocytose, ou agrégation cellulaire, est souvent associé à la coagulation chez les vertébrés et est assuré par les cellules de types hyalinocytes en cas de stress afin d'augmenter les défenses sur le lieu de l'infection ou en cas de besoins de réparation des tissus ou de la coquille (Hégaret et Wikfors, 2005 ; Renwrantz et al. 2013). Contrairement au phénomène de coagulation, l'agrégation hémocytaire est réversible et peut-être diminuée ou inhibée en incubant les cellules à de basses températures ou en ajoutant des substances au milieu du type EDTA ou encore de la caféine (Auffret et Oubella, 1997).

La phagocytose est quant à elle, assurée par les cellules de grande taille, les granulocytes, et correspond à l'ingestion et à l'élimination des corps étrangers. Plusieurs étapes sont nécessaires pour une destruction complète de ces derniers à savoir une première phase de reconnaissance et d'adhésion aux éléments du non-soi qui peut être passive ou active. La

reconnaissance active fait intervenir des cibles moléculaires spécifiques des protozoaires microbiens, les PAMPs (pathogen associated molecular patterns) ou des protéines solubles présentes dans le milieu de type opsonines (Medzhitov et Janeway, 2000). L'internalisation est assurée par la formation de pseudopodes et d'un phagosome qui fusionne ensuite avec les lysosomes, pour former un phagolysosome. Enfin, la destruction de l'agent étranger se fait grâce aux enzymes lysosomales et à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). La phagocytose est donc un processus majeur dans l'immunité des bivalves puisqu'il implique des réponses non seulement cellulaires mais aussi humorales. Deux mesures de la capacité de phagocytose sont généralement employées à savoir l'*activité de phagocytose*, qui correspond à la proportion de phagocytes dans la population totale, et l'*indice de phagocytose* qui représentent le nombre moyen d'éléments phagocytés par cellule (Ellis et al. 2011). L'encapsulation correspond à la prise en charge des corps étrangers trop imposants pour être phagocytés qui sont détruits de façon extracellulaire par les hémocytes couplé à la sécrétion de peptides antimicrobiens (Donaghy et al. 2009 : Fig 12).

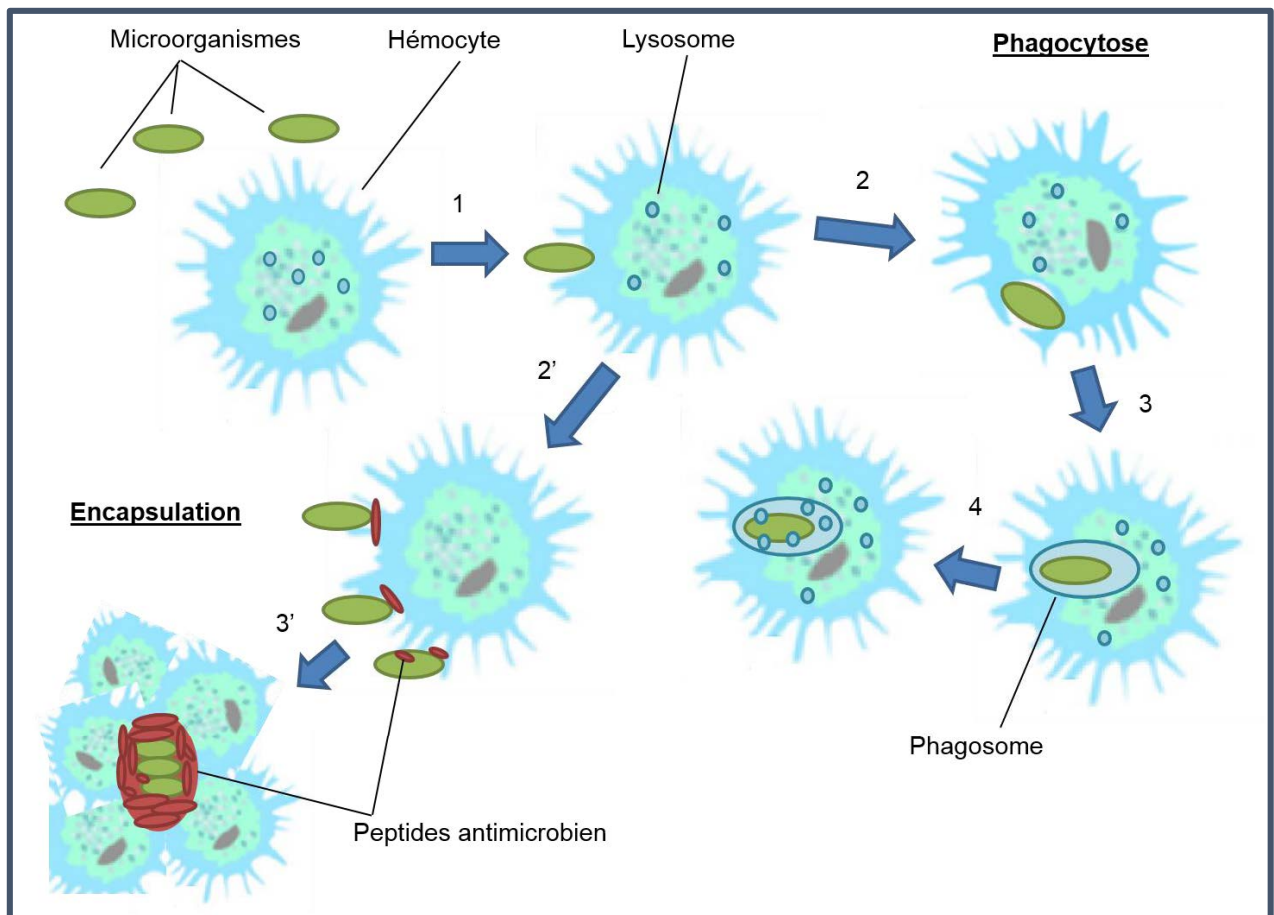


Figure 12 : Schéma des processus de phagocytose et d'encapsulation modifié d'après Donaghy et al. 2009. La phagocytose permet la destruction intracellulaire des agents microbiens de petite taille par les hémocytes. La première étape est la phase de reconnaissance et d'adhésion des microorganismes par les cellules (1), puis l'internalisation dans la cellule à l'aide des pseudopodes (2) à l'intérieur du phagosome (3) et enfin la destruction du microorganisme grâce aux lysosomes et à la production d'ERO au sein du phagolysosome (4). L'encapsulation permet la destruction extracellulaire des protozoaires de grande taille après la sécrétion de peptides antimicrobiens (2') éventuellement par l'action de plusieurs hémocytes (3').

Initialement utilisée à des fins médicales, l'utilisation de la cytométrie en flux s'est développée ces vingt dernières années pour étudier les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des cellules de mollusques afin de déterminer leurs rôles au sein du système immunitaire (Ashton-Alcox et Ford, 1998 ; Brousseau et al. 2000 ; Renault et al. 2001 ; Allam et al. 2002 ; Goedken et de Guise, 2004, Castellanos-Martínez et al. 2014). Chez les bivalves, les réponses immunitaires les plus couramment mesurées sont le nombre d'hémocytes (THC pour *total hemocyte count*), la capacité de phagocytose et la production d'ERO (Mydlarz et al. 2006).

Ce chapitre a pour objectif de déterminer les effets des oocystes de *T. gondii* et de *C. parvum* sur les réponses biologiques des hémocytes qui sont couramment utilisées pour définir l'état de santé des organismes, à savoir la mortalité et l'abondance cellulaire et la capacité de phagocytose.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Préparation des échantillons

2.1.1. Les hémocytes

L'hémolymphe des dreissènes est prélevé directement dans le muscle adducteur à l'aide d'une seringue. Les échantillons sont poolés sur un minimum de 6 individus afin de réaliser l'intégralité de l'expérimentation sur le même pool d'origine (Hégaret et al. 2003a). Ainsi, des comparaisons pourront être réalisées entre les concentrations de protozoaires mais aussi entre les différents temps d'exposition effectués. Les hémocytes sont conservés dans l'hémolymphe durant les expérimentations. Les échantillons sont stockés sur de la glace afin de limiter l'agrégation cellulaire propre aux hémocytes (Gourdon et al. 2001). Les échantillons sont observés au microscope afin d'effectuer un premier comptage cellulaire à l'aide de cellule de numération de type Kova (Kova slide, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) (Fig. 13).

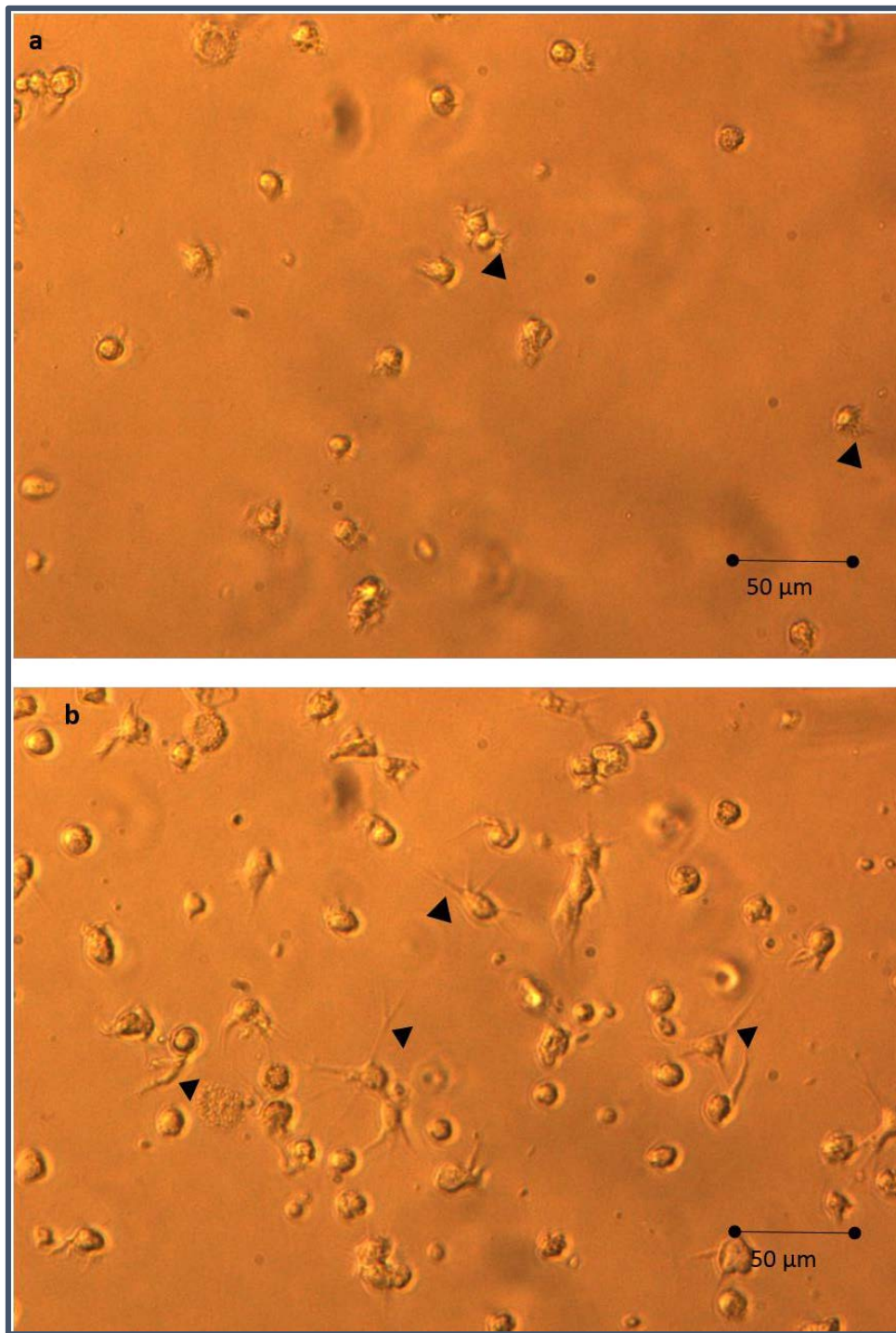


Figure 13 : Diversité et mobilité des hémocytes de dreissènes observés au microscope à lumière inversée. Photo a prise directement après le prélèvement d'hémolymphes et la photo b correspond au même focus 30 minute après la première. Observation de l'émission de pseudopodes (tête de flèche).

Les échantillons sont analysés avec la technique de cytométrie en flux avec un cytomètre BD Accuri™ C6 (Biosciences, Le Pont de Claix, France). Une première étape permet de focaliser

les acquisitions des résultats sur les cellules hémocytaires et de s'affranchir des débris présents dans l'échantillon (Fig. 14a). L'observation des cellules hémocytaires de dreissènes au cytomètre permet la distinction entre 2 sous populations dénommées ici région 'H' pour les hémocytes de petite taille et de faible complexité (hyalinocytes) et la région 'G' qui représente les hémocytes de grande taille et de plus forte complexité (granulocytes). En fonction des besoins de l'étude, l'acquisition des résultats sera effectuée sur toute la population hémocyttaire (région 'hemocytes') ou sera focalisée sur la région 'H' ou 'G'. Quel que soit la région d'intérêt, le conditionnement du signal sera calibré pour permettre une lecture de 5.10^3 à 10^4 évènements cellulaires dans la région d'étude.

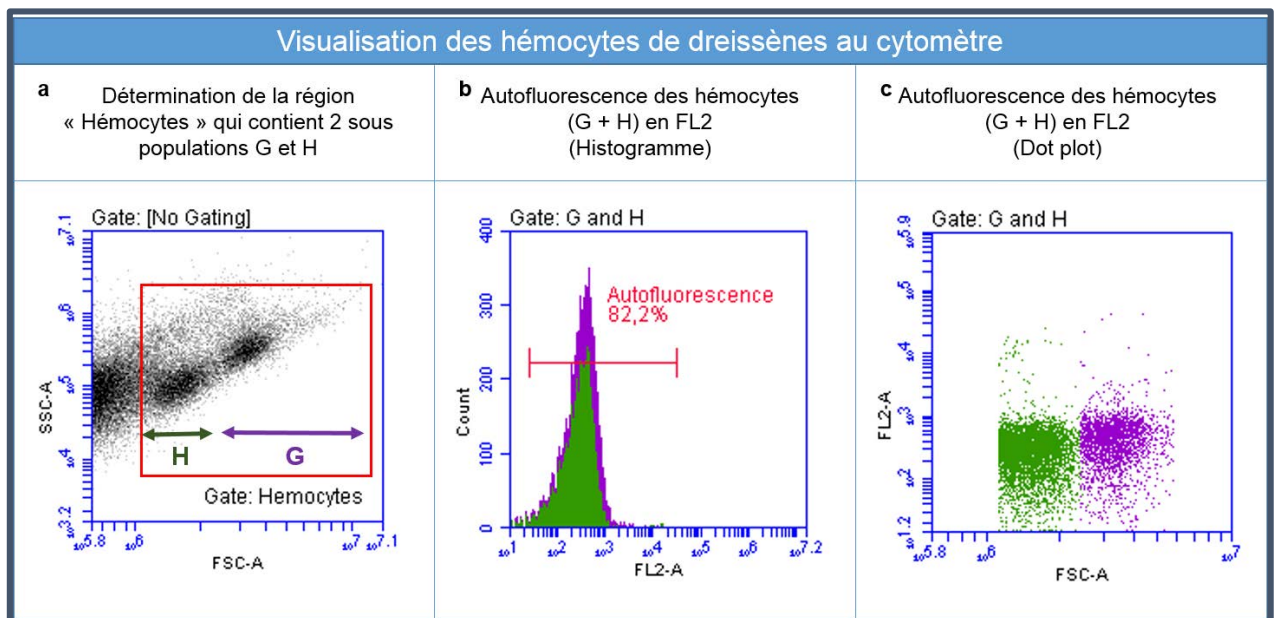


Figure 14 : Visualisation des hémocytes de dreissènes au cytomètre : les cellules sont distinguées des débris présents dans l'échantillon, puis une région (ou « gate ») est créée afin de centrer l'acquisition des résultats sur la région « Hémocytes ». Celle-ci présente deux sous populations, H (en vert) et G (en violet) qui diffèrent selon leur taille et leur complexité (a). Dépourvus de marquage, les deux sous populations présentent un niveau de fluorescence identique (b : histogramme de fluorescence FL2 et c : dot plot représentant la fluorescence en fonction de la taille des cellules).

SSC-A : complexité ; FSC-A : taille ; FL2-A : émission dans l'orange.

2.1.2. *Toxoplasma gondii*

Les oocystes de *T. gondii* sont conservés dans l'acide sulfurique à 2 %. Avant de mesurer leurs caractéristiques au cytomètre, les oocystes sont lavés 3 fois dans du PBS (3 600 × g, 10 min). La détection des oocystes de *T. gondii* est réalisée sur le même principe que pour les hémocytes. Une région est créée afin de s'affranchir des débris présents dans l'échantillon. L'autofluorescence des oocystes est détectée en FL2. Après un marquage à l'IP, une distinction peut être faite entre les oocystes intacts et dégradés (Fig. 15 et chapitre 1 : article 2).

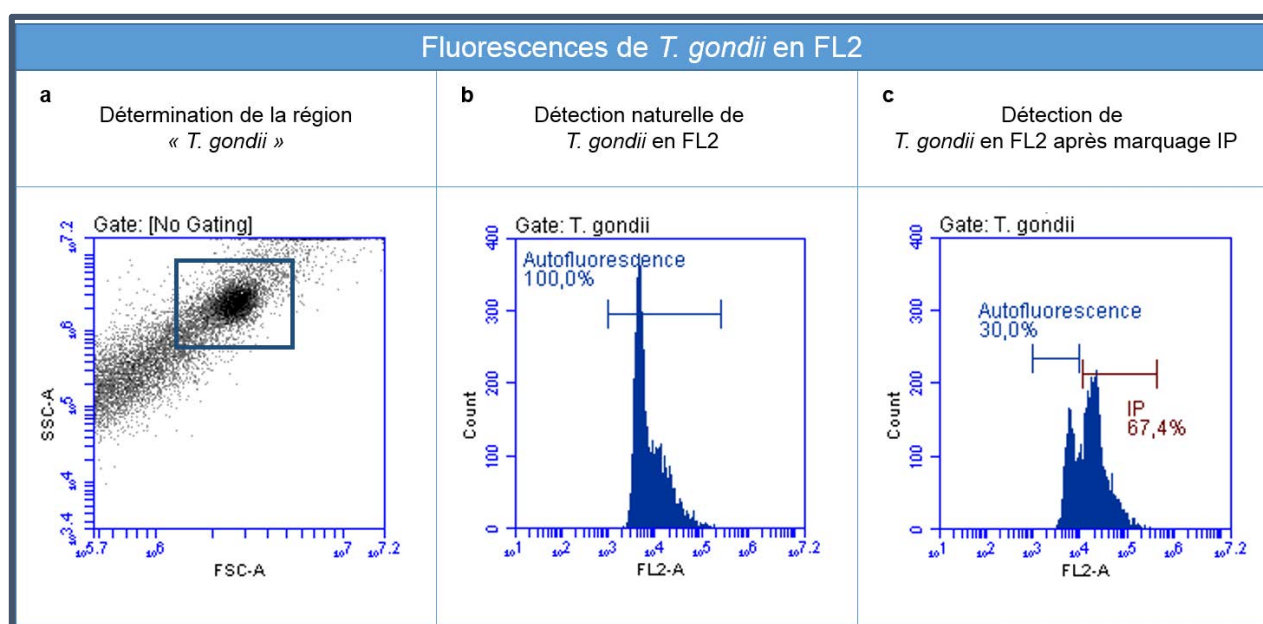


Figure 15 : Visualisation des oocystes de *T. gondii* au cytomètre : la région '*T. gondii*' permet de supprimer les débris de l'échantillon et de focaliser l'acquisition des résultats au sein de cette région (a). L'autofluorescence des oocystes est détectée en FL2 (b). Le marquage à l'IP permet de distinguer deux pics de fluorescence (c) indiquant qu'une partie des oocystes de l'échantillon possèdent des parois altérées (sporocystes et/ou oocystes).

