

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES FONDAMENTALES ET SANTE (619)

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Biologie parasitaire

Présentée et soutenue publiquement par

ANGELIQUE ROUSSEAU

Le 10 décembre 2018

**Méthodes de caractérisation de la viabilité et de l'infectiosité des protozoaires
Toxoplasma gondii, *Cryptosporidium* spp et *Giardia duodenalis* et applications aux
matrices alimentaires**

Thèse dirigée par **Dominique AUBERT et Loïc FAVENNEC**

JURY

Mme Nathalie KAPEL,	PU-PH	Université Paris 5 (Paris),	Président et Rapporteur
Mr Dominique AUBERT,	MCU-PH,	ESCAPE EA 7510 (Reims),	Directeur de thèse
M. Loïc FAVENNEC,	PU-PH	ESCAPE EA 7510 (Rouen),	Co-Directeur de thèse
Mme Graziella BOURDIN,	HDR	ANSES (Boulogne-Sur-Mer),	Rapporteur
Mme Stéphanie LA CARBONA,	pHD,	ACTALIA (Caen),	Examineur
Mme Isabelle VILLENA,	PU-PH,	ESCAPE EA 7510 (Reims),	Examineur
M. Aurélien DUMETRE,	MCU,	IRD257 VITROME (Marseille),	Examineur

Méthodes de caractérisation de la viabilité des protozoaires pathogènes *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp et *Giardia duodenalis* et application aux matrices alimentaires

Dans un contexte d'émergence des maladies parasitaires d'origine alimentaire, l'OMS souligne la nécessité d'approfondir les connaissances sur les parasites protozoaires transmissibles par les aliments. Des approches moléculaires ont été développées pour détecter simultanément les oocystes de *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* et kystes de *Giardia duodenalis* dans les aliments mais ne fournissent aucune information sur leur viabilité et infectiosité. L'objectif de cette thèse a été de développer des méthodes pour évaluer ces deux paramètres. Pour la viabilité, la PMA-qPCR a permis de mettre en évidence des oocystes de *T. gondii* viables dans l'eau mais cette méthode semble peu pertinente pour l'évaluation de l'efficacité des traitements d'inactivation. La RT-qPCR a été développée sur matrice mollusque pour les trois parasites mais s'avère trop peu sensible pour la biosurveillance. Considérant sa limite de détection de 1 kyste viable en matrice simple, la CC-qPCR semble être une alternative prometteuse pour évaluer la viabilité de *Giardia* en matrice complexe. Pour l'infectiosité, l'optimisation des bioessais pour *T. gondii* a abouti à un modèle semi-quantitatif et la CC-qPCR développée a permis de détecter moins de 5 et 10 oocystes infectieux sur les matrices eau et mollusque respectivement, en maximum 5 jours. La CC-qPCR développée pour *C. parvum* dans l'eau a permis de détecter un minimum de 20 à 200 oocystes infectieux. Enfin, ces méthodes ont été appliquées pour étudier la survie des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum* en matrice mollusque après sept jours de bioaccumulation et de dépuration.

Mots-clés : Protozoaire, Pathogène, Viabilité, Infectiosité, qPCR

Methods for characterizing the viability of pathogenic protozoa *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp and *Giardia duodenalis* and applications to food matrices

Considering the emergence of parasitic foodborne disease, the WHO highlights the need for in depth investigations on protozoan parasites transmitted by food. Molecular approaches have been developed to simultaneously detect *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* (oo)cysts in food but provide no information on their viability and infectivity. The aim of this thesis was to develop some methods to assess these criteria. For viability, the developed PMA-qPCR was able to detect viable *T. gondii* oocysts in water but this method seems not relevant to evaluate the efficacy of inactivation treatments. The RT-qPCR was developed for the three parasites on mollusk matrices but appeared to be not sensitive enough for biomonitoring application. Taking into account the limit of detection of 1 viable cyst in simple matrix, CC-qPCR seems to be a promising alternative to assess *Giardia* viability in complex matrix. For infectivity, *T. gondii* bioassays optimization led to a semi-quantitative model and the developed CC-qPCR assay was able to detect less than 5 and 10 infectious oocysts in the water and mollusc matrix respectively, in a maximum of 5 days. CC-qPCR assays developed for *C. parvum* in water allowed the detection of a minimum of 20 to 200 infective oocysts. Finally, these methods were applied to study the survival of *T. gondii* and *C. parvum* oocysts in mollusc matrix following a 7-days accumulation and a depuration step.

Keywords: Protozoa, Pathogenic, Viability, Infectiousness, qPCR

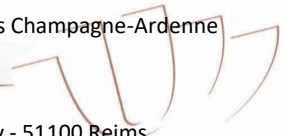
Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Biologie parasitaire

Université de Reims Champagne-Ardenne

ESCAPE - EA 7510

51, rue Cognacq Jay - 51100 Reims



Remerciements

Bien que cette page soit la première d'un mémoire de thèse, c'est souvent la dernière et la plus difficile à écrire. La difficulté réside dans le désir et le devoir de n'oublier aucune des personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail. Ce mémoire récapitule un travail qui n'aurait pu aboutir sans l'aide et l'implication de nombreuses personnes que je remercie sincèrement :

Le Professeur Graziella BOURDIN et le Professeur Nathalie KAPEL pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail,

Le Dr Aurélien DUMETRE pour toutes ses connaissances sur les oocystes de *T. gondii* et pour avoir accepté de juger ce travail,

Le Professeur Isabelle VILLENA de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour mener à bien ce projet de thèse durant 3 ans,

Le Dr Dominique AUBERT, pour son encadrement et ses connaissances bibliographiques,

Le Dr Stéphanie LA CARBONA qui depuis Saint-Lô, a suivi la totalité de ce projet avec un énorme investissement sur la partie de biologie moléculaire,

Le Professeur Loïc FAVENNEC, un grand merci pour ses connaissances sur *G. duodenalis* et *C. parvum*,

Le Dr Sandie ESCOTTE-BINET pour sa précieuse aide au laboratoire, ses conseils, sa sympathie et surtout sa bonne humeur.

Elodie GEBA et Dr Aurélie BIGOT-CLIVOT, pour les deux semaines aux journées remplies de dissection de mollusques, de lavage de tube puis la répartition des tâches simultanées d'extraction d'ARN et de culture cellulaire,

Régine GEERS, Emilie JOSSE, Naïma ORTIS et Loren ANDRULEWIEZ, un grand merci pour votre aide, vos conseils et votre savoir-faire. Et particulièrement Régine GEERS pour l'inoculation des souris et l'obtention de résultats,

A. ROUSSEAU

Catherine CAZEAUX, pour son partage de connaissances techniques sur les protozoaires tout au long de la thèse,

Dr Gilles GARGALA et Dr Laetitia LE GOFF, merci pour vos conseils mais aussi pour la réception et l'inoculation à des souris et gerbilles d'échantillon de moules bleues et dreissènes dopés,

Mes collègues doctorants ou post-doctorants, Julie, Matthieu, Loïc, Jérémie, Antoine et Salma ainsi que les stagiaires venus dans notre laboratoire : Sophie, Simon, Marie, Irène, Elsa, Louis, Pierre, Pierre, Malik et Yassine avec qui nous avons partagé notre passion commune pour la recherche scientifique,

Le Professeur Jérôme DEPAQUIT et le Docteur Hubert FERTE pour m'avoir permis d'utiliser le Tissue Lyser,

Le Dr Marie-Lazarine Poule pour sa sympathie et sa transmission de connaissances lorsque l'occasion le permettait,

Le Dr Frédéric VELARD pour qui les statistiques n'ont pas de secret,

Le Dr Christine TERRYN pour sa disponibilité, pour la réalisation de photos en microscopie plein champs et confocale, et pour les modélisations 3D,

Le Dr Damien RIOULT et le Dr Sandra AUDONET, pour leur encadrement, leurs explications de la cytométrie en flux et leurs conseils,

Toutes les personnes que j'ai pu croiser au 3^{ème} étage pour leur gentillesse, leur soutien et leur bonne humeur parfois le temps de la pause café : Sandra AUDONNET, Jérôme GAILLARD, Claire TOURNOIS, Yves JACQUOT et Sylvie GUILLAUME,

Mélanie VITTIER pour ton chaleureux accueil au sein de ta famille durant la formation au Diplôme Universitaire d'Expérimentation Animale,