SSC-A : complexité ; FSC-A : taille ; FL2-A : émission dans l'orange.

2.1.3. *Cryptosporidium parvum*

Le marquage de *C. parvum* se fait de manière directe avec un anticorps commercialisé spécifique de *Cryptosporidium* et de *Giardia* conjugué à la FITC (Cell RR2, Théradiag, Marne-la-Vallée, France). Le protocole de marquage a été optimisé aux oocystes en suspension d'après Chesnot et al. (2002). Les anticorps sont dilués au 20^e dans du PBS avant d'être ajoutés à raison de 40 µl pour 100 µl de solution de *C. parvum*. La solution est alors incubée à 37 °C pendant 30 min pour permettre la liaison antigène-anticorps. Une fois le marquage réalisé, les protozoaires peuvent être observés par microscopie ou cytométrie (Fig. 16).

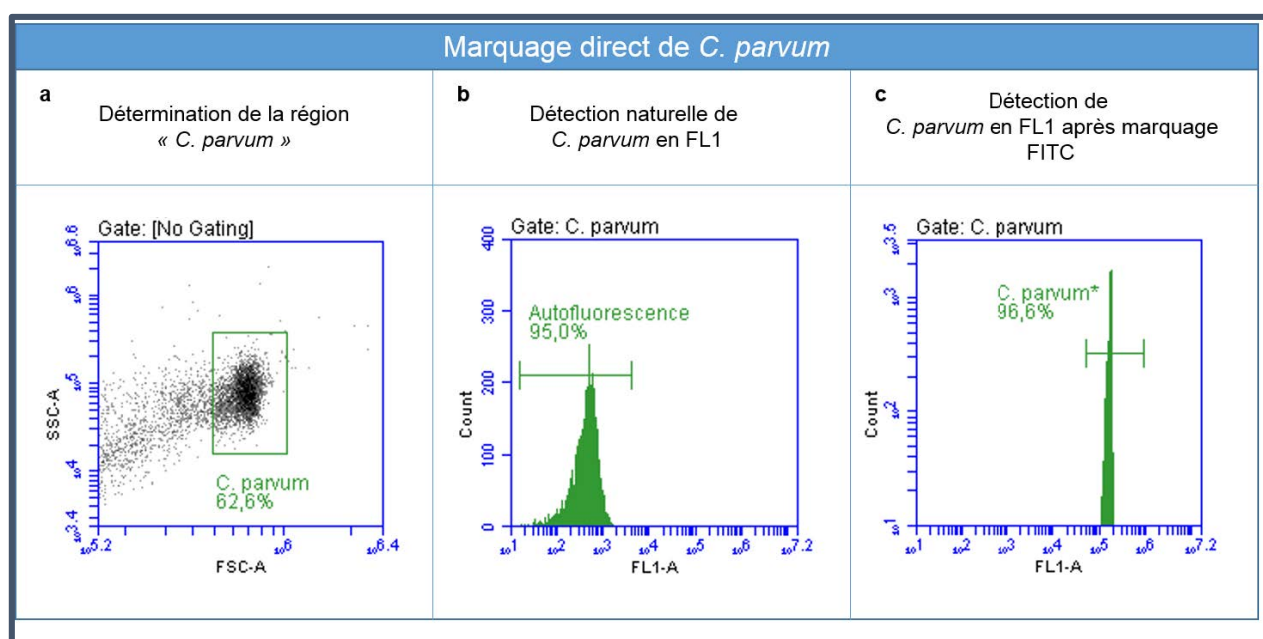


Figure 16 : Visualisation des oocystes de *C. parvum* au cytomètre : la région '*C. parvum*' permet de supprimer les débris de l'échantillon et de focaliser l'acquisition des résultats au sein de cette région (a). L'autofluorescence des oocystes est détectée en FL1 (b). Le marquage direct avec un anticorps-FITC permet d'affiner la détection des oocystes marqués au cytomètre (c).

SSC-A : complexité ; FSC-A : taille ; FL1-A : émission dans le vert.

2.2. Incubations

Des expérimentations préliminaires ont permis de calibrer les concentrations ainsi que les temps d'expositions des hémocytes avec les oocystes de *T. gondii* et *C. parvum*.

En ce qui concerne les expositions à *T. gondii*, la viabilité des hémocytes a été mesurée après 1 et 3 h d'incubations. Considérant la taille des oocystes de toxoplasme (10-12 μm), les incubations ont été réalisées avec les ratios protozoaire-cellule faibles de 1:4, 1:2 et 1:1.

Pour les expositions à *C. parvum*, les mesures de viabilité des hémocytes ont été effectuées après 1, 2 et 4 h d'exposition avec des concentrations en protozoaire plus élevées de 1:1, 2:1 et 10:1. L'activité de phagocytose des billes est mesurée après 4 h avec un ratio de 5:1 et celle de *C. parvum*-FITC au bout de 4h avec les ratios 1:1, 5:1 ou 10:1.

2.3. Détermination de la mortalité cellulaire

Afin de mesurer la mortalité cellulaire, les hémocytes sont calibrés à 10^5 cellules dans un volume de 240 μl de PBS. Puis, les échantillons sont incubés 15 min avec 10 μl d'iodure de propidium (IP, Sigma-Aldrich, France) à une concentration de 0,1 mg/ml. La fluorescence émise par les cellules qui ont intégré l'IP (non viables) est mesuré en FL2 (émission de fluorescence dans l'orange) sur 10^4 évènements de la région d'intérêt (Fournier et al. 2001) (Fig. 17).

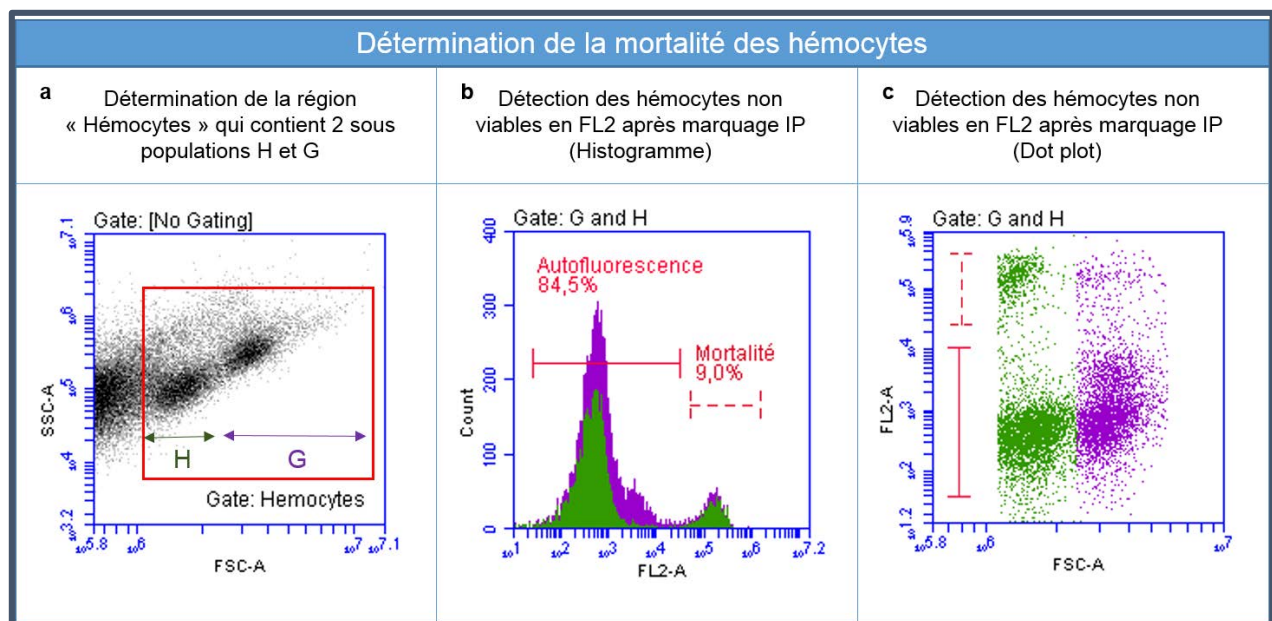


Figure 17 : Détermination de la mortalité cellulaire au cytomètre en flux : Après un marquage à l'iodure de propidium (IP), les cellules mortes ayant intégrées l'IP présentent une fluorescence plus importante que les cellules viables observables sur un histogramme (b) ou sur un dot plot fluorescence/taille (c).

SSC-A : complexité ; FSC-A : taille ; FL2-A : émission dans l'orange.

2.4. Mesure de l'activité de phagocytose des hémocytes

La capacité de phagocytose a été testée uniquement avec *C. parvum* du fait de sa taille acceptable (4-6 μm) pour être phagocyté par les hémocytes (Blaise et al. 2002). De plus, la mesure de l'activité de phagocytose est réalisée uniquement sur la région G qui représente les cellules de type granulocytes (Fig. 18a). En effet, ces cellules sont les plus actives dans le processus de phagocytose des particules. L'activité de phagocytose des hémocytes est mesurée après incubation de 4 h soit avec des billes de latex fluorescentes de 1,712 μm de diamètre (fluoresbrite YG microspheres, Biovalley, Marne-La-Vallée, France), soit avec des oocystes-FITC de *C. parvum* à l'obscurité et à 16 °C. La fluorescence des cellules ayant possiblement phagocyté les particules fluorescentes est mesurée en FL1 (émission de fluorescence dans le vert) sur 10^4 évènements de la région d'intérêt. Pour la phagocytose des billes de latex, et au vu de leur petite taille, la réelle activité de phagocytose est représentée par les cellules ayant phagocyté trois billes et plus (Duchemin et al. 2008). Pour l'analyse des

résultats, les phagocytes sont séparés en deux populations : ceux ayant phagocyté 1 ou 2 particule(s) fluorescente(s) (bille ou *C. parvum*-FITC), et ceux ayant phagocyté 3 particules et plus (Fig. 18c).

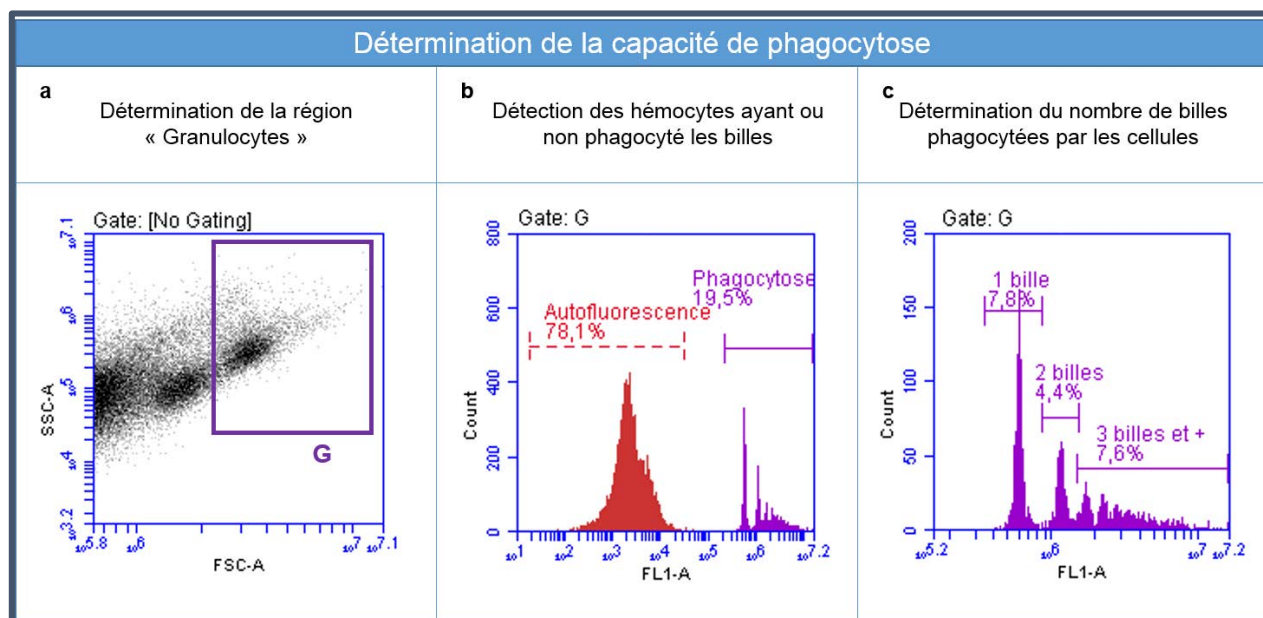


Figure 18 : Mesure de l'activité de phagocytose des hémocytes de la région G au cytomètre en flux : l'acquisition des résultats est centrée sur la région G qui représente des cellules de grande taille et de forte complexité (a). Après une exposition avec des particules fluorescentes telles que des billes de latex, les cellules ayant phagocyté les billes présentent une fluorescence plus importante que l'autofluorescence des cellules observable sur un histogramme (b). La mesure de l'activité de phagocytose peut être définie à travers les pics générés sur l'histogramme qui représentent le nombre de phagocytes dans la population totale de la région G (c).

SSC-A : complexité ; FSC-A : taille ; FL1-A : émission dans le vert.

Afin de vérifier si les protozoaires marqués FITC ont subi le processus de phagocytose, un test de validation au bleu trypan (BT) a été réalisé selon le protocole de Nuutila et Lilius, (2005). Le BT va jouer le rôle de « quencher » dans l'échantillon en inhibant la fluorescence de la fluorescéine (Fig. 19). Ceux ayant été effectivement phagocytés se trouvent protégés de cette inhibition dans la cellule hémocytaire et la fluorescence peut être mesurée par le cytomètre. Après la première lecture de phagocytose, 1,2 mg/ml de BT est ajouté à l'échantillon et une deuxième lecture est réalisée en FL1.

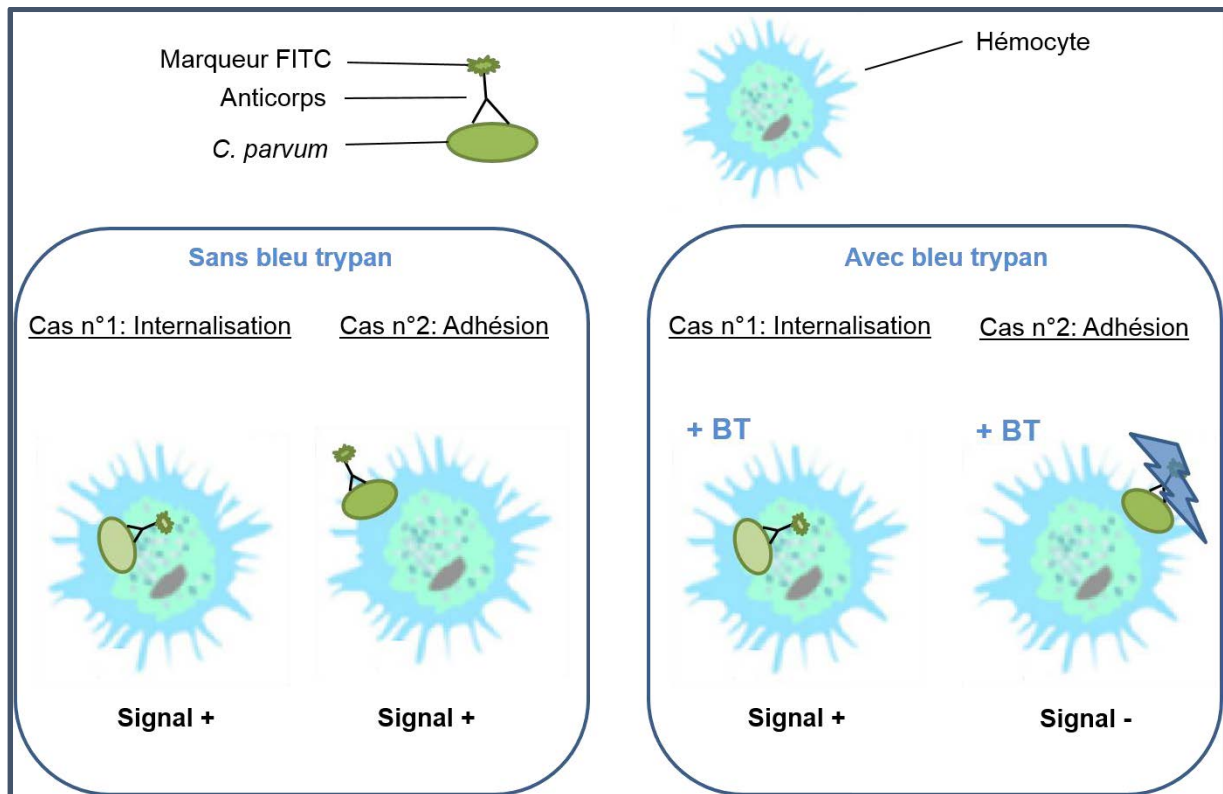


Figure 19 : Test de validation de l'internalisation des particules fluorescentes avec le bleu trypan (BT) : sans BT dans le milieu, le signal émis par les oocystes-FITC sera mesuré en cytométrie en flux même si le protozoaire n'est pas internalisé dans la cellule. L'ajout de BT dans le milieu va permettre d'inhiber la fluorescence des oocystes lorsque ceux-ci sont libres dans le milieu.