Marie FULLANA et Dr Loïc DURAND pour les moments partagés sur Reims ou Paris et l'amitié nouée,

Mes derniers remerciements vont à mes amis et à ma famille :

Noémie, pour nos soirées distractions le temps d'un cinéma et les dégustations au paradis du fruit,

Matt et Paca pour votre présence et soutiens dans les bons comme dans les mauvais moments,

Mamie qui a cru en moi depuis toute petite et Danielle qui a eu le courage de lire chaque partie de mon mémoire, et ce même en vacances au soleil avec mes petits cousins,

Louloutte et Luc pour tous les repas de famille passés et les bons moments avec vos enfants : la piscine, la balade en forêt sous la pluie pour trouver les bâtons de Yann, Disney, les soirées film et dernièrement cette fabuleuse bataille d'eau mais aussi pour nos prochaines vacances entre cousine,

Yann, Tristan et Gabrielle pour tous les moments photos sur Snapchat qui m'ont permis de ne plus penser à la rédaction de ce long mémoire de thèse,

Et enfin Mamounette, Papa, Lulu, Flo, Laurine et bien sûr Jo pour votre soutien sans faille durant toutes ces années.

VALORISATIONS

- Publications :

Rousseau, A., La Carbona, S., Dumètre, A., Favennec, L., Villena, I., Aubert, D. Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne stages (cysts/oocysts) of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Toxoplasma gondii*: a review of methods. 2018, *Parasite*, 25, 14.

Rousseau, A., Villena, I., Dumètre, A., Escotte-Binet, E., Favennec, L., Dubey, J.P., Aubert, D., La Carbona, S. Evaluation of propidium monoazide-based qPCR to detect viable oocysts of *Toxoplasma gondii*. 2019, *Parasitology Research*.

Rousseau, A., Escotte-Binet, S., La Carbona, S., Chagneau, S., Favennec, L., Dumètre, A., Kubina, S., Dubey, J.P., Majou, D., Bigot, A., Villena, I., Aubert, D. Assessing *Toxoplasma gondii* oocysts infectivity by a sporocyst-based cell-culture assay combined to qPCR for environmental applications. **A soumettre dans Applied and Environmental Microbiology.**

- Communications orales :

Rousseau, A., Géba, E., La Carbona, S., Bigot-Clivot, A., Escotte, S., Favennec, L., Villena, I., Aubert, D. Etude de la viabilité et de l'infectiosité des (oo)cystes de *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* et *Giardia duodenalis* en matrices complexes : *Mytilus edulis* et *Dreissena polymorpha*. Mai 2018, Société Française de Parasitologie, Nice, France.

Rousseau, A., Géba, E., La Carbona, S., Bigot-Clivot, A., Escotte, S., Favennec, L., Villena, I., Aubert, D. Potentiel infectieux des oocystes de *Toxoplasma gondii* et *Cryptosporidium parvum* bioaccumulés par des moules bleues (*Mytilus edulis*) et des dreissènes (*Dreissena polymorpha*). Octobre 2018, Journée de Jeunes Chercheurs, Reims, France.

- **Communications affichées :**

Rousseau, A., Escotte, S., La Carbona, S., Favennec, L., Villena, I., Aubert, D. Study of viability and infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts in a complex food matrix: *Mytilus edulis*. 2018, FoodMicro, Berlin, Allemagne.

Rousseau, A., Escotte, S., La Carbona, S., Favennec, L., Villena, I., Aubert, D. Etude de la viabilité des (oo)cystes de *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* et *Giardia duodenalis* dans l'eau. 2018, Journée Transfrontalière, Reims, France.

Rousseau, A., Aubert D., Favennec, L., La Carbona, S., Villena, I. Méthode de caractérisation de la viabilité de *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp. et *Giardia duodenalis*: Résultats préliminaires. 2017, Société Française de parasitologie, Toulouse, France.

Rousseau, A., Cazeaux, C., Aubert D., Favennec, L., La Carbona, S., Villena, I. Evaluation de la viabilité des protozoaires *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis* par PMA-qPCR. 2017, Journée des Jeunes Chercheurs, Reims, France.

Rousseau, A., Aubert, D., Favennec, L., La Carbona, S., Villena, I. Impact de différents traitements physiques sur l'intégrité membranaire des oocystes de *Toxoplasma gondii* : Utilisation du monoazote de propidium (PMA). 2016, Journée des Jeunes Chercheurs, Amiens, France.