3. Résultats

3.1. Interactions *Toxoplasma gondii* – hémocytes

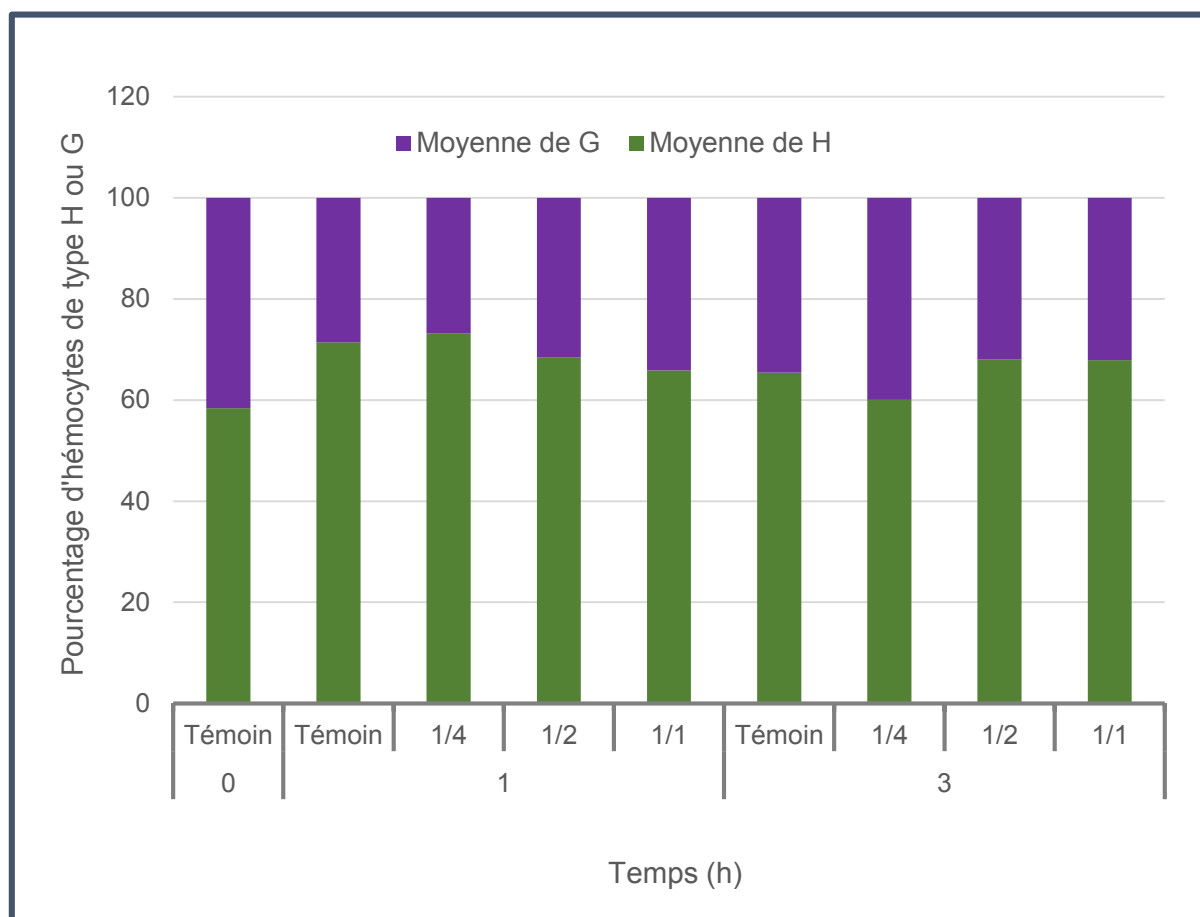


Figure 20 : Pourcentage d'hémocytes issus des deux sous-populations H (hyalinocytes) ou G (granulocytes) en conditions témoin (0, 1 et 3 h) ou après une incubation de 1 et 3 h avec des oocystes de *T. gondii* : ratios oocystes-cellules de 1:4, 1:2 ou 1:1 (N = 3 pools de 6 hémolymphes).

L'analyse des hémocytes de dreissène en cytométrie en flux indique deux sous populations, une première de type H pour hyalinocyte, qui représente les hémocytes de petite taille et de faible complexité et une deuxième de type G pour granulocyte, qui représente les hémocytes de grande taille et de forte complexité. La proportion cellulaire est plus importante pour le groupe des hyalinocytes qui représente entre 60 et 70 % de la population hémocytaire dans les conditions témoins après le prélèvement et ce jusqu'à 3 h. Pour les hémocytes ayant été

exposés à des oocystes de *T. gondii*, aucune variation de la proportion cellulaire n'est mise en évidence et ce jusqu'à 3 h d'exposition à l'obscurité et à 16 °C avec différents ratio oocyste:cellule de 1:4, 1:2 et 1:1 (Fig. 20).

Les régions ont été définies pour les oocystes de *T. gondii* et les hémocytes de dreissènes au départ de l'exposition (Fig. 21). Durant ces expérimentations de contact oocyste:hémocyte, la mortalité des hémocytes a été déterminée à l'aide du test d'iodure de propidium (IP) et mesurée en cytométrie après 0, 1 et 3 h d'expositions. Au départ de l'exposition, la mortalité mesurée sur l'ensemble des hémocytes s'élevait à 13 % ($\pm 0,1$) puis à 14,2 % ($\pm 2,3$) et à 20,1 % ($\pm 1,3$) au bout de 1 et 3 h respectivement. Une augmentation de la mortalité cellulaire est mise en évidence pour les deux temps testés pour la concentration de 1 oocyste pour 1 hémocyte (Tableau 6).

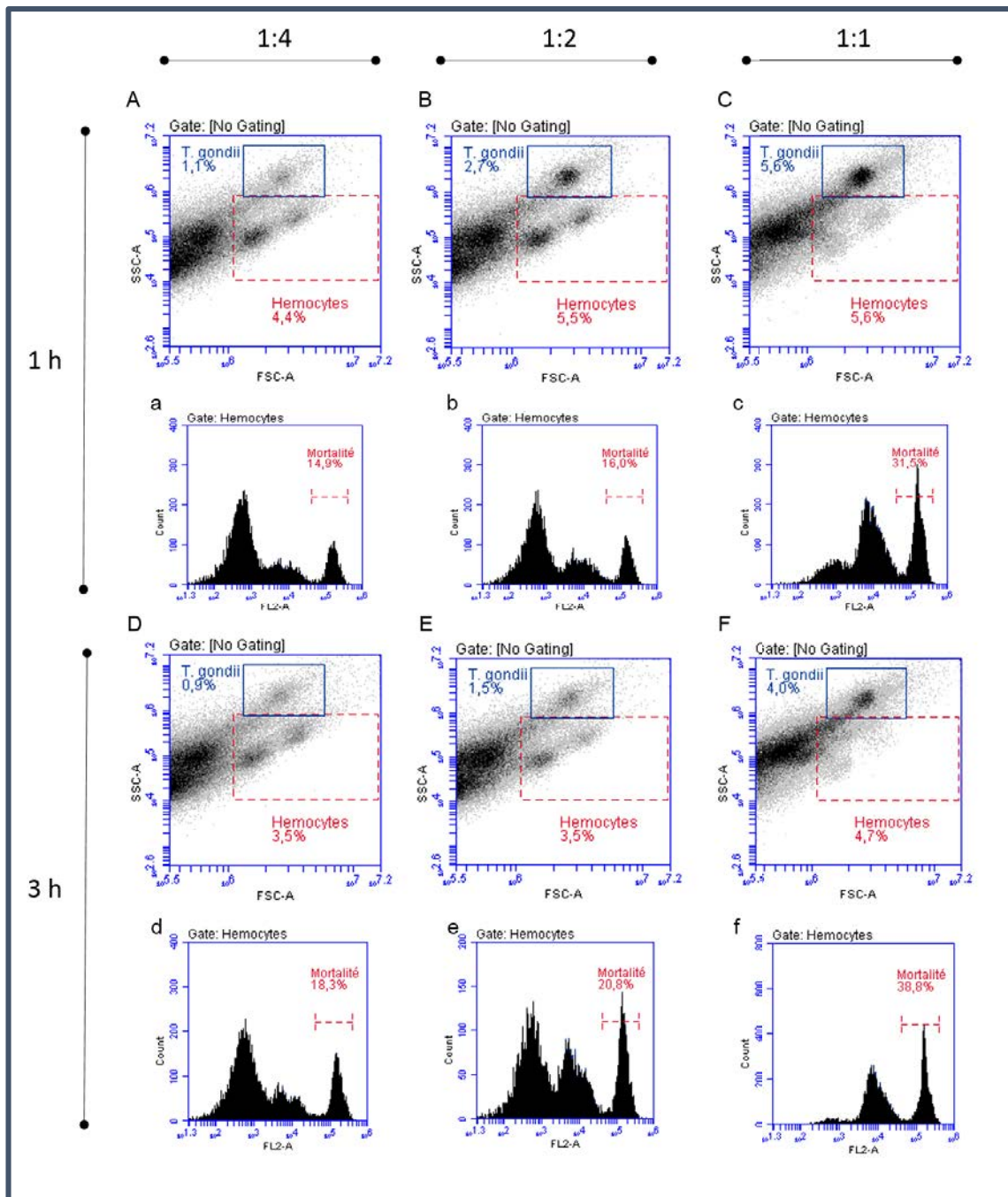


Figure 21 : Interactions entre les oocystes de *T. gondii* et les hémocytes de dreissènes. Les dots plots représentent les deux régions définies pour les oocystes et les hémocytes (A-F) et les histogrammes correspondants représentent la mortalité cellulaire mesurée (a-f) après exposition à l'obscurité et à 16 °C. Les expositions ont été réalisées avec des concentrations oocyste:cellule de 1:4 (A, a et D, d), 1:2 (B, b et E, e) et 1:1 (C, c et F, f) et la mortalité a été mesurée après 1 h (a, b, c) et 3 h (d, e, et f) d'exposition.

SSC-A : complexité ; FSC-A : taille ; FL2-A : émission dans l'orange.

Tableau 6 : Mortalité des hémocytes totaux, hyalinocytes et granulocytes, mesurée après 15 min d'incubation avec de l'iodure de propidium (IP). La mesure a été effectuée en condition témoin ou après 1 et 3 h d'incubations avec des oocystes de *T. gondii* à différentes concentrations, 1:4, 1:2 et 1:1. * représente une différence significative entre les conditions (N = 3 pool de 6 hémolymphes). Mann-Whitney U-test, $p < 0,05$.

Temps (h)	Oocyste:hémocyte	Hémocytes de <i>D. polymorpha</i>		
		Total	Hyalinocytes	Granulocytes
0	0:1	13 ($\pm 0,1$)	11,6 ($\pm 0,14$)	4,75 ($\pm 2,1$)
	0:1	14,2 ($\pm 2,3$)	10,8 ($\pm 3,1$)	4,1 ($\pm 0,1$)
	1:4	15,5 ($\pm 0,5$)	13,53 ($\pm 0,7$)	5,9 ($\pm 2,3$)
	1:2	15,57 ($\pm 0,4$)	15,03 ($\pm 1,1$)	6,67 ($\pm 1,2$)
	1:1	29,43 ($\pm 1,8$) *	39,1 ($\pm 3,5$) *	20,7 ($\pm 2,8$) *
3	0:1	20,1 ($\pm 1,3$)	18,05 ($\pm 1,2$)	9,1 ($\pm 1,6$)
	1:4	16,9 ($\pm 2,1$)	15,67 ($\pm 1,8$)	8,63 ($\pm 11,3$)
	1:2	19,5 ($\pm 1,2$)	19,73 ($\pm 1,3$)	11,67 ($\pm 4,7$)
	1:1	38,13 ($\pm 0,9$) *	58,73 ($\pm 0,9$) *	52,47 ($\pm 0,4$) *

Au départ de l'exposition, la mortalité mesurée chez les hyalinocytes s'élevait à 11,6 % ($\pm 0,1$) et celle des granulocytes à 4,75 % ($\pm 2,1$). Pour toutes les conditions témoins, la mortalité mesurée au sein des hyalinocytes est toujours plus élevée que celle mesurée au sein des granulocytes avec une moyenne de 10,8 % ($\pm 3,1$) et de 4,1 % ($\pm 0,1$) au bout d'1 h et de 18,1 % ($\pm 1,2$) et 9,1 % ($\pm 1,6$) au bout de 3 h respectivement pour les hyalinocytes et les granulocytes.

Au bout d'1 h d'exposition oocyste:hémocyte, le pourcentage de cellules mortes pour la population des hyalinocytes mesurée est de 13,5 % ($\pm 0,8$), 15,1 % ($\pm 1,1$) et 39,1 % ($\pm 3,4$) pour les ratios de 1:4, 1:2 et 1:1 respectivement. Le même schéma est observé avec la mortalité des granulocytes qui s'élève à 5,9 % ($\pm 2,3$), 6,6 % ($\pm 1,7$) et à 20,7 % ($\pm 2,5$) respectivement pour les ratios de 1:4, 1:2 et 1:1. A la fin de l'exposition, la mortalité mesurée chez les hyalinocytes est de 15,6 % ($\pm 1,8$), 19,3 % ($\pm 1,3$) et 58,8 % ($\pm 0,9$) et de 8,6 % ($\pm 11,3$), 11,6 % ($\pm 4,5$) et 52,4 % ($\pm 0,4$) chez les granulocytes, respectivement pour les ratios

de 1:4, 1:2 et 1:1. La mortalité des deux types hémocytaires au bout de 1 et 3 h d'exposition à un ratio de 1 oocyste de *T. gondii* pour 1 hémocyte est significativement plus élevée que pour les autres conditions testées.

3.2. Interactions *Cryptosporidium parvum* – hémocytes

3.2.1. Mortalité

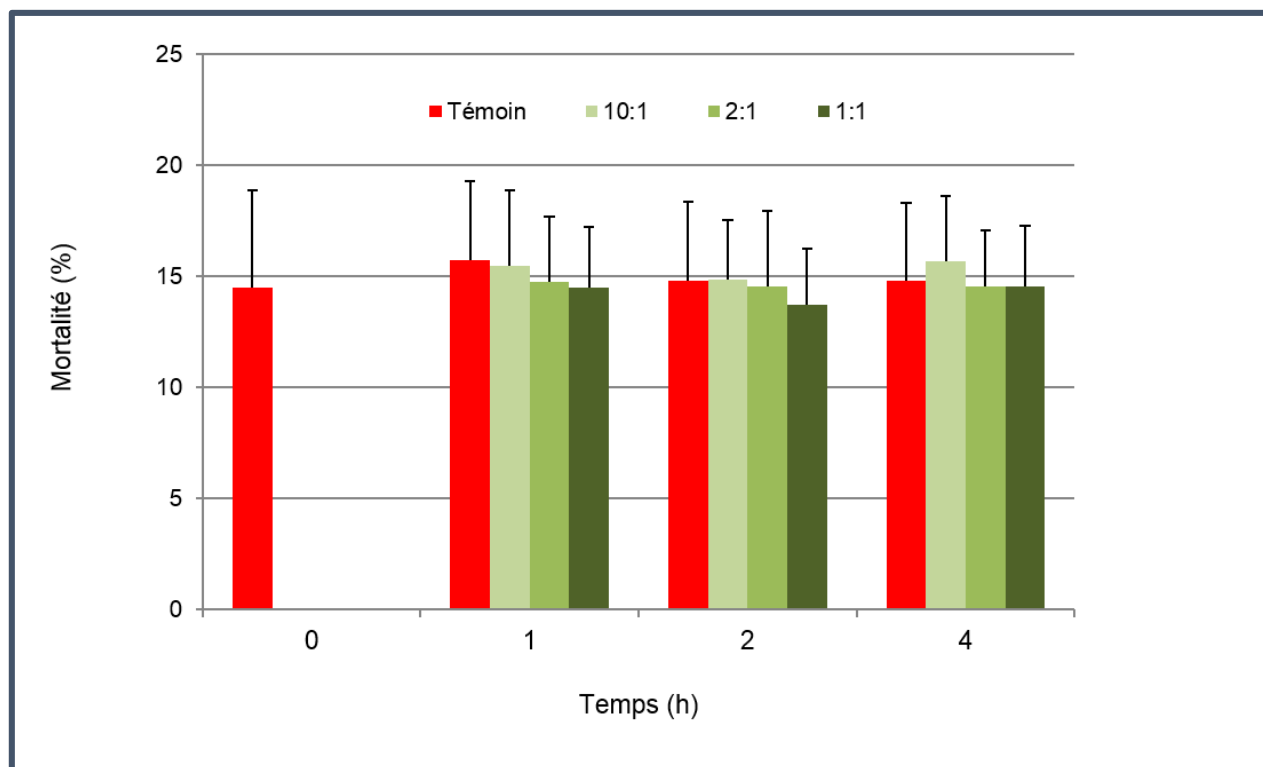


Figure 22 : Mortalité des hémocytes mesurée après 15 min d'incubation avec de l'iodure de propidium (IP). La mesure a été effectuée uniquement sur la population G (granulocytes) en condition témoin (0, 1, 2 et 4 h) ou après 1, 2 et 4 h d'incubation avec des ratios oocystes-cellules de 10:1, 2:1 et 1:1 (N = 3 pools de 6 hémolymphes).

La mesure de mortalité des hémocytes a été centrée sur la région des granulocytes directement après le prélèvement de l'hémolymphe (T0) ou après 1, 2 et 4 h d'exposition aux oocystes de *C. parvum*. En condition témoin, la mortalité mesurée s'élève à 14,4 % ($\pm 4,4$), 15,8 % ($\pm 3,5$), 14,8 % ($\pm 3,6$) et 14,8 % ($\pm 3,4$) respectivement après 0, 1, 2 et 4 h à l'obscurité à 16°C (Fig. 22).

En présence d'oocystes de *C. parvum*, la mortalité des hémocytes ne diffère pas de la condition témoin et ce quel que soit la concentration en oocystes. En effet, la mortalité des hémocytes exposés à 10 oocystes pour 1 s'élève à 15,4 % ($\pm 3,4$), 14,8 % ($\pm 2,6$) et 15,6 % ($\pm 2,9$), celle des hémocytes exposés à 2 pour 1 à 14,7 % ($\pm 2,9$), 14,5 % ($\pm 3,4$) et 14,5 % ($\pm 2,5$) et celle des hémocytes exposés à 1 pour 1 à 14,4 % ($\pm 2,7$), 13,7 % ($\pm 2,5$) et 14,5 % ($\pm 2,7$) respectivement pour 1, 2 et 4 h d'exposition.

3.2.2. Capacité de phagocytose

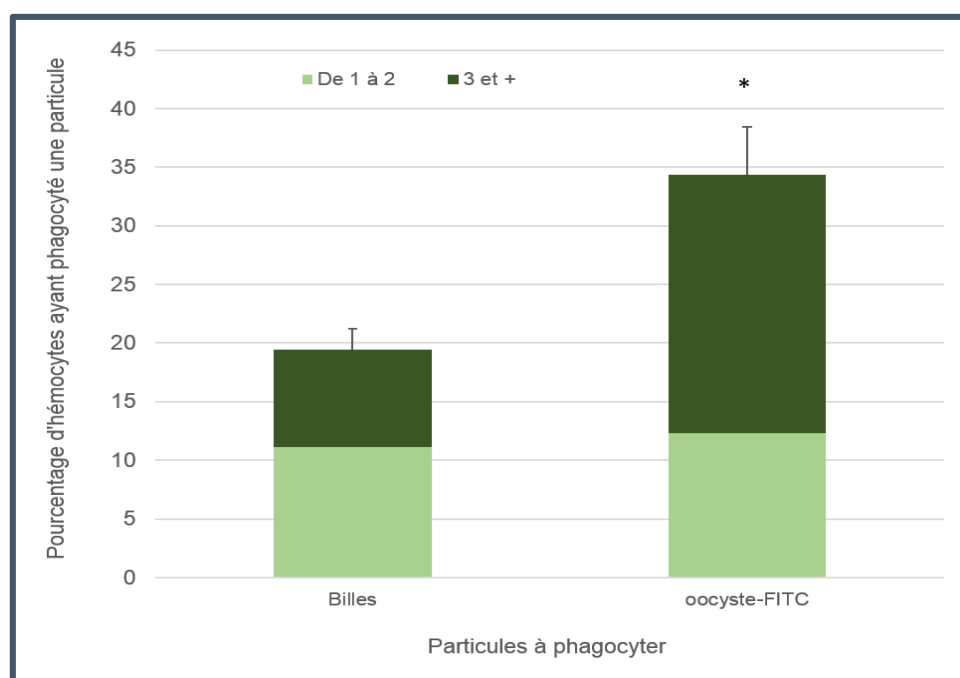


Figure 23 : Pourcentage d'hémocytes issus de la population G (granulocytes) ayant phagocyté des billes de latex fluorescentes ou des oocystes de *C. parvum* marqués avec un anticorps-FITC après 4 h d'incubation à un ratio billes:cellule ou *C. parvum*-FITC:cellule de 5:1. * représente une différence significative entre les conditions (N = 3 pools de 6 hémolymphes). Mann-Whitney U-test, $p < 0,05$.

L'activité de phagocytose a été mesurée au sein de la population de granulocytes. Les expositions ont été réalisées avec deux types de particules à phagocyter, des billes de latex fluorescentes et des oocystes de *C. parvum* marqués grâce à un anticorps conjugué à la FITC. Pour les deux types d'exposition, le ratio a été ajusté à 5 particules pour 1 hémocyte.

Après 4 h d'incubation avec des billes de latex à l'obscurité, une moyenne de 19,4 % ($\pm 1,7$) de la population de granulocytes a phagocyté au moins 1 bille (Fig. 23). Parmi ces phagocytes, 8,3 % ($\pm 0,8$) ont internalisé 3 billes ou plus. En ce qui concerne les expositions aux oocystes de *C. parvum*, les granulocytes ont phagocyté au moins un oocyste pour 34,3 % ($\pm 4,1$) d'entre eux. De plus, 22 % ($\pm 2,8$) ont internalisé au moins 3 oocystes.

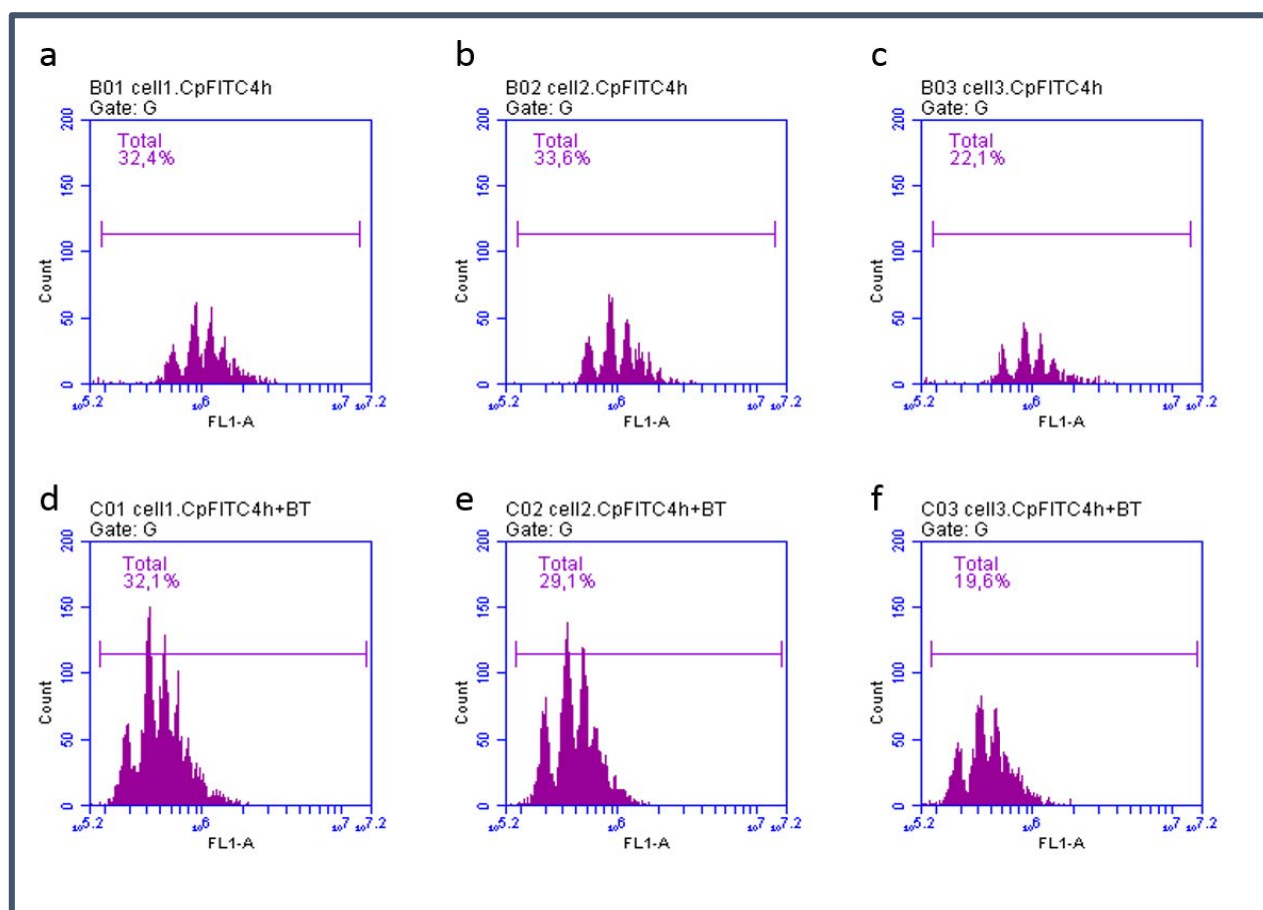


Figure 24 : Validation du test de phagocytose avec le bleu trypan. Histogramme a, b et c représentent l'activité de phagocytose totale des granulocytes respectivement pour les trois pools, après une exposition de 4 h avec des oocystes de *C. parvum*-FITC (ratio 5 oocystes-FITC pour 1 hémocyte) avant l'incubation avec le bleu trypan. d, e et f représentent les histogrammes correspondant respectivement avec a, b et c après l'incubation de 10 minutes avec le bleu trypan. FL1-A : émission dans le vert.

Afin de vérifier l'internalisation des oocystes-FITC de *C. parvum*, deux lectures ont été réalisées en FL1 sur les échantillons, une première lecture directe puis une deuxième lecture après l'ajout de bleu trypan. Après la première lecture, l'activité de phagocytose mesurée est de 32,4, 33,6 et 22,1 % respectivement pour les trois échantillons (Fig. 24). Après l'ajout de BT, l'activité

de phagocytose mesurée est de 32,1, 29,1 et 19,6 % soit une réduction moyenne de 2,4 % ($\pm$ 4,9).

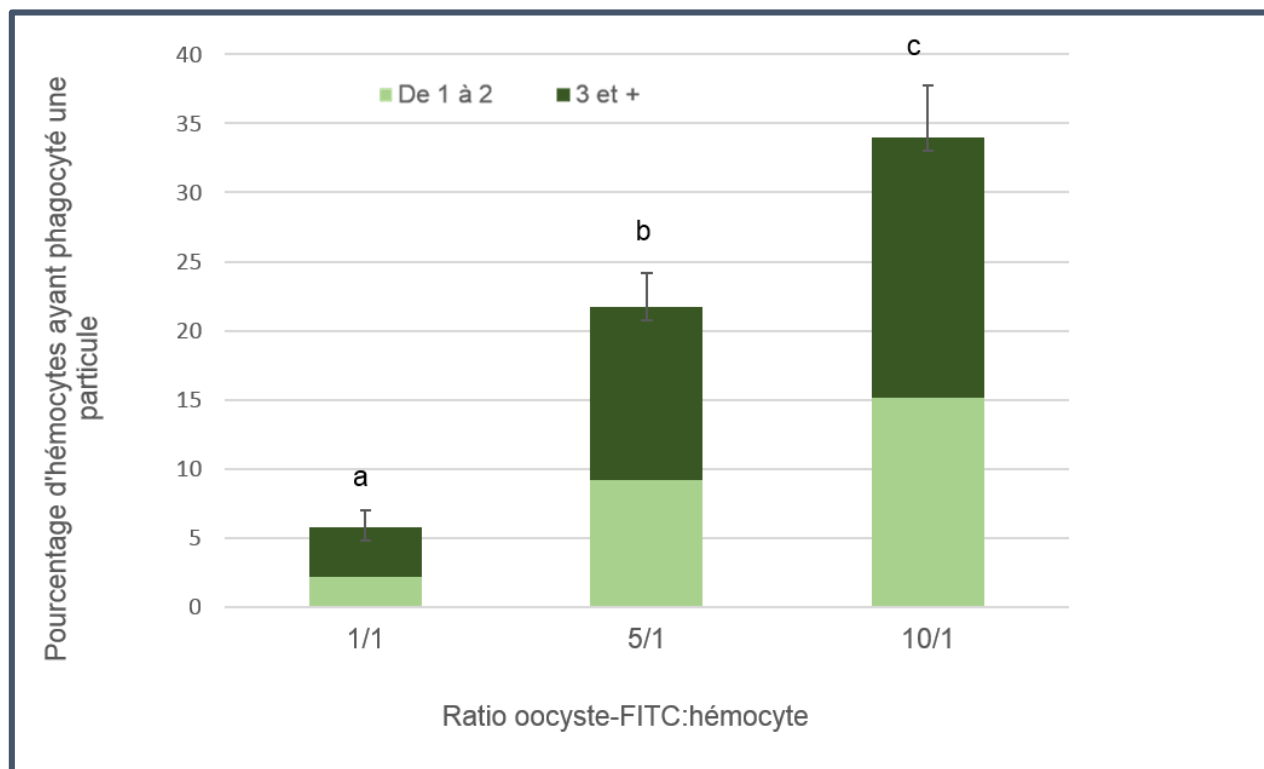


Figure 25 : Pourcentage de granulocytes ayant phagocyté des oocystes de *C. parvum* marqués avec un anticorps FITC après 4 h d'incubation à des ratios oocyste-FITC:cellule de 1:1, 5:1 et 10:1. Les lettres différentes représentent une différence significative entre les conditions (N = 3 pools de 6 hémolymphes). Mann-Whitney U-test, $p < 0,05$.

La capacité de phagocytose des granulocytes vis-à-vis des oocystes de *C. parvum* a été testée avec différents ratios oocyste:hémocyte à savoir 1:1, 5:1 et 10:1. La mesure de l'activité de phagocytose a été réalisée au bout de 4 h d'exposition aux oocystes. La proportion de granulocytes ayant phagocyté au moins un oocyste s'élève à 5,8 % ($\pm$ 1,2), 21,7 % ($\pm$ 2,5) et 34,1 % ($\pm$ 3,7) respectivement pour les concentrations de 1:1, 5:1 et 10:1. Parmi ces phagocytes, 3,6 % ($\pm$ 1,4), 12,6 % ($\pm$ 2,7) et 18,9 % ($\pm$ 4,4) ont internalisé au moins 3 oocystes respectivement pour les concentrations de 1:1, 5:1 et 10:1 (Fig. 25).

4. Discussion

Les observations des hémocytes en condition témoin indique que la population hémocytaire des dreissènes est hétérogène avec une population de petite taille et de faible complexité et une deuxième population qui se distingue de part une taille et une complexité supérieure. Par ailleurs, la proportion de cellules de type hyalinocyte est supérieure à celle des granulocytes puisque en moyenne, sur un pool d'hémocytes, 60 à 65 % sont de type hyalinocyte. Ces résultats sont en accord avec d'autres études sur les hémocytes de l'huître *Crassostrea virginica* (Ashton-Alcox et Ford, 1998 ; Hégaret et al. 2003b) mais ne correspondent pas aux proportions retrouvées chez la moule *Mytilus galloprovincialis* où les hyalinocytes représentent 15 % de la population hémocytaire (Carballal et al. 1998). Chez la moule zébrée, Giambérini et collaborateurs (1996) ont également relevé un taux de granulocytes important de près de 60 %. Dans cette étude, la classification des hémocytes a été effectuée sur 3 classes d'hémocytes chez les dreissènes : les hyalinocytes, les granulocytes et les basophiles qui représentent des cellules contenant des granules mais qui, structurellement, seraient plus proche des hyalinocytes. La comparaison des proportions de cellules est donc espèce dépendante et extrêmement variable au sein même de l'espèce en fonction de la classification prise en compte, du statut physiologique de l'organisme et des facteurs environnementaux pouvant moduler les réponses hémocytaires (Mydlarz et al. 2006 ; Perez et Fontanetti, 2011). Dans notre étude, la mortalité mesurée en condition témoin est en moyenne plus élevée au sein des hyalinocytes que des granulocytes. Lorsque les cellules sont en contact avec différentes quantités d'oocystes de *T. gondii*, ni le nombre d'hémocytes ni la proportion cellulaire ne varient. Certaines études ont montré la capacité de prolifération des hémocytes chez les bivalves au sein des organes mais également dans l'hémolymphe (Pipe et al. 1997 ; Mayrand et al. 2005). Une récente étude sur les variations des populations hémocytaires de *Mytilus edulis* a souligné cette capacité de prolifération puisque, après 2 h d'incubation avec

un analogue de la thymidine fluorescent, le 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU), 10 à 20 % des cellules ont incorporé ce marqueur sur l'ADN nouvellement synthétisé. Cependant ces résultats ont été acquis après un stress subit *in vivo* par les organismes et une ponction de l'hémolymphe postérieure à ce stress (Renwrantz et al. 2013). Les auteurs concluent également que l'augmentation rapide des hémocytes sur le lieu de l'infection ne peut être due uniquement à la prolifération des cellules qui est un phénomène chronophage mais serait liée davantage à une mobilisation de cellules des tissus aux abords du lieu de l'infection dans la circulation. Afin de vérifier ces hypothèses, il serait intéressant de réaliser, en complément d'expositions *ex vivo* de l'hémolymphe, des expérimentations *in tubo* des individus qui permettront de déterminer, en mesurant l'abondance cellulaire, la capacité de prolifération des cellules au sein de l'hémolymphe même et/ou au sein de l'organisme après une exposition aux oocystes de protozoaires.

Les mesures de mortalité indiquent une nette augmentation lorsque les hémocytes sont mis en contact avec les oocystes toxoplasmiques à raison de 1 oocyste pour 1 hémocyte. En effet, la mortalité mesurée est 3,6 et 3,2 fois plus importante pour les hyalinocytes et 2,2 et 5,8 fois plus importante pour les granulocytes par rapport aux témoins respectivement à 1 et 3 h d'exposition aux oocystes de *T. gondii*. Concernant les expositions aux oocystes de *C. parvum*, aucune variation de la mortalité des granulocytes n'est observée et ce quel que soit la charge en oocystes dans le milieu, 1:1, 5:1 et 10:1, ou le temps d'exposition de 1, 2 ou 4 h. Les effets des oocystes de *T. gondii* sur la viabilité des hémocytes sont surprenants au vue de l'augmentation significative de la mortalité cellulaire mesurée après une incubation avec l'IP et ce dès la première heure d'exposition. De plus, cette augmentation significative de la mortalité n'affecte que les cellules ayant été exposées à un ratio de 1:1. Cette observation laisse penser à un effet de saturation des phénomènes de défenses cellulaires et/ou humores. De plus, l'augmentation de la mortalité affecte aussi bien les hyalinocytes que les granulocytes alors que ces derniers sont davantage exposés à la mort cellulaire puisqu'ils produisent une grande quantité d'ERO pour contrer les différents stress (Anderson et al. 1992 ;

Sokolova 2009). Alors que la mort cellulaire peut être liée aux phénomènes d'apoptose ou de nécrose, il s'avère nécessaire de compléter les acquisitions avec un test permettant de distinguer quel phénomène conduit à la mort cellulaire après les expositions aux oocystes de *T. gondii*. En effet, l'augmentation de la mortalité observée après une exposition aux oocystes de toxoplasme peut être due à un effet indirect du système de défense des hémocytes qui tente de contrer l'agent étranger avec la mise en place de la flambée oxydative. Une des limitations de cette expérimentation est que le ratio oocyste:cellule de départ est pris en compte pour l'ensemble des hémocytes et ne différencie pas les hyalinocytes des granulocytes alors que les résultats indiquent que la proportion de petites cellules (hyalinocytes) est plus importante que les grosses cellules. Or, les hyalinocytes possèdent des moyens de défense limités par rapport aux granulocytes puisqu'ils ne participent pas, ou peu, aux processus d'encapsulation ou de phagocytose. De plus, le conditionnement du signal est calibré pour une lecture de $5 \cdot 10^3$ à 10^4 événements sur l'ensemble de la région 'hémocytes' ce qui limite le nombre de cellules effectivement analysées au sein des deux sous populations H et G.

La mesure de la capacité de phagocytose des hémocytes de bivalves peut être réalisée avec des billes de latex fluorescentes ou des microorganismes de type levures (zymozan) ou bactéries (Allam et al. 2001 ; García-García et al. 2008). La phagocytose des oocystes de *C. parvum* par les hémocytes a déjà été démontrée chez l'huître américaine *Crassostrea virginica* (Graczyk et al. 1997a ; Abbott Chalew et al. 2012) et chez la palourde, *Corbicula fluminea* (Graczyk et al. 1997b) par la technique d'immunofluorescence couplée à la microscopie. Dans notre étude, l'utilisation d'oocystes marqués FITC pour mesurer l'activité de phagocytose des granulocytes a été comparée aux billes de latex par cytométrie en flux. Après 4 h d'exposition avec les billes ou les oocystes-FITC, on observe une augmentation de 1,75 fois de l'activité de phagocytose des oocystes-FITC par rapport aux billes de latex. L'amplification de l'activité de phagocytose est très certainement liée à la reconnaissance active des protozoaires par les récepteurs cellulaires de type lectine (Kim et al. 2006 ; Tasumi et Vasta, 2007). Il est important

de noter que la taille d'un oocyste de *C. parvum* est 3 fois plus importante que les billes de latex utilisées (4-6 μm pour les oocystes vs. 1,7 μm pour les billes) ce qui confirme l'augmentation significative de l'activité de phagocytose.

Au sein des granulocytes, près d'un tiers d'entre eux ont phagocyté un minimum de 3 oocystes. De plus, lorsque le bleu trypan (BT) est ajouté au milieu, des pics en FL1 (émission dans le vert), sont toujours détectés au sein de la population de phagocytes et ne diffèrent pas de la première lecture sans BT. Cette observation conforte l'activité de phagocytose dans la phase d'internalisation des oocystes au bout de 4 h d'incubation. La capacité de phagocytose est un des processus de défense le plus important chez les bivalves. De plus, les facteurs impliqués combinent les réponses cellulaires et humorales. Les mesures des enzymes lysosomales ainsi que la production de ROS associés à la phagocytose doivent être réalisées afin de compléter les données.