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
VALORISATIONS	6
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES TABLEAUX	12
LISTE DES ABREVIATIONS	13
PREAMBULE	15
1. SECURITE SANITAIRE : LES CONSEQUENCES SUR LES FILIERES ET LA GESTION PUBLIQUE DU RISQUE	19
1.1. <i>Les impacts sociaux, économiques et sanitaires</i>	19
1.2. <i>La réglementation dans le secteur de l'agroalimentaire</i>	21
2. LES PARASIToses TRANSMISES PAR L'ALIMENTATION	22
2.1 <i>La toxoplasmose</i>	23
2.2 <i>La cryptosporidiose et la giardiose</i>	26
2.3 <i>Les formes infectieuses</i>	30
2.3.1. <i>Les oocystes de Toxoplasma gondii</i>	30
2.3.2 <i>Les oocystes de Cryptosporidium parvum</i>	31
2.3.3 <i>Les kystes de Giardia duodenalis</i>	32
2.3.4 <i>La résistance des formes environnementales</i>	33
2.3.4.1 <i>Les traitements physiques</i>	33
2.3.4.2 <i>Les traitements chimiques</i>	34
2.3.4.3 <i>Les conditions environnementales</i>	35
3. TRANSMISSION ENVIRONNEMENTALES DE <i>T. GONDII</i> , <i>C. PARVUM</i> ET <i>G. DUODENALIS</i>	36
3.1. <i>Epidémies d'origine hydrique</i>	36
3.2 <i>Epidémies d'origine alimentaire</i>	40
3.3 <i>Cas particulier des mollusques</i>	44
3.4 <i>Biosurveillance des masses d'eau</i>	48
4. LES METHODES D'ANALYSES DE <i>T. GONDII</i> , <i>C. PARVUM</i> ET <i>G. DUODENALIS</i> DANS LES DENREES ALIMENTAIRES	51
4.1 <i>Méthodes de détection de T. gondii, C. parvum et G. duodenalis dans l'eau et les aliments</i>	51
4.2 <i>Méthodes d'étude de la viabilité et l'infectiosité</i>	53
5. STRATEGIES DEVELOPPEES DANS LA THESE	77
PARTIE 1 : METHODES MOLECULAIRES POUR ETUDIER LA VIABILITE DES OOCYSTES DE T. GONDII ET C. PARVUM ET DES KYSTES DE G. DUODENALIS	80
PARTIE 1.A. : MATRICE EAU	82
1.A.1 <i>Évaluation du monoazoture de propidium couplé à la qPCR pour détecter les oocystes/kystes viables</i>	83
1.A.1.1. <i>PMA-qPCR pour mesurer la viabilité de T. gondii</i>	83
1.A.1.2. <i>PMA-qPCR pour évaluer la viabilité des oocystes de C. parvum et des kystes de G. duodenalis.</i>	95
<i>Matériels et méthodes</i>	102