Afin d'affiner ces observations, des expositions à différentes concentrations d'oocystes (1, 5 ou 10) pour un phagocyte ont été réalisées. Les mesures de l'activité de phagocytose montre un effet dose dépendant avec une activité amplifiée de façon proportionnelle à la quantité d'oocyste-FITC dans le milieu. Ainsi, près de 6 fois plus de granulocytes participent à la phagocytose des oocystes pour la plus forte concentration testée de 10:1 par rapport à la plus faible de 1:1 au bout de 4 h d'exposition. L'activité phagocytaire n'est pas seulement amplifiée de par la quantité de phagocytes mais aussi par la capacité individuelle des cellules à prendre en charge un plus grand nombre d'oocystes. Ces observations complètent une précédente étude de Graczyk et collaborateurs (1997b) qui ont mesuré la phagocytose des oocystes de *C. parvum* par les hémocytes de la palourde, *Corbicula fluminea*. Dans cette étude, après incubation avec un ratio oocyste:cellule de 5:1, la quantité de phagocytes et le nombre d'oocystes par cellule augmentent de façon temps-dépendant de 15 à 120 minutes d'incubation.

Puisque peu d'informations sont disponibles sur les effets des oocystes de protozoaires sur les hémocytes, il semble pertinent de compléter ces données par des analyses en microscopie

afin de comprendre et de définir les interactions et notamment celles impliquant les oocystes de *T. gondii*. De plus, il paraît essentiel de mesurer d'autres réponses biologiques comme les réponses humorales (quantité d'ERO, NO, enzymes lysosomales) présents dans le milieu pendant les expositions et qui agissent en véritable synergie avec les réponses cellulaires. Il semble également intéressant de travailler sur des populations homogènes de cellules afin de calibrer le ratio oocyste:hyalinocyte ou oocyste:granulocyte. Ainsi, le rôle des deux sous-populations hématocytaires des dreissènes face à un élément étranger pourra être affiné puisque peu de données sont disponibles actuellement, alors qu'une récente étude expose la possibilité de conversion des hyalinocytes en granulocytes au travers de phénomènes de granulation/dégranulation spontanée des cellules (De Freitas Rebelo et al. 2013). Pour renforcer les mesures réalisées en cytométrie et en vue de différencier les types d'hématocytes, il est nécessaire de combiner d'autres approches comme l'observation directe des hématocytes en microscopie à fluorescence afin de distinguer les sous populations hématocytaires de *D. polymorpha* mises en évidence par Giambérini et al. (1996) qui permettront également de visualiser les interactions entre les hématocytes de dreissènes et les oocystes de protozoaires. Alors que les études écotoxicologiques visent à décrire la qualité chimique du milieu au travers de l'analyse de l'état de santé des organismes autochtones ou allochtones, il semble important d'étudier également les effets des protozoaires sur la physiologie des organismes en conditions naturelles de multi-stress. En effet, si les oocystes de *C. parvum* ne semblent pas impacter la physiologie des dreissènes, les oocystes du toxoplasme entraînent un effet délétère sur l'immunité des mollusques en diminuant leurs capacités de défense. Fragilisées, les dreissènes contaminées par les oocystes pourraient ne pas être en capacité de contrer les autres stress (*i.e.* chimiques) efficacement.

La population hémodocytaire des dreissènes est constituée de deux sous populations. Les hyalinocytes pour près de 60 % d'entre eux et les granulocytes. Les réponses cellulaires (abondance et mortalité) de ces deux populations après des expositions ex vivo aux oocystes de T. gondii ont été mesurées en cytométrie en flux. Alors que la proportion hémodocytaire n'est pas impactée par la présence des oocystes, une nette augmentation de la mortalité des deux populations est soulignée dès 1 h d'exposition.

Dans le cas des expositions aux oocystes de C. parvum, aucune variation de mortalité n'est observée jusqu'à 4 h d'incubation. Cependant, l'activité de phagocytose est renforcée par la présence des oocystes par rapport aux billes de latex. De plus, cette activité fait augmenter la quantité de phagocytes et le nombre d'oocyste phagocytés par hémocyte de façon dose-dépendante.

Discussion générale

La recherche de pathogènes protozoaires dans le milieu aquatique est principalement basée sur les analyses de l'eau. Or, en plus des paramètres fluctuants propres à la matrice (*i.e.* débit, physico-chimie), différents paramètres environnementaux peuvent interférer avec les analyses de l'eau (*i.e.* turbidité, végétation) (Daniels et al. 2014). Les bivalves peuvent accumuler les protozoaires hydriques de par leur activité de filtration et représentent potentiellement un nouvel outil d'aide à la détection des protozoaires dans l'eau. Cependant, les efforts de détection des protozoaires chez les bivalves se focalisent principalement dans le milieu marin à cause du risque direct de transmission à la population par la consommation. De plus, très peu d'études s'intéressent aux effets d'une telle accumulation sur la physiologie des organismes. Le premier objectif de ce travail était de renforcer les données disponibles en milieu continental en évaluant les capacités d'un organisme d'eau douce, *Dreissena polymorpha*, à agir en tant que vecteur/accumulateur de parasites considérés comme enjeux de santé publique : *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* et *Giardia duodenalis*. En outre, les effets de ces protozoaires ont été analysés sur les cellules immunitaires des bivalves, les hémocytes.

Les expérimentations *in vivo* au laboratoire ont montré que les dreissènes étaient non seulement capables d'accumuler les trois protozoaires d'intérêt mais ce, de façon dose et temps dépendants. Cependant, comme il a été souligné dans les chapitres 1 et 2, les charges retrouvées au sein des tissus de dreissène restent faibles par rapport à celles inoculées au départ des expériences (entre 1 et 10 % de la charge détectée dans les tissus de dreissènes pour les expositions *in vivo* aux oocystes de *T. gondii* simples et simultanées). Les relations doses et temps dépendantes sont observées au sein d'une même expérimentation. Toutefois, si l'on compare les résultats inter-expérimentations (par exemple les doses de 20, 200, 560 oocystes par dreissène et par jour, testées pour les expositions au toxoplasme) l'augmentation de la charge d'exposition est linéaire mais pas proportionnelle à la charge retrouvée dans les tissus de dreissènes (pour rappel : 0,2 ($\pm$ 0,4) oocystes détectés pour une dose de départ de 20 oocystes par dreissène, 22,4 ($\pm$ 30,3) pour une dose de 200 et 31,2 ($\pm$ 29,1) pour la dose

de 560 à 7 jours d'exposition). Ce constat est très certainement dû à des variables biologiques qui diffèrent entre les expositions comme l'état physiologique des individus directement relié à leur capacité de filtration.

Même si la bioaccumulation des parasites hydriques par les mollusques est de plus en plus étudiée, il reste néanmoins difficile de comparer les résultats issus de la littérature puisqu'ils diffèrent en fonction du choix et de la préparation du matériel analytique (intégralité des tissus, organes) et des techniques employées pour la concentration, la purification et la détection (Robertson 2007). De façon générale, avec notre méthodologie, la détection de *C. parvum* et *G. duodenalis* est toujours très faible par rapport au toxoplasme. Ce constat est observé en conditions contrôlées de laboratoire pour des expositions (i) simultanées aux trois protozoaires et (ii) simples ce qui élimine un éventuel effet de compétition entre les parasites même si cette hypothèse reste à investiguer. Lors de l'expérimentation *in situ*, seul l'ADN du toxoplasme a été détecté dans les tissus de mollusques. Les dreissènes ont la capacité de filtrer et de sélectionner des particules de taille comprises entre 15 et 40 µm pour leur alimentation (Ten Winkel et Davids, 1982) ce qui pourrait limiter l'accumulation de petites particules, dont les oocystes de *C. parvum* (4-6 µm). De plus, en conditions *ex vivo*, les hémocytes de dreissènes sont capables de phagocyter les oocystes de *C. parvum* puisqu'au bout de 4 h d'expositions, près de 40 % des cellules hémocytaires participent à la phagocytose des oocystes ce qui peut également limiter leur accumulation dans les tissus et leur détection. En ce qui concerne *G. duodenalis*, la technique employée (digestion enzymatique, cycles congélation/décongélation, ultrasons) peut être trop drastique pour les kystes qui sont moins résistants que les oocystes (Olson et al. 1999). Afin d'évaluer l'effet de la méthodologie utilisée, il est nécessaire d'effectuer des expérimentations de dopage des tissus de dreissènes avec les oocystes de *C. parvum*/kystes de *G. duodenalis* comme cela a été fait avec les oocystes de *T. gondii*.

A la fin de plusieurs de nos expérimentations, la recherche de protozoaires dans l'eau des aquariums a été effectuée selon les recommandations de l'US EPA. Le but étant de comparer la pertinence des différentes matrices (eau, dreissène entière, organes) pour révéler la qualité

du milieu. Cependant, alors que l'ADN des protozoaires a toujours été détecté au sein des tissus même à de faibles charges, aucun signal n'est ressorti par la technique de qPCR sur les échantillons d'eau filtrée. De même, alors que des aquariums 'témoins positifs' chargés uniquement d'oocystes ont été mis en place, aucun signal en qPCR n'a pu être détecté après la filtration du contenu de ces aquariums. Lors d'une précédente étude d'exposition en laboratoire d'huîtres à différents protozoaires dont ceux du genre *Cryptosporidium* et *Giardia*, les analyses de l'eau des aquariums se sont révélées toutes négatives à partir de 24 h post-inoculation (pi) alors que la présence de protozoaires dans les tissus de mollusques a été détectée jusqu'à 33 jours pi (Graczyk et al. 2006). Ces observations révèlent la pertinence des mollusques comme outil complémentaire aux analyses de l'eau mais posent d'importants questionnements sur le comportement des parasites dans les aquariums et sur leur biodisponibilité pour les dreissènes pendant les expositions. Les oocystes de toxoplasme étant chargés négativement en eau douce (Shapiro et al. 2012), il est possible qu'il existe une interaction forte entre les protozoaires et les équipements d'expérimentation (aquarium en verre, bulleur, pompe à eau) dont le rinçage avant chaque filtration n'aurait pas permis la récupération des protozoaires (Izumi et al. 2004). La différence entre les charges inoculées et celles retrouvées dans les tissus peut également être due à la capacité des mollusques à dégrader les parasites. Cependant, la dégradation des oocystes par les dreissènes ne peut représenter l'unique raison qui explique la différence entre la charge détectée et la charge inoculée puisque la dégradation n'a été notée que les oocystes de *C. parvum* comme observé lors de l'étude des réponses cellulaires et immunologiques des hémocytes.

Une des limites de nos expérimentations reste néanmoins que la charge parasitaire dans les fèces et les pseudofèces des dreissènes n'a pas été prise en compte dans l'analyse. Hors, il est important d'évaluer la charge en parasites susceptible d'être rejetée directement ou indirectement par les phénomènes de sélection et d'élimination des mollusques bivalves puisque plusieurs études ont mis en évidence la présence de protozoaires dans les matières fécales (fèces et pseudofèces) après une exposition en laboratoire. Izumi et collaborateurs

(2004), supposent une accumulation rapide des oocystes de *C. parvum* par la palourde (*Corbicula japonica*) puisque 2 h après la contamination, aucun oocyste n'est détecté dans l'eau du milieu. Après 4 jours d'exposition, plus de 80 % des oocystes sont retrouvés dans les fèces avec un niveau maximum de rejet à 8 h pi. Une récente étude de Willis et collaborateurs (2014) a détaillé les rejets d'oocystes de *C. parvum* dans les tissus et les matières fécale de l'huître, *C. virginica*. Après 24 h d'exposition, plus de 40 % de la charge inoculée est retrouvée dans les tissus de mollusque et 34 % dans les fèces. Au bout de 7 jours d'exposition chronique, environ 26 % des oocystes sont retrouvés dans les tissus et de 29 à 38 % dans les fèces.

La dreissène apparaît comme un outil pertinent pour la mise en évidence de la charge en protozoaires dans l'eau et particulièrement en ce qui concerne le toxoplasme. La technique de détection a été testée et améliorée pour ce protozoaire en vue d'analyses de cytométrie ou de biologie moléculaire. De plus, les cinétiques de contaminations soulignent une accumulation rapide du toxoplasme dans les tissus (dès 24 h) et une dépuration longue (au moins 14 jours) ce qui constitue les prérequis nécessaires à une utilisation de la dreissène en biosurveillance des milieux. A l'heure actuelle il n'existe pas d'anticorps monoclonal dirigé contre les oocystes de *T. gondii*. La concentration du toxoplasme dans les tissus de dreissènes représente donc un nouvel outil pour la détection de ce protozoaire dans l'environnement aquatique.

Les études d'organotropisme ont permis de cibler des organes d'intérêts pour la recherche de protozoaires dans les tissus. Ainsi, le manteau et l'hémolymphe sont les organes capables d'intégrer la contamination à long terme. Le compartiment hémolympatique apparaît prometteur pour la détection des protozoaires puisqu'il ne nécessite pas de digestion enzymatique contrairement aux tissus, ce qui limite les temps de traitements des échantillons. De plus, la ponction de l'hémolymphe est une méthode non invasive pour les organismes. En outre, le prélèvement d'hémolymphe permet également de mesurer l'immunocompétence des organismes et de coupler ainsi plusieurs mesures biologiques (recherche d'ADN de protozoaires, réponses cellulaires et immunitaires des hémocytes).

Dans un contexte de gestion du risque sanitaire, si les dreissènes confirment leur intérêt comme outil de bioindication de la contamination biologique et si elles sont capables de dégrader ou d'inactiver les protozoaires, comme cela a été montré pour les oocystes de *C. parvum*, leur utilisation pour épurer les eaux peut être envisagée en vue d'une éventuelle remédiation des masses d'eaux (McLaughlan et Aldridge, 2013). L'utilisation de bivalves et de leur capacité d'épuration sont connus et déjà utilisés dans l'épuration des eaux chargées en matières particulaires (Klerks et al. 1996 ; Zaiko et Daunys, 2012), en matières azotées et phosphorées (Li et al. 2010) et, très récemment, en bactéries de type coliforme (Stabili et al. 2013 ; Bianchi et al. 2014). Cependant, d'autres études sont nécessaires pour renforcer ces données et notamment en conditions *in natura* afin de prendre en compte les effets du multi-stress et des changements globaux sur les dreissènes et sur les protozoaires (Marcogliese 2008, Utaaker et Robertson, 2014). L'exposition des organismes aux différents types de pollutions (chimiques, polluants émergents) mais également aux facteurs biotiques (abondance et variété de nourriture) et abiotiques (température, oxygène) peut avoir des conséquences directes sur l'accumulation des pathogènes en accentuant ou en inhibant leur capacité de filtration (Arini et al. 2011) et donc leur capacité à bioaccumuler les protozoaires et à épurer les eaux.

Enfin, la présence des protozoaires dans l'organisme semblent moduler les réponses biologiques des dreissènes. Alors que les oocystes de *C. parvum* sont pris en charge au travers de phénomènes de phagocytose par les hémocytes, les oocystes de *T. gondii* engendrent un effet délétère sur les cellules en conditions d'expositions *ex vivo*. Ces interactions soulèvent de nouvelles questions et de futures pistes d'études notamment sur la physiologie même des dreissènes (Fig. 26) : Quel est le coût énergétique de la défense des organismes face à une contamination aux protozoaires ? Existe-t-il un effet de saturation ? Comment les organismes combattent les protozoaires dans un contexte de multi-stress ? La diminution de l'immunocompétence des dreissènes engendre-t-elle une diminution de la résistance/tolérance aux autres formes de pollutions ?

Afin de répondre à ces hypothèses, et puisque peu ou pas (pour les protozoaires) de données sont disponibles, il est nécessaire de continuer à évaluer les interactions protozoaires-dreissènes sur des organismes ayant subis ou non un stress chimique préalable ou simultané en conditions *ex vivo*, *in vivo* et *in situ*. Ainsi le rôle des parasites protozoaires en tant que facteurs de confusion dans les études écotoxicologiques pourra être déterminé.

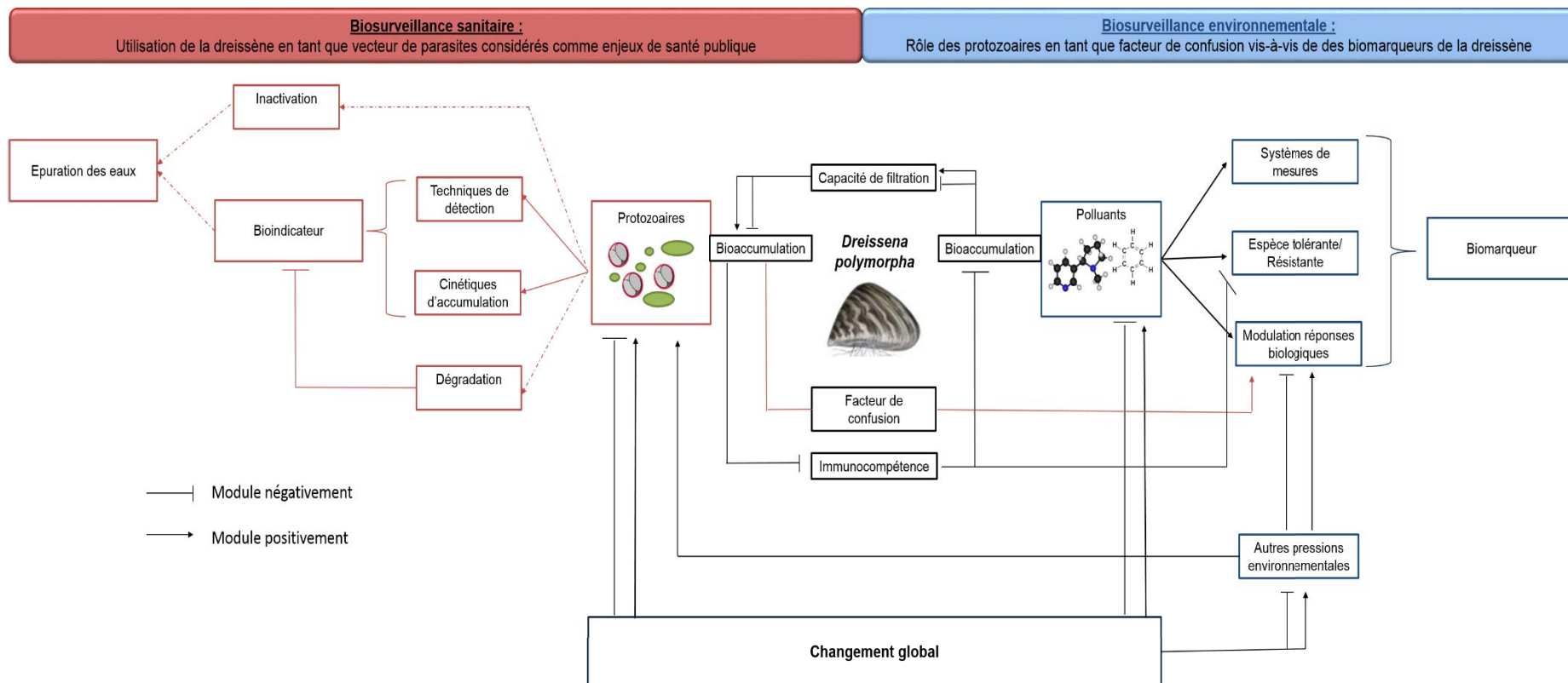


Figure 26 : Place de la dreissène au sein de la double stratégie de biosurveillance des milieux : une biosurveillance sanitaire liée à l'accumulation des protozoaires et à son possible rôle dans l'épuration des masses d'eaux et une biosurveillance environnementale liée à la compréhension des facteurs de confusion sur la réponse et l'interprétation des biomarqueurs en écotoxicologie. Les flèches rouges correspondent aux parties abordées dans la thèse et les flèches noires au contexte. Pour la partie des travaux de thèse, les flèches pleines représentent les données en cours d'acquisition et les flèches en pointillées correspondent aux interrogations présentées en perspectives.

Conclusions et perspectives

Tout au long du travail de thèse, des améliorations méthodologiques ont été apportées à la détection des protozoaires dans les matrices complexes. Toutefois, certains verrous restent encore à lever. En ce qui concerne *T. gondii*, la résistance des oocystes en condition simple a été testée et une méthode a été proposée pour améliorer l'accès à l'ADN en vue de mesures par biologie moléculaire. Cependant, cette méthode doit être testée sur des échantillons issus d'exposition *in vivo* car les tissus de dreissène pourraient empêcher l'action des substances chimiques (NaClO, détergeant) et diminuer le rendement de détection. Pour *C. parvum* et *G. duodenalis*, l'effet de la technique développée sur leur détection en qPCR reste à déterminer au travers des expérimentations de dopage. Dans le cas d'un effet délétère de la méthodologie développée pour *T. gondii* sur les oocystes de *C. parvum* et les kystes de *G. duodenalis*, il sera nécessaire d'adapter les protocoles afin de rechercher séparément *T. gondii* d'une part et *C. parvum* et *G. duodenalis* d'autre part dans les échantillons contaminés.

Une observation importante qui découle de ce travail est le faible rendement de protozoaires retrouvés dans les tissus de dreissène après des expositions au laboratoire à de fortes doses de protozoaires. Ceci peut être lié à la méthodologie mais également à la physiologie même des organismes. Aussi, ces résultats auraient pu être affinés avec la prise en compte de 1) la sélection des particules par les mollusques avant ingestion (Pales-Espinosa et al. 2008) et de 2) l'activité de filtration des individus pendant les expositions. De plus, les mesures pourront être normalisées avec la prise en compte du poids moyen des tissus considérés (organes, intégralité des tissus).

La dégradation des protozoaires par les mollusques bivalves a été mise en évidence par plusieurs auteurs. Ainsi, après 4 jours d'exposition dans les tissus d'huîtres, *Ostrea edulis*, et de palourde, *Tapes decussatus*, la viabilité de *C. parvum* chute considérablement, entre 70 et 80 %, indépendamment de l'espèce étudiée probablement en raison de l'effet des enzymes digestives et du faible pH dans le tractus digestif (Freire-Santos et al. 2002 ; Gómez-Couso et al. 2003). La dégradation difficile de *T. gondii* par les mollusques est due à sa taille et à la résistance des parois de l'oocyste/sporocyste. Ainsi, la transmission d'oocystes viables a été

révélée après inoculation à la souris de tissus de mollusques contaminés aux oocystes de toxoplasme après 21 jours pi (Arkush et al. 2003) et jusqu'à 85 jours pi (Lindsay et al. 2004). La présence des protozoaires dans l'environnement est un problème de santé publique si leur pouvoir infectant est avéré. Dans un contexte de biosurveillance sanitaire, il semble primordial d'évaluer non seulement la viabilité mais également l'infectiosité des parasites retrouvés dans les tissus ou après le passage dans les organismes mollusques.

Très utilisées dans les études écotoxicologiques, les réponses hématocytaires servent à évaluer l'état immunitaire des individus et à décrire l'état du milieu dans les études *in situ* (Cajaraville et al. 1996 ; Auffret et al. 2004 ; Martins et al. 2005 ; Farcy et al. 2013 ; Koutsogiannaki et al. 2014). Il semblerait que la présence d'oocyste affecte les réponses hématocytaires en diminuant la viabilité en présence de *T. gondii*. De plus, les hémocytes sont capables de phagocyter les oocystes de *C. parvum*. Dans un premier temps, puisque peu de données sont disponibles sur les interactions directes hémocytes-oocystes, des études complémentaires sont nécessaires afin de préciser les effets des parasites sur l'immunocompétence des dreissènes à travers les hémocytes. Des approches combinées de microscopie et de cytométrie en flux permettront de détailler les effets directs issus de l'interaction des oocystes avec les cellules. En complément, des observations histologiques sur les organes qui apparaissent comme de bons accumulateurs, permettraient d'évaluer l'interaction des oocystes/kystes avec les tissus après des expérimentations *in vivo* ou *in situ*.

Dans un deuxième temps, il semble primordial de considérer la contamination biologique par les oocystes de protozoaires en tant que possible facteur de confusion dans les études écotoxicologiques (Forbes et al. 2006 ; Minguez et al. 2009). Alors que les dreissènes sont considérées comme sentinelles de la contamination chimique des cours d'eau, les effets des formes environnementales de parasites sur la physiologie des dreissènes sont très peu étudiés. Or, les effets du stress biologique sur les réponses de type biomarqueurs sont importants à définir. En effet, au cours des premiers travaux de thèse, une expérimentation *in vivo* a été réalisée au laboratoire où différentes réponses biologiques ont été mesurées au

niveau cellulaire (taille et viabilité des hémocytes), immunologique (capacité de phagocytose), génotoxique (mesure des dommages à l'ADN des hémocytes) et du stress oxydant (niveau d'expression des gènes de la Catalase, de la Superoxyde dismutase, de la Glutathion peroxydase et de la Glutathion S-Transférase) après une exposition de 7 jours aux trois protozoaires (20 et 200 oocystes/kystes par jour et par dreissène) suivies de 10 jours de dépuración. Puisque les résultats restent préliminaires, il a été choisi de ne pas les présenter au sein de ce manuscrit. Cependant, une tendance à l'augmentation des réponses des hémocytes (taille, capacité de phagocytose et dommages à l'ADN) indique un stress plus important chez les individus soumis à la contamination biologique par rapport aux témoins quel que soit le parasite considéré. De plus, les effets restent notables à la fin de la dépuración par rapport aux organismes témoins. Ces résultats nécessitent d'être renforcés au laboratoire. De plus, en vue d'évaluer les effets d'un multi-stress sur les réponses, une contamination chimique peut être reproduite au laboratoire sur des dreissènes ayant été au préalable contaminées par les protozoaires. Ainsi, des expositions concomitantes ou simples aux deux types de stress permettront de comparer les facultés des organismes à contrer une contamination chimique s'ils sont préalablement infectés et inversement, de combattre les protozoaires en situation de stress chimique (Sures 2006, 2008). Le besoin de répondre à ces interrogations est primordial puisque l'ADN du toxoplasme dans les tissus de dreissènes a été détecté après un mois d'encagement sur le terrain et que la dépuración au laboratoire indique que l'ADN du toxoplasme persiste jusqu'à 14 jours dans les tissus.

Communications personnelles

Orales

- Palos Ladeiro M.**, Kerambrun E., Bigot A., Villena I., Aubert D., Geffard A. (2014) Bioaccumulation de *Toxoplasma gondii* par la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*) : application pour la surveillance des milieux aquatiques. Société Française de Parasitologie Reims, France.
- Palos Ladeiro M.**, Bigot A., Villena I., Aubert D., Geffard A. (2013) Genotoxic effects caused by food deprivation and protozoa exposure on *Dreissena polymorpha* hemocytes. 10th ICAW (International Comet Assay Workshop) Porto, Portugal.
- Palos Ladeiro M.**, Bigot A., Betoulle S., Villena I., Aubert D., Geffard A. (2013) *Toxoplasma gondii* bioaccumulation by zebra mussel, *Dreissena polymorpha*: protozoa impact on nonspecific host. ISFSI (First International Conference on Fish and Shellfish Immunology) Vigo, Espagne.
- Palos Ladeiro M.**, Bigot A., Bonnard M., Betoulle S., Beaudon A., Villena I., Aubert D., Geffard A. (2012) Bioaccumulation des parasites *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* et *Giardia duodenalis* chez la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*. ECOBIM Reims, France.

Affichées

- Palos Ladeiro M.**, Hani Y., La Carbona S., Dupuis E., Bigot A., Villena I., Aubert D. (2014) Detection of waterborne pathogens in commercial shellfish, the oysters *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* and the mussel *Mytilus edulis*. International Congress of Food Microbiology, Nantes, France.
- Hani Y., **Palos Ladeiro M.**, La Carbona S., Dupuis E., Bigot-Clivot A., Villena I., Aubert D. (2014) Optimisation d'une méthode pour la détection de protozoaires chez des invertébrés aquatiques du littoral. Société Française de Parasitologie Reims, France.
- Palos Ladeiro M.**, Bigot A., Villena I., Aubert D., Geffard A. (2013) Bioaccumulation of three protozoa *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* and *Toxoplasma gondii* by zebra mussel *Dreissena polymorpha*. SETAC World Congress Glasgow, Ecosse.
- Palos Ladeiro M.**, Bigot A., Geffard A., Villena I., Aubert D. (2013) Bioaccumulation des parasites *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* et *Giardia duodenalis* par la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*. Société Française de Parasitologie Dijon, France.
- Bigot A., **Palos-Ladeiro M.**, Villena I., Aubert D., Favennec L., Gargala G., Bonnard M., Dedourge-Geffard O., Betoulle S., Geffard A. (2013) Interactions Parasites-Dreissènes : implication en biosurveillance (IPAD) EC2CO, INSU 2010-2013. 3^{ème} prospective nationale de recherche 2013/2017 Surfaces et Interfaces Continentales, Paris, France.
- Palos Ladeiro M.**, Geffard A., Bonnard M., Betoulle S., Villena I., Aubert D., Bigot A. (2012) Bioaccumulation et localisation du protozoaire *Toxoplasma gondii* chez la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*. ImmunInv (Immunité des Invertébrés) Perpignan, France.

Articles

- Palos Ladeiro M.**, La Carbona S., Dumètre A., Bigot-Clivot A., Betoulle S., Hohweyer J., Cazeaux C., Dubey JP., Villena I., Geffard A., Aubert D. Evaluation of lysis procedures on *Toxoplasma gondii* oocysts: approach by flow cytometry and qPCR method. *Soumise dans Applied and Environmental Microbiology*
- Palos Ladeiro M.**, Bigot-Clivot A., Aubert D., Villena I., Geffard A. Assessment of *Toxoplasma gondii* levels in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) by real time PCR: an organotropism study. *Soumise dans Environmental Science and Pollution Research*
- Palos Ladeiro M.**, Aubert D., Villena I., Geffard A., Bigot A. (2014) Bioaccumulation of human waterborne protozoa by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): Interest for water biomonitoring. *Water Research* 48, 148-155.
- Palos Ladeiro M.**, Bigot A., Aubert D., Hohweyer J., Favennec L., Villena I., Geffard A. (2013) Protozoa interaction with aquatic invertebrate: interest for watercourses biomonitoring. *Environmental Science and Pollution Research* 20 (2):778-789.

Bibliographie

- Abbott Chalew T, Galloway J, Graczyk TK. 2012. Pilot study on effects of nanoparticle exposure on *Crassostrea virginica* hemocyte phagocytosis. *Mar. Pollut. Bull.* 64: 2251–2253.
- Agulló-Barceló M, Oliva F, Lucena F. 2013. Alternative indicators for monitoring *Cryptosporidium* oocysts in reclaimed water. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20: 4448–4454.
- Ajzenberg D, Bañuls A, Su C, Dumètre A, Demar M, Carme B, et al. 2004. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 34: 1185–1196.
- Aksoy U, Marangi M, Papini R, Ozkoc S, Bayram Delibas S, Giangaspero A. 2014. Detection of *Toxoplasma gondii* and *Cyclospora cayetanensis* in *Mytilus galloprovincialis* from Izmir Province coast (Turkey) by Real Time PCR/High-Resolution Melting analysis (HRM). *Food Microbiol.* *In press*.
- Allam B, Paillard C. 1998. Defense factors in clam extrapallial fluids. *Dis. Aquat. Organ.* 33: 123–128.
- Allam B, Ashton-Alcox K, Ford S. 2001. Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams. *Dev. Comp. Immunol.* 25: 365–375.
- Allam B, Ashton-Alcox K, Ford S. 2002. Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* 13: 141–158.
- Anderson R, Paynter K, Bureson E. 1992. Increased reactive oxygen intermediate production by hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *Biol. Bull.* 183: 476–481.
- Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd S. 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 413–422.
- Arini A, Baudrimont M, Feurtet-Mazel A, Coynel A, Blanc G, Coste M, et al. 2011. Comparison of periphytic biofilm and filter-feeding bivalve metal bioaccumulation (Cd and Zn) to monitor hydrosystem restoration after industrial remediation: a year of biomonitoring. *J. Environ. Monit.* 13: 3386–3398.
- Arkush K, Miller M, Leutenegger C, Gardner I, Packham A, Heckeroth A, et al. 2003. Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int. J. Parasitol.* 33: 1087–1097.
- Ashton-Alcox K, Ford S. 1998. Variability in molluscan hemocytes: a flow cytometric study. *Tissue Cell* 30: 195–204.

- Aubert D, Villena I. 2009. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne Region, France. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104: 290–295.
- Auffret M, Oubella R. 1997. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: *in vitro* measurement and experimental modulation by xenobiotics. Comp. Biochem. Physiol. 118: 705–712.
- Auffret M, Duchemin M, Rousseau S, Boutet I, Tanguy A, Moraga D, et al. 2004. Monitoring of immunotoxic responses in oysters reared in areas contaminated by the “Erika” oil spill. Aquat. Living Resour. 17: 297–302.
- Austin Z, Alcock R, Christley R, Haygarth P, Heathwaite A, Latham S, et al. 2012. Policy, practice and decision making for zoonotic disease management: water and *Cryptosporidium*. Environ. Int. 40: 70–78.
- Bachère E, Mialhe E, Noel D, Boulo V, Morvan A, Rodriguez J. 1995. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. Aquac. 132: 17–32.
- Baldursson S, Karanis P. 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. Water Res. 45: 6603–6614.
- Beaven A, Paynter K. 1999. Acidification of the phagosome in *Crassostrea virginica* hemocytes following engulfment of zymosan. Biol. Bull. 196: 26–33.
- Belli S, Smith N, Ferguson D. 2006. The coccidian oocyst: a tough nut to crack! Trends Parasitol. 22: 416–423.
- Bervoets L, Voets J, Chu S, Covaci A, Schepens P, Blust R. 2004. Comparison of accumulation of micropollutants between indigenous and transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). Environ. Toxicol. Chem. 23: 1973–1983.
- Bervoets L, Voets J, Covaci A, Chu S, Qadah D, Smolders R, et al. 2005. Use of transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) to assess the bioavailability of microcontaminants in flemish. Environ. Sci. Technol. 39: 1492–1505.
- Betancourt W, Rose J. 2004. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. Vet. Parasitol. 126: 219–234.
- Beutler B. 2004. Innate immunity: an overview. Mol. Immunol. 40: 845–859.
- Bianchi V, Castro J, Rocchetta I, Bieczynski F, Luquet C. 2014. Health status and bioremediation capacity of wild freshwater mussels (*Diplodon chilensis*) exposed to sewage water pollution in a glacial Patagonian lake. Fish Shellfish Immunol. 37: 268–277.
- Binelli A, Riva C, Cogni D, Provini A. 2008. Assessment of the genotoxic potential of benzo(a)pyrene and pp'-dichlorodiphenyldichloroethylene in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Mutat. Res. 649: 135–145.
- Blaise C, Trottier S, Gagné F, Lallement C, Hansen P. 2002. Immunocompetence of bivalve hemocytes as evaluated by a miniaturized phagocytosis assay. Environ. Toxicol. 17: 160–169.

- Boening D. 1999. An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters. *Environ. Monit. Assess.* 55: 459–470.
- Bolognesi C, Buschini A, Branchi E, Carboni P, Furlini M, Martino A, et al. 2004. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Sci. Total Environ.* 333: 127–136.
- Botes M, de Kwaadsteniet M, Cloete T. 2013. Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. *Anal. Bioanal. Chem.* 405: 91–108.
- Bourgeault A, Gourlay-Francé C, Vincent-Hubert F, Palais F, Geffard A, Biagianti-Risbourg S, et al. 2010. Lessons from a transplantation of zebra mussels into a small urban river : an integrated ecotoxicological assessment. *Environ. Toxicol.* 25: 468–478.
- Bowie W, King A, Werker D, Isaac-Renton J, Bell A, Eng S, et al. 1997. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet* 350: 173–177.
- Briancesco R, Bonadonna L. 2005. An italian study on *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater, fresh water and treated water. *Environ. Monit. Assess.* 104: 445–457.
- Bridle H. 2013. Overview of waterborne pathogens. In *Waterborne pathogens - Detection methods and applications*, pp. 9–38, Academic Press, London, UK.
- Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, Cyr D, Blakley B, Boermans H, et al. 2000. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following *in vitro* exposure to heavy metals. *Toxicol.* 142: 145–156.
- Bukhari Z, Smith H. 1995. Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine feces. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2592–2595.
- Burnet JB, Penny C, Ogorzaly L, Cauchie HM. 2014. Spatial and temporal distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* in a drinking water resource: implications for monitoring and risk assessment. *Sci. Total Environ.* 472: 1023–1035.
- Buschini A, Carboni P, Martino A, Poli P, Rossi C. 2003. Effects of temperature on baseline and genotoxin-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. *Mutat. Res.* 537: 81–92.
- Cacciò S, de Giacomo M, Aulicino F, Pozio E. 2003. *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3393–3398.
- Cajaraville M, Olabarrieta I, Marigomez I. 1996. *In vitro* activities in mussel hemocytes as biomarkers of environmental quality: a case study in the Abra Estuary (Biscay Bay). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35: 253–260.
- Camusso M, Balestrini R, Binelli A. 2001. Use of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) to assess trace metal contamination in the largest Italian subalpine lakes. *Chemosphere* 44: 263–270.
- Canesi L, Gallo G, Gavioli M, Pruzzo C. 2002. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc. Res. Tech.* 57: 469–476.