a) Oocystes et kystes : non traités et inactivés	102
b) Marquage PMA, extraction d'ADN et qPCR	102
c) Extraction d'ARNm et RT-qPCR	103
d) Analyses statistiques	104
Résultats	105
1.A.1.3. La PMA-qPCR pour mesurer la viabilité des oocystes et kystes : Conclusions/discussion.....	110
1.A.2 <i>Evaluation de la multiplication in vitro couplée à la qPCR pour étudier la viabilité des kystes de G. duodenalis</i>	114
Matériels et méthodes	114
a) Kystes de <i>G. duodenalis</i> : non traités et inactivés	114
b) Entretien des lignées cellulaires	114
c) Obtention de trophozoïtes et infection des cellules	114
d) Extraction d'ADN de trophozoïtes et qPCR.....	115
e) Analyses statistiques	115
<i>La multiplication in vitro couplée à la qPCR pour étudier la viabilité des kystes de G. duodenalis : Conclusions/Discussion</i>	120
PARTIE 1.B. : MATRICE MOLLUSQUE	122
<i>ETUDE DE LA VIABILITE DES OOCYSTES DE T. GONDII ET C. PARVUM ET DES KYSTES DE G. DUODENALIS PAR RT-qPCR</i>	123
Matériels et méthodes	123
a) Les parasites utilisés	123
b) Mollusques utilisés	123
c) Elution/récupération des oocystes et kystes des matrices mollusques	124
d) Extraction d'ARN total et RT-qPCR.....	124
e) Analyses statistiques	126
Résultats	127
a) <i>T. gondii</i>	127
b) <i>C. parvum</i> et <i>G. duodenalis</i>	132
c) Détermination de la limite de détection des oocystes de <i>T. gondii</i> et <i>C. parvum</i> , et des kystes de <i>G. duodenalis</i> en RT-qPCR à partir de <i>M. edulis</i> et <i>D. polymorpha</i>	133
<i>La RT-qPCR pour étudier la viabilité des oocystes de T. gondii et C. parvum et des kystes de G. duodenalis en matrice mollusque : Conclusions/Discussion</i>	136
CONCLUSIONS PARTIE 1	138
PARTIE 2 : CC-QPCR : METHODE ALTERNATIVE AUX BIOESSAIS POUR ETUDIER L'INFECTIOSITE DES OOCYSTES DE T. GONDII ET DE C. PARVUM	140
PARTIE 2.A. : <i>T. GONDII</i>	142
PARTIE 2.B. : <i>C. PARVUM</i>	173
Matériels et méthodes	173
a) Oocystes non traités	173
b) Lignée cellulaire	173
c) Mollusques utilisés et élution/récupération des oocystes des mollusques.....	173
d) Obtention des sporozoïtes et infection des cellules HCT-8.....	174
e) Détermination des limites de détection (LD ₉₅) de la CC-qPCR en matrices eau et moules.....	174
f) Extraction d'ADN des sporozoïtes et qPCR	174
g) Analyses statistiques	175

Résultats	176
a) Évaluation de l'infectiosité des oocystes de <i>C. parvum</i> par CC-qPCR en matrice simple.....	176
b) Évaluation de l'infectiosité des oocystes de <i>C. parvum</i> par CC-qPCR en matrice mollusque	177
La CC-qPCR, comme méthode alternative aux bioessais pour étudier l'infectiosité des oocystes de <i>C. parvum</i> : Conclusions/discussion	178
CONCLUSION PARTIE 2	180
PARTIE 3 : EVALUATION DE LA SURVIE DES OOCYSTES DE <i>T. GONDII</i> ET DE <i>C. PARVUM</i> EN MATRICE MOLLUSQUE	182
Introduction	183
Matériels et méthodes	184
a) Les parasites utilisés	184
b) Les mollusques utilisés.....	184
c) Conditions d'exposition.....	185
d) Elution/récupération des oocystes des matrices mollusques	186
e) Mesure de la bioaccumulation par qPCR	186
f) CC-qPCR.....	187
g) <i>In vivo</i>	187
h) Analyses statistiques.....	188
Résultats	189
a) Bioaccumulation et persistance des parasites	189
b) Survie des oocystes de <i>T. gondii</i> et <i>C. parvum</i> évaluée par CC-qPCR	190
c) Survie des oocystes de <i>T. gondii</i> et <i>C. parvum</i> évaluée par bioessais	193
Evaluation de la survie des oocystes de <i>T. gondii</i> et de <i>C. parvum</i> en matrice mollusque :	197
Conclusions/discussion	197
CONCLUSIONS GENERALES	201
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	208