- Carballal M, Villalba A, Lopez C. 1998. Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development, and parasitism on the hemogram of *Mytilus galloprovincialis*. J. Invertebr. Pathol. 72: 304–312.
- Carey C, Lee H, Trevors J. 2004. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. Water Res. 38: 818–862.
- Carme B, Demar M, Ajzenberg D, Dardé M. 2009. Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. Emerg. Infect. Dis. 15: 656–658.
- Castellanos-Martínez S, Prado-Alvarez M, Lobo-da-Cunha A, Azevedo C, Gestal C. 2014. Morphologic, cytometric and functional characterization of the common octopus (*Octopus vulgaris*) hemocytes. Dev. Comp. Immunol. 44: 50–58.
- Castro-Hermida J, García-Presedo I, Almeida A, González-Warleta M, Correia da Costa J, Mezo M. 2008. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. Water Res. 42: 3528–3538.
- Chalmers R, Sturdee A, Mellors P, Nicholson V, Lawlor F, Kenny F, et al. 1997. *Cryptosporidium parvum* in environmental samples in the Sligo area, Republic of Ireland: a preliminary report. Lett. Appl. Microbiol. 25: 380–384.
- Cheng H, Lucy F, Graczyk TK, Broaders M, Tamang L, Connolly M. 2009. Fate of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts and *Giardia duodenalis* cysts during secondary wastewater treatments. Parasitol. Res. 105: 689–696.
- Cheng TC. 1981. Bivalves. In *Invertebrate blood cells 1*, pp. 233–300, Academic Press, London, UK.
- Chesnot T, Marly X, Chevalier S, Estévenon O, Buès M, Schwartzbrod J. 2002. Optimised immunofluorescence procedure for enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocyst suspensions. Water Res. 36: 3283–3288.
- Clancy J, Gollnitz W, Tabib Z. 1994. Commercial labs: how accurate are they? Am. Water Work. Assoc. 86: 89–97.
- Cochennec-Laureau N, Auffret M, Renault T, Langlade A. 2003. Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. J. Invertebr. Pathol. 83: 23–30.
- Cole R, Lindsay D, Howe D, Roderick C, Dubey J, Thomas N, et al. 2000. Biological and molecular characterizations of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). J. Parasitol. 86: 526–530.
- Collier S, Stockman L, Hicks L, Garrison L, Zhou F, Beach M. 2012. Direct healthcare costs of selected diseases primarily or partially transmitted by water. Epidemiol. Infection 140: 2003–2013.
- Conrad P, Miller M, Kreuder C, James E, Mazet J, Dabritz H, et al. 2005. Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. Int. J. Parasitol. 35: 1155–1168.

- Costa R, Aldridge D, Moggridge G. 2008. Seasonal variation of zebra mussel susceptibility to molluscicidal agents. *J. Appl. Ecol.* 45: 1712–1721.
- Cranford P. 2001. Evaluating the “reliability” of filtration rate measurements in bivalves. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 215: 303–305.
- Dang C, Lambert C, Soudant P, Delamare-Deboutteville J, Zhang M, Chan J, et al. 2011. Immune parameters of QX-resistant and wild caught *Saccostrea glomerata* hemocytes in relation to *Marteilia sydneyi* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 31: 1034–1040.
- Daniels M, Hogan J, Smith W, Oates S, Miller M, Hardin D, et al. 2014. Estimating environmental conditions affecting protozoal pathogen removal in surface water wetland systems using a multi-scale, model-based approach. *Sci. Total Environ.* 493: 1036–1046.
- Dauguschies A, Bangoura B, Lendner M. 2013. Inactivation of exogenous endoparasite stages by chemical disinfectants: current state and perspectives. *Parasitol. Res.* 112: 917–932.
- De Freitas Rebelo M, de Souza Figueiredo E, Mariante R, Nóbrega A, Monteiro de Barros C, Allodi S. 2013. New insights from the oyster *Crassostrea rhizophorae* on bivalve circulating hemocytes. *PLoS One* 8: e57384.
- De Lafontaine Y, Gagné F, Blaise C, Costan G, Gagnon P, Chan H. 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquat. Toxicol.* 50: 51–71.
- Delgado P, Perea N, Delgado J, Garcia C, Malheiros A, Davila C. 2013. Detection of infection with *Toxoplasma gondii* in manatees (*Trichechus inunguis*) of the peruvian amazon. *Acta Biol. Colomb.* 18: 211–216.
- Donaghy L, Lambert C, Choi K, Soudant P. 2009. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects. *Aquac.* 297: 10–24.
- Downey A, Graczyk TK. 2007. Maximizing recovery and detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts from spiked eastern oyster (*Crassostrea virginica*) tissue samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6910–6915.
- Dubey J. 2004. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol.* 126: 57–72.
- Duchemin M, Auffret M, Wessel N, Fortier M, Morin Y, Pellerin J, et al. 2008. Multiple experimental approaches of immunotoxic effects of mercury chloride in the blue mussel, *Mytilus edulis*, through *in vivo*, *in tubo* and *in vitro* exposures. *Environ. Pollut.* 153: 416–423.
- Dumètre A, Dardé M. 2003. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 651–661.
- Dumètre A, Dardé M. 2005. Immunomagnetic separation of *Toxoplasma gondii* oocysts using a monoclonal antibody directed against the oocyst wall. *J. Microbiol. Methods* 61: 209–217.

- Dumètre A, Dardé M. 2007. Detection of *Toxoplasma gondii* in water by an immunomagnetic separation method targeting the sporocysts. *Parasitol. Res.* 101: 989–996.
- Dumètre A, Dubey J, Ferguson D, Bongrand P, Azas N, Puech P. 2013. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. *PNAS* 110: 11535–11540.
- ECDC. 2013. Annual epidemiological report reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. 1–260.
- Ellis R, Parry H, Spicer J, Hutchinson T, Pipe R, Widdicombe S. 2011. Immunological function in marine invertebrates: responses to environmental perturbation. *Fish Shellfish Immunol.* 30: 1209–1222.
- Esmerini P, Gennari S, Pena H. 2010. Analysis of marine bivalve shellfish from the fish market in Santos city, São Paulo state, Brazil, for *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.* 170: 8–13.
- Esteves F, Aguiar D, Rosado J, Costa M, de Sousa B, Antunes F, et al. 2014. *Toxoplasma gondii* prevalence in cats from Lisbon and in pigs from centre and south of Portugal. *Vet. Parasitol.* 200: 8–12.
- Farcy E, Burgeot T, Haberkorn H, Auffret M, Lagadic L, Allenou JP, et al. 2013. An integrated environmental approach to investigate biomarker fluctuations in the blue mussel *Mytilus edulis* L. in the Vilaine estuary, France. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20: 630–650.
- Faria M, Carrasco L, Diez S, Carmen M, Maria J, Barata C. 2009. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 149: 281–288.
- Fayer R, Morgan U, Upton S. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* 30: 1305–1322.
- Fayer R. 2012. General biology. In *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis - second edition*, pp. 1–35, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Ferguson D. 2009. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104: 133–148.
- Flegr J, Prandota J, Sovičková M, Israili ZH. 2014. Toxoplasmosis - a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS One* 9: e90203.
- Fontaine M, Guillot E. 2002. Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 214: 13–17.
- Forbes VE, Palmqvist A, Bach L. 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 25: 272–80.
- Fournier M, Pellerin J, Clermont Y, Morin Y, Brousseau P. 2001. Effects of *in vivo* exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicol.* 161: 201–211.

- Freire-Santos F, Oteiza-López A, Vergara-Castiblanco C, Araz-Mazás E, Alvarez-Suarez E, García-Martin O. 2000. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve molluscs destined for human consumption. J. Parasitol. 86: 853–854.
- Freire-Santos F, Oteiza-López A, Castro-Hermida J, García-Martín O, Ares-Mazás M. 2001. Viability and infectivity of oocysts recovered from clams, *Ruditapes philippinarum*, experimentally contaminated with *Cryptosporidium parvum*. Parasitol. Res. 87: 428–430.
- Freire-Santos F, Gómez-Couso H, Ortega-Iñarrea M, Castro-Hermida J, Oteiza-López A, García-Martín O, et al. 2002. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from experimentally contaminated oysters (*Ostrea edulis*) and clams (*Tapes decussatus*). Parasitol. Res. 88: 130–133.
- Gale P. 2001. Developments in microbiological risk assessment for drinking water. J. Appl. Microbiol. 91: 191–205.
- Gallas-Lindemann C, Sotiriadou I, Plutzer J, Karanis P. 2013. Prevalence and distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater and the surface, drinking and ground waters in the Lower Rhine, Germany. Epidemiol. Infect. 141: 9–21.
- García-García E, Prado-Alvarez M, Novoa B, Figueras A, Rosales C. 2008. Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families. Dev. Comp. Immunol. 32: 637–653.
- Gardner T, Hill D. 2001. Treatment of giardiasis. Clin. Microbiol. Rev. 14: 114–128.
- Giambérini L, Auffret M, Pihan J. 1996. Haemocytes of the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha* Pallas: Cytology, Cytochemistry and X-Ray Microanalysis. J. Molluscan Stud. 62: 367–379.
- Giambérini L, Cajaraville MP. 2005. Lysosomal responses in the digestive gland of the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*, experimentally exposed to cadmium. Environ. Res. 98: 210–214.
- Giangaspero A, Papini R, Marangi M, Koehler A, Gasser R. 2014. *Cryptosporidium parvum* genotype IIa and *Giardia duodenalis* assemblage A in *Mytilus galloprovincialis* on sale at local food markets. Int. J. Food Microbiol. 171: 62–67.
- Girones R, Ferrús M, Alonso J, Rodríguez-Manzano J, Calgua B, de Abreu Corrêa A, et al. 2010. Molecular detection of pathogens in water-the pros and cons of molecular techniques. Water Res. 44: 4325–4339.
- Goedken M, de Guise S. 2004. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. Fish Shellfish Immunol. 16: 539–552.
- Gómez-Couso H, Freire-Santos F, Ortega-Iñarrea M, Castro-Hermida J, Ares-Mazás M. 2003. Environmental dispersal of *Cryptosporidium parvum* oocysts and cross transmission in cultured bivalve molluscs. Parasitol. Res. 90: 140–142.
- Gómez-Couso H, Méndez-Hermida F, Castro-Hermida J, Ares-Mazás E. 2005. *Giardia* in shellfish-farming areas: detection in mussels, river water and waste waters. Vet. Parasitol. 133: 13–18.

- Gonzales-Viera O, Marigo J, Ruoppolo V, Rosas F, Kanamura C, Takakura C, et al. 2013. Toxoplasmosis in a Guiana dolphin (*Sotalia guianensis*) from Paraná, Brazil. *Vet. Parasitol.* 191: 358–362.
- Gourdon I, Guérin M, Torreilles J, Roch P. 2001. Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 5: 1–6.
- Goyette S, Cao Z, Libman M, Ndao M, Ward B. 2014. Seroprevalence of parasitic zoonoses and their relationship with social factors among the Canadian Inuit in Arctic regions. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 78: 404–410.
- Graczyk TK, Fayer R, Lewis E, Farley C, Trout J. 1997a. *In vitro* interactions between hemocytes of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin, 1791 and *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J. Parasitol.* 83: 949–952.
- Graczyk TK, Fayer R, Cranfield M, Conn D. 1997b. *In vitro* interactions of asian freshwater clam (*Corbicula fluminea*) hemocytes and *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2910–2912.
- Graczyk TK, Fayer R, Lewis E, Trout J, Farley C. 1999. *Cryptosporidium* oocysts in Bent mussels (*Ischadium recurvum*) in the Chesapeake Bay. *Parasitol. Res.* 85: 518–521.
- Graczyk TK, Marcogliese D, de Lafontaine Y, da Silva A, Mhangami-Ruwende B, Pieniazek N. 2001. *Cryptosporidium parvum* oocysts in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): evidence from the St Lawrence River. *Parasitol. Res.* 87: 231–234.
- Graczyk TK, Conn D, Marcogliese D, Graczyk H, de Lafontaine Y. 2003. Accumulation of human waterborne parasites by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*). *Parasitol. Res.* 89: 107–112.
- Graczyk TK, Conn D, Lucy F, Minchin D, Tamang L, Moura L, et al. 2004. Human waterborne parasites in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from the Shannon River drainage area, Ireland. *Parasitol. Res.* 93: 385–391.
- Graczyk TK, Girouard A, Tamang L, Nappier S, Schwab K. 2006. Recovery, bioaccumulation, and inactivation of human waterborne pathogens by the Chesapeake Bay nonnative oyster, *Crassostrea ariakensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3390–3395.
- Graczyk TK, Lucy FE, Tamang L, Minchin D, Miraflor A. 2008. Assessment of human waterborne parasites in Irish river basin districts – use of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as bioindicators. *Aquatic Invasions* 3: 271–279
- Graczyk TK, Conn D. 2008. Molecular markers and sentinel organisms for environmental monitoring. *Parasite* 15: 458–462.
- Graczyk Z, Chomicz L, Kozłowska M, Kazimierczuk Z, Graczyk TK. 2011. Novel and promising compounds to treat *Cryptosporidium parvum* infections. *Parasitol. Res.* 109: 591–594.
- Guerlet E, Ledy K, Meyer A, Giambérini L. 2007. Towards a validation of a cellular biomarker suite in native and transplanted zebra mussels: A 2-year integrative field study of seasonal and pollution-induced variations. *Aquat. Toxicol.* 81: 377–388.

- Guy R, Payment P, Krull U, Paul A, Horgen P. 2003. Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. Appl. Environ. Microbiol. 69: 5178–5185.
- Hégaret H, Wikfors G, Soudant P. 2003a. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: I. Haemocyte types and morphology. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 293: 237–248.
- Hégaret H, Wikfors G, Soudant P. 2003b. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation. II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 293: 249–265.
- Hégaret H, Wikfors G. 2005. Time-dependent changes in hemocytes of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, and northern bay scallops, *Argopecten irradians irradians*, exposed to a cultured strain of *Prorocentrum minimum*. Harmful Algae 4: 187–199.
- Higgins J, Trout J, Fayer R, Shelton D, Jenkins M. 2003. Recovery and detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts from water samples using continuous flow centrifugation. Water Res. 37: 3551–3560.
- Hine P. 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. Fish Shellfish Immunol. 9: 367–385.
- Hohweyer J, Dumètre A, Aubert D, Azas N, Villena I. 2013. Tools and methods for detecting and characterizing *Giardia*, *Cryptosporidium* and *Toxoplasma* parasites in marine mollusks. J. Food Prot. 76: 1649–1657.
- Isaac-Renton J, Bowie W, King A, Irwin G, Ong C, Fung C, et al. 1998. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2278–2280.
- Izumi T, Itoh Y, Yagita K, Endo T, Ohyama T. 2004. Brackish water benthic shellfish (*Corbicula japonica*) as a biological indicator for *Cryptosporidium parvum* oocysts in river water. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 72: 29–37.
- Jones J, Dargelas V, Roberts J, Press C, Remington J, Montoya J. 2009. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. Clin. Infect. Dis. 49: 878–884.
- Jones J, Dubey J. 2010. Waterborne toxoplasmosis-recent developments. Exp. Parasitol. 72: 10–25.
- Jones J, Parise M, Fiore A. 2014. Neglected Parasitic Infections in the United States: Toxoplasmosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 90: 794–799.
- Karanis P, Aldeyarbi H, Mirhashemi M, Khalil K. 2013. The impact of the waterborne transmission of *Toxoplasma gondii* and analysis efforts for water detection: an overview and update. Environ. Sci. Pollut. Res. 20: 86–99.
- Karatayev A, Burlakova L, Molloy D, Volkova L, Volosyuk V. 2002. Field and laboratory studies of *Ophryoglena* sp. (Ciliata: Ophryoglenidae) infection in zebra mussels, *Dreissena polymorpha* (Bivalvia: Dreissenidae). J. Invertebr. Pathol. 79: 80–85.

- Kim Y, Park K, Choi K, Alvarez R, Cummings R, Cho M. 2006. Lectin from the manila clam *Ruditapes philippinarum* is induced upon infection with the protozoan parasite *Perkinsus olseni*. J. Biol. Chem. 281: 26854–26864.
- Kitajima M, Haramoto E, Iker B, Gerba C. 2014. Occurrence of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Cyclospora* in influent and effluent water at wastewater treatment plants in Arizona. Sci. Total Environ. 484: 129–136.
- Klerks P, Fraleigh P, Lawniczak J. 1996. Effects of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) on seston levels and sediment deposition in western Lake Erie. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 2291: 2284–2291.
- Klobučar G, Pavlica M, Erben R, Papeš D. 2003. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. Aquat. Toxicol. 64: 15–23.
- Koutsogiannaki S, Kaloyianni M. 2010. Signaling molecules involved in immune responses in mussels. Invertebr. Surviv. J. 7: 11–21.
- Koutsogiannaki S, Franzellitti S, Fabbri E, Kaloyianni M. 2014. Oxidative stress parameters induced by exposure to either cadmium or 17 β -estradiol on *Mytilus galloprovincialis* hemocytes. The role of signaling molecules. Aquat. Toxicol. 146: 186–195.
- Kraak M, Ainscough C, Fernandez A, van Vlaardinger P, de Voogt P, Admiraal W. 1997. Short-term and chronic exposure of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) to acrinide: effects and metabolism. Aquat. Toxicol. 37: 9–20.
- Krueger W, Hilborn E, Converse R, Wade T. 2014. Drinking water source and human *Toxoplasma gondii* infection in the United States: a cross-sectional analysis of NHANES data. BMC Public Health. *In press*.
- Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F. 1997. Biomarqueurs en ecotoxicologie. Aspect fondamentaux. Masson, France.
- Lajtner J, Lucić A, Marušić M, Erben R. 2008. The effects of the trematode *Bucephalus polymorphus* on the reproductive cycle of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* in the Drava River. Acta Parasitol. 53: 85–92.
- Lavrentyev P, Gardner W, Cavaletto J, Beaver J. 1995. Effects of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha* Pallas) on protozoa and phytoplankton from Saginaw Bay, Lake Huron. J. Great Lakes Res. 21: 545–557.
- Le Goff J, Gallois J, Pelhuet L, Devier M, Budzinski H, Pottier D, et al. 2006. DNA adduct measurements in zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, Pallas. Potential use for genotoxicant biomonitoring of fresh water ecosystems. Aquat. Toxicol. 79: 55–64.
- Lee S, Ngui R, Tan T, Roslan M, Ithoi I, Lim Y. 2014. Aquatic biomonitoring of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in peninsular Malaysia. Environ. Sci. Pollut. Res. 21: 445–453.

- Lélu M, Gilot-Fromont E, Aubert D, Richaume A, Afonso E, Dupuis E, et al. 2011. Development of a sensitive method for *Toxoplasma gondii* oocyst extraction in soil. *Vet. Parasitol.* 183: 59–67.
- Li X, Guyot K, Dei-Cas E, Mallard J, Ballet J, Brasseur P. 2006. *Cryptosporidium* oocysts in mussels (*Mytilus edulis*) from Normandy (France). *Int. J. Food Microbiol.* 108: 321–325.
- Li X, Song H, Li W, Lu X, Nishimura O. 2010. An integrated ecological floating-bed employing plant, freshwater clam and biofilm carrier for purification of eutrophic water. *Ecol. Eng.* 36: 382–390.
- Lindsay D, Phelps K, Smith S, Flick G, Sumner S, Dubey J. 2001. Removal of *Toxoplasma gondii* oocysts from sea water by eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Eukariotic Microbiol.* 48: 197s–198s.
- Lindsay D, Collins M, Mitchell S, Cole R, Flick G, Wetch C, et al. 2003. Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in seawater. *J. Eukariotic Microbiol.* 50: 687–688.
- Lindsay D, Collins M, Mitchell S, Wetch C, Rosypal A, Flick G, et al. 2004. Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Parasitol.* 90: 1054–1057.
- Loayza-Muro R, Elías-Letts R. 2007. Responses of the mussel *Anodonta trapesialis* (Unionidae) to environmental stressors: effect of pH, temperature and metals on filtration rate. *Environ. Pollut.* 149: 209–215.
- Lucy F, Graczyk TK, Tamang L, Miraflor A, Minchin D. 2008. Biomonitoring of surface and coastal water for *Cryptosporidium*, *Giardia*, and human-virulent microsporidia using molluscan shellfish. *Parasitol. Res.* 103: 1369–1375.
- Lucy F, Connolly M, Graczyk TK, Tamang L, Sullivan M, Mastitsky S. 2010. Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) are effective sentinels of water quality irrespective of their size. *Aquat. Invasions* 5: 49–57.
- Mac Kenzie W, Hoxie N, Proctor M, Gradus M, Blair K, Peterson D, et al. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.* 331: 161–167.
- MacIsaac H. 1996. Potential abiotic and biotic impacts of zebra mussels on the inland waters of north america. *Am. Zool.* 36: 287–299.
- Mackie G, Schloesser D. 1996. Comparative biology of zebra mussels in europe and north america : An overview 1. *Am. Zool.* 258: 244–258.
- Mai K, Sharman P, Walker R, Katrib M, de Souza D, McConville M, et al. 2009. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104: 281–289.
- Martel P, Kovacs T, Voss R, Megraw S. 2003. Evaluation of caged freshwater mussels as an alternative method for environmental effects monitoring (EEM) studies. *Environ. Pollut.* 124: 471–483.

- Martins L, Nascimento I, Fillmann G, King R, Evangelista A, Readman J, et al. 2005. Lysosomal responses as a diagnostic tool for the detection of chronic petroleum pollution at Todos os Santos Bay, Brazil. *Environ. Res.* 99: 387–396.
- Mayrand E, St-Jean S, Courtenay S. 2005. Haemocyte responses of blue mussels (*Mytilus edulis* L.) transferred from a contaminated site to a reference site: can the immune system recuperate? *Aquac. Res.* 36: 962–971.
- Mazzillo F, Shapiro K, Silver M. 2013. A new pathogen transmission mechanism in the ocean: the case of sea otter exposure to the land-parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS One* 8: e82477.
- McCuin R, Bukhari Z, Sobrinho J, Clancy J. 2001. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from source water concentrates using immunomagnetic separation. *J. Microbiol. Methods* 45: 69–76.
- McLaughlan C, Aldridge D. 2013. Cultivation of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) within their invaded range to improve water quality in reservoirs. *Water Res.* 47: 4357–4369.
- McMahon R. 1996. The physiological ecology of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in north America and Europe. *Integr. Comp. Biol.* 36: 339–363.
- Medzhitov R, Janeway C. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol. Rev.* 173: 89–97.
- Melo P, Teodosio J, Reis J, Duarte A, Costa J, Fonseca I. 2006. *Cryptosporidium* spp. in freshwater bivalves in Portugal. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53: 28–29.
- Miller C, Boulter N, Ikin R, Smith N. 2009. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 39: 23–39.
- Miller M, Miller W, Conrad P, James E, Melli A, Leutenegger C, et al. 2008. Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: new linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *Int. J. Parasitol.* 38: 1319–1328.
- Miller W, Atwill E, Gardner I, Miller M, Fritz H, Hedrick R, et al. 2005. Clams (*Corbicula fluminea*) as bioindicators of fecal contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in freshwater ecosystems in California. *Int. J. Parasitol.* 35: 673–684.
- Minguez L, Meyer A, Molloy D, Giambérini L. 2009. Interactions between parasitism and biological responses in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): importance in ecotoxicological studies. *Environ. Res.* 109: 843–850.
- Mix M. 1976. A general model for leucocyte cell renewal in bivalve mollusks. *Mar. Fish. Rev.* 37–41.
- Mydlarz L, Jones L, Harvell C. 2006. Innate immunity, environmental drivers, and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37: 251–288.

- Nuutila J, Lilius E. 2005. Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytom. Part A* 65: 93–102.
- O'Hara S, Chen X. 2011. The cell biology of *Cryptosporidium* infection. *Microbes Infect.* 13: 721–730.
- Olson M, Goh J, Phillips M, Guselle N, McAllister T. 1999. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts survival in water, soil, and cattle feces. *J. Environ. Qual.* 28: 1991–1996.
- Ottoson J, Hansen A, Westrell T, Johansen K, et al. 2006. Removal of noro- and enteroviruses, *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts, and fecal indicators at four secondary wastewater treatment plants in Sweden. *Water Environ. Res.* 78: 828–834.
- Pal M, Alem B, Gari G, Tuli G. 2014. Toxoplasmosis in animals and humans - its diagnosis, epidemiology and control. *Int. J. Livest. Res.* 4: 1–10.
- Palais F, Mouneyrac C, Dedourge-Geffard O, Giambérini L, Biagianti-Risbourg S, Geffard A. 2011. One-year monitoring of reproductive and energy reserve cycles in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 83: 1062–1073.
- Pales Espinosa E, Allam B, Ford S. 2008. Particle selection in the ribbed mussel *Geukensia demissa* and the Eastern oyster *Crassostrea virginica*: Effect of microalgae growth stage. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 79: 1–6.
- Perez D, Fontanetti C. 2011. Hemocitical responses to environmental stress in invertebrates: a review. *Environ. Monit. Assess.* 177: 437–447.
- Pipe R, Farley S, Coles J. 1997. The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res.* 289: 537–545.
- Putignani L, Mancinelli L, del Chierico F, Menichella D, Adlerstein D, Angelici MC, et al. 2011. Investigation of *Toxoplasma gondii* presence in farmed shellfish by nested-PCR and real-time PCR fluorescent amplicon generation assay (FLAG). *Exp. Parasitol.* 127: 409–417.
- Quinn B, Gagné F, Costello M, McKenzie C, Wilson J, Mothersill C. 2004. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquat. Toxicol.* 66: 279–292.
- Reboredo-Fernández A, Prado-Merini O, García-Bernadal T, Gómez-Couso H, Ares-Mazás E. 2014. Benthic macroinvertebrate communities as aquatic bioindicators of contamination by *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Parasitol. Res.* 113: 1625–1628.
- Reeders H, Bu de Vaate A, Slim F. 1989. The filtration rate of *Dreissena polymorpha* (Bivalvia) in three Dutch lakes with reference to biological water quality management. *Freshw. Biol.* 22: 133–141.
- Renault T, Xue Q, Chilmonczyk S. 2001. Flow cytometric analysis of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes using a monoclonal antibody specific for granulocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 11: 269–274.

- Renwrantz L, Schmalmack W, Redel R, Friebe B, Schneeweib H. 1996. Conversion of phenoloxidase and peroxidase indicators in individual haemocytes of *Mytilus edulis* specimens and isolation of phenoloxidase from haemocyte extract. J. Comp. Physiol. B 165: 647–658.
- Renwrantz L, Siegmund E, Woldmann M. 2013. Variations in hemocyte counts in the mussel, *Mytilus edulis*: similar reaction patterns occur in disappearance and return of molluscan hemocytes and vertebrate leukocytes. Comp. Biochem. Physiol. Part A 164: 629–637.
- Ricciardi A. 2003. Predicting the impacts of an introduced species from its invasion history: an empirical approach applied to zebra mussel invasions. Freshw. Biol. 48: 972–981.
- Robertson L, Campbell A, Smith H. 1992. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3494–3500.
- Robertson L, Paton C, Campbell A, Smith P, Jackson M, Gilmour R, et al. 2000. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. Water Res. 34: 2310–2322.
- Robertson L. 2007. The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: A review. Int. J. Food Microbiol. 120: 201–216.
- Robertson L, Gjerde B. 2008. Development and use of a pepsin digestion method for analysis of shellfish for *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. J. Food Prot. 71: 959–966.
- Roslev P, Iversen L, Sønderbo H, Iversen N, Bastholm S. 2009. Uptake and persistence of human associated Enterococcus in the mussel *Mytilus edulis*: relevance for faecal pollution source tracking. J. Appl. Microbiol. 107: 944–953.
- Roslev P, Bukh A, Iversen L, Sønderbo H, Iversen N. 2010. Application of mussels as biosamplers for characterization of faecal pollution in coastal recreational waters. Water Sci. Technol. 62: 586–593.
- Rowley A, Powell A. 2007. Invertebrate immune systems-specific, quasi-specific, or nonspecific? J. Immunol. 179: 7209–7214.
- Salazar M, Salazar M. 2000. Using caged bivalves to characterize exposure and effects over space and time. Monit. Altern. Meet. 1–32.
- Schets F, van den Berg H, de Roda Husman A. 2013. Determination of the recovery efficiency of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from seeded bivalve mollusks. J. Food Prot. 76: 93–98.
- Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. J. Appl. Microbiol. 113: 1014–1026.
- Sepúlveda-Arias J, Gómez-Marin J, Bobić B, Naranjo-Galvis C, Djurković-Djaković O. 2014. Toxoplasmosis as a travel risk. Travel Med. Infect. Dis. *in press*.

- Shapiro K, Largier J, Mazet J, Bernt W, Ell J, Melli A, et al. 2009. Surface properties of *Toxoplasma gondii* oocysts and surrogate microspheres. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 1185–1191.
- Shapiro K, Mazet J, Schriewer A, Wuertz S, Fritz H, Miller W, et al. 2010. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts and surrogate microspheres in water using ultrafiltration and capsule filtration. *Water Res.* 44: 893–903.
- Shapiro K, Silver M, Largier J, Conrad P, Mazet J. 2012. Association of *Toxoplasma gondii* oocysts with fresh, estuarine, and marine macroaggregates. *Limnol. Oceanogr.* 57: 449–456.
- Shi L, Günther S, Hübschmann T, Wick L, Harms H, Müller S. 2007. Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. *Cytom. Part A* 71: 592–598.
- Simon A, Rousseau A, Savary S, Bigras-Poulin M, Ogden N. 2013. Hydrological modelling of *Toxoplasma gondii* oocysts transport to investigate contaminated snowmelt runoff as a potential source of infection for marine mammals in the Canadian Arctic. *J. Environ. Manag.* 127: 150–161.
- Slifko T, Smith H, Rose J. 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int. J. Parasitol.* 30: 1379–1393.
- Sluter S, Tzipori S, Widmer G. 1997. Parameters affecting polymerase chain reaction detection of waterborne *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 325–330.
- Smith H, Nichols R, Grimason A. 2005. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends Parasitol.* 21: 133–142.
- Smolders R, Bervoets L, de Coen W, Blust R. 2004. Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environ. Pollut.* 129: 99–112.
- Sokolova I. 2009. Apoptosis in molluscan immune defense. *Invertebr. Surviv. J.* 6: 49–58.
- Stabili L, Terlizzi A, Cavallo R. 2013. Sewage-exposed marine invertebrates: survival rates and microbiological accumulation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20: 1606–1616.
- Straub T, Chandler D. 2003. Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. *J. Microbiol. Methods* 53: 185–197.
- Sures B. 2006. How parasitism and pollution affect the physiological homeostasis of aquatic hosts. *J. Helminthol.* 80: 151–157.
- Sures B. 2008. Host-parasite interactions in polluted environments. *J. Fish Biol.* 73: 2133–2142.
- Tasumi S, Vasta G. 2007. A galectin of unique domain organization from hemocytes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus*. *J. Immunol.* 179: 3086–3098.

- Ten Winkel E, Davids C. 1982. Food selection by *Dreissena polymorpha* Pallas (Mollusca : Bivalvia). Freshw. Biol. 12: 553–558.
- Thompson R. 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. Int. J. Parasitol. 30: 1259–1267.
- Thompson R, Monis P. 2004. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. Adv. Parasitol. 58: 69–137.
- Tiscar P, Mosca F. 2004. Defense mechanisms in farmed marine molluscs. Vet. Res. Commun. 28: 57–62.
- Traversa D, Giangaspero A, Molini U, Iorio R, Paoletti B, Otranto D, et al. 2004. Genotyping of *Cryptosporidium* isolates from *Chamelea gallina* clams in Italy. Appl. Environ. Microbiol. 70: 4367–4370.
- Trinkler N, Bardeau J, Marin F, Labonne M, Jolivet A, Crassous P, et al. 2011. Mineral phase in shell repair of Manila clam *Venerupis philippinarum* affected by brown ring disease. Dis. Aquat. Organ. 93: 149–162.
- Utaaker KS, Robertson L. 2014. Climate change and foodborne transmission of parasites: A consideration of possible interactions and impacts for selected parasites. Food Res. Int. *in press*.
- VanWormer E, Conrad P, Miller M, Melli A, Carpenter T, Mazet J. 2013a. *Toxoplasma gondii*, source to sea: higher contribution of domestic felids to terrestrial parasite loading despite lower infection prevalence. Ecohealth 10: 277–289.
- VanWormer E, Fritz H, Shapiro K, Mazet J, Conrad P. 2013b. Molecules to modeling: *Toxoplasma gondii* oocysts at the human-animal-environment interface. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 36: 217–231.
- Verweij J, Schinkel J, Laeijendecker D, van Rooyen M, van Lieshout L, Polderman A. 2003. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. Mol. Cell. Probes 17: 223–225.
- Villena I, Aubert D, Gomis P, Ingland J, Denis-bisiaux H, Dondon J, et al. 2004. Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. Appl. Environ. Microbiol. 70: 4035–4039.
- Voets J, Talloen W, de Tender T, Dongen S, Covaci A, Blust R, et al. 2006. Microcontaminant accumulation, physiological condition and bilateral asymmetry in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from clean and contaminated surface waters. Aquat. Toxicol. 79: 213–225.
- Waldman E, Tzipori S, Forsyth J. 1986. Separation of *Cryptosporidium* species oocysts from feces by using a percoll discontinuous density gradient. J. Clin. Microbiol. 23: 199–201.
- Willis J, McClure J, Davidson J, McClure C, Greenwood S. 2013. Global occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in shellfish: Should Canada take a closer look? Food Res. Int. 52: 119–135.

- Willis J, McClure J, McClure C, Spears J, Davidson J, Greenwood S. 2014. Bioaccumulation and elimination of *Cryptosporidium parvum* oocysts in experimentally exposed Eastern oysters (*Crassostrea virginica*) held in static tank aquaria. *Int. J. Food Microbiol.* 173: 72–80.
- Yu X, van Dyke M, Portt A, Huck P. 2009. Development of a direct DNA extraction protocol for real-time PCR detection of *Giardia lamblia* from surface water. *Ecotoxicol.* 18: 661–668.
- Zaiko A, Daunys D. 2011. Density effects on the clearance rate of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*: flume study results. *Hydrobiologia* 680: 79–89.
- Zarlenga D, Trout J. 2004. Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. *Vet. Parasitol.* 126: 195–217.
- Zhang M, Yang Z, Wang S, Tao L, Xu L, Yan R, et al. 2014. Detection of *Toxoplasma gondii* in shellfish and fish in parts of China. *Vet. Parasitol.* 200: 85–89.
- Zupan I, Kalafatić M. 2003. Histological effects of low atrazine concentration on zebra mussel (*Dreissena polymorpha* Pallas). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70: 688–695.

Interactions protozoaires – moule zébrée (*Dreissena polymorpha*) : implication en biosurveillance sanitaire et environnementale

RESUME

L'évaluation de la contamination des cours d'eau par les agents parasites protozoaires est fondamentale puisqu'on estime qu'une personne sur deux dans le monde est ou a été infectée par une zoonose d'origine parasitaire. Les trois principaux parasites responsables d'épidémies hydriques sont *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* et *Toxoplasma gondii*. Actuellement, seule la matrice eau est utilisée pour analyser la présence de ces parasites dans l'environnement aquatique. Peu reproductible et chronophage, cette méthode ne permet pas de mettre en place une surveillance de routine. Le projet de thèse propose l'utilisation de la moule zébrée, *Dreissena polymorpha*, comme un nouvel outil complémentaire pour évaluer la qualité biologique des milieux d'eau douce. Au travers d'expérimentations combinant différentes approches *in vivo*, *ex vivo* et *in situ*, le potentiel de la dreissène à accumuler les parasites protozoaires ainsi que leurs cinétiques d'accumulation dans les tissus ont été déterminés. Utilisée comme espèce sentinelle des contaminations chimiques, l'effet d'un stress biologique dû aux protozoaires a été évalué au laboratoire sur les cellules clés de l'immunité des bivalves, les hémocytes. Ainsi, le projet permet de placer l'organisme *Dreissena polymorpha* dans une double stratégie de biosurveillance : une biosurveillance sanitaire liée à l'utilisation de la dreissène en tant que vecteur de parasites considérés comme enjeux de santé publique et une biosurveillance environnementale liée à la compréhension des facteurs de confusion avec les réponses biologiques utilisées comme biomarqueurs.

MOTS-CLES : *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis*, *Dreissena polymorpha*, interactions, biosurveillance

Interaction protozoa - zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): interest for sanitary and environmental biomonitoring

ABSTRACT

Assessment of the water biological contamination by protozoa is crucial since one in two person worldwide is or has been infected by a parasitic zoonosis. The main protozoa responsible of waterborne outbreaks are *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* and *Toxoplasma gondii*. Currently, protozoa detection is only based on water analysis. Irrelevant and time consuming, water analysis do not permit accurate biomonitoring. These project aims to use the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*, as a new complementary tool for biological quality analysis of freshwater. Through *in vivo*, *ex vivo* and *in situ* experiments, we determine the utility of zebra mussel for protozoa accumulation and their accumulation pattern within mussel tissues. Already use as a sentinel specie for chemical contamination, biological stress caused by protozoa has been determined in laboratory experiments on key cells of bivalve immunity, the hemocytes. Hence, *Dreissena polymorpha* could be involved in a twofold biomonitoring tactics: sanitary biomonitoring related to the use of zebra mussel as vector to protozoa with public health issue and environmental biomonitoring on understanding of the confounding factors in biological responses used as biomarkers.

KEYWORDS: *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis*, *Dreissena polymorpha*, interactions, biomonitoring

UMR-I 02 SEBIO
UFR Sciences Exactes et Naturelles
Moulin de la Housse BP 1039 51687
Reims Cedex 02

EA 3800 PROTAL
Hôpital Maison Blanche
45 rue Cognacq Jay
51092 Reims CEDEX