Liste des figures

Figure 1 : Comparaison du classement des parasites d'origine alimentaire dans différentes parties de l'Europe sur la base des critères Euro-FBP en 2016.	23
Figure 2 : Différentes sources de contamination de l'Homme par <i>T. gondii</i>	25
Figure 3 : Cycle de transmission des oocystes de <i>C. parvum</i> et kystes de <i>G. duodenalis</i>	29
Figure 4 : Photo d'un oocyste et ultrastructure d'un sporozoïte de <i>T. gondii</i>	31
Figure 5 : Oocystes de <i>C. parvum</i> par microscopie électronique à balayage.	32
Figure 6 : Trophozoïtes et kystes de <i>G. duodenalis</i>	32
Figure 7 : Moule zébrée utilisée en biosurveillance de la qualité des eaux douces.	49
Figure 8 : Effet des concentrations de PMA appliquées à température ambiante sur des suspensions d'oocystes de <i>C. parvum</i> (C) et de kystes de <i>G. duodenalis</i> (G) viables et inactivées par la chaleur ou le froid.	107
Figure 9 : Effet des températures d'incubation du PMA sur des suspensions d'oocystes de <i>C. parvum</i> et de kystes de <i>G. duodenalis</i> viables et inactivées par la chaleur ou le froid.	109
Figure 10 : Impact du protocole de dékystement sur la multiplication <i>in vitro</i> des trophozoïtes de <i>G. duodenalis</i> mesurée par qPCR.	116
Figure 11 : Multiplication <i>in vitro</i> de trophozoïtes de <i>G. duodenalis</i> en présence ou absence de cellules HCT-8 (n=2).	117
Figure 12 : Etude de la viabilité de kystes de <i>G. duodenalis</i> non traités et inactivés par la chaleur (15 min 75°C) par multiplication <i>in vitro</i> couplée à la qPCR (n=3).	118
Figure 13 : Effet du gradient de Percoll 30% sur la détection des oocystes de <i>T. gondii</i> viables en RT-qPCR à partir de <i>M. edulis</i> et <i>D. polymorpha</i>	130
Figure 14 : Etude de l'infectiosité de 10 000 oocystes de <i>C. parvum</i> chez <i>D. polymorpha</i> et <i>M. edulis</i> par CC-qPCR.	177
Figure 15 : Suivi de la bioaccumulation et de la persistance des oocystes de <i>T. gondii</i> chez <i>D. polymorpha</i> et <i>M. edulis</i>	189
Figure 16 : Infectiosité des oocystes de <i>T. gondii</i> dans les tissus de <i>D. polymorpha</i> (A) et de <i>M. edulis</i> (B) déterminée par CC-qPCR.	191
Figure 17 : Infectiosité des oocystes de <i>C. parvum</i> dans les tissus de <i>D. polymorpha</i> (A) et <i>M. edulis</i> (B) déterminée par CC-qPCR.	192
Figure 18 : Infectiosité des oocystes de <i>C. parvum</i> dans les tissus de <i>D. polymorpha</i> (A) et de <i>M. edulis</i> (B).	196
Figure 19 : Schéma de synthèse des techniques disponibles dans la littérature et/ou au sein du laboratoire avant/après la thèse et leur applicabilité dans un contexte de biosurveillance et de mesure d'efficacité d'inactivation de traitements sur matrice eau et mollusque.	206

Liste des tableaux

Tableau I : Espèce de <i>Cryptosporidium</i> validées et leurs hôtes majoritaires.	27
Tableau II : Epidémies hydriques décrites pour <i>G. duodenalis</i> et <i>C. parvum</i> depuis 2006....	38
Tableau III : Epidémies hydriques rapportées pour <i>T. gondii</i>	40
Tableau IV : Epidémies alimentaires rapportées pour <i>T. gondii</i> (forme oocyste), <i>Cryptosporidium</i> spp. et <i>G. duodenalis</i>	43
Tableau V : Prévalence des oocystes de <i>T. gondii</i> et <i>C. parvum</i> , et des kystes de <i>G. duodenalis</i> dans les mollusques bivalves.	45
Tableau VI : Synthèse de toutes les méthodes évaluées sur chacune des matrices en viabilité et en infectiosité.....	79
Tableau VII : Cibles de qPCR pour <i>C. parvum</i> et <i>G. duodenalis</i>	103
Tableau VIII : Cibles de RT-qPCR pour <i>C. parvum</i> et <i>G. duodenalis</i>	104
Tableau IX : Valeurs de Cq obtenues par PMA-qPCR et RT-qPCR pour des oocystes de <i>C. parvum</i> et des kystes de <i>G. duodenalis</i> viables et inactivés par le froid (une nuit entre -20 et -15°C) ou la chaleur (15 min, 70°C).....	106
Tableau X : Evaluation de la limite de détection du protocole de multiplication <i>in vitro</i> couplée à la qPCR à partir de kystes de <i>G. duodenalis</i> en matrice eau (n=3).....	119
Tableau XI : Cibles de RT-qPCR pour <i>T. gondii</i>	125
Tableau XII : Résultats obtenus lors des essais de protocoles d'extraction d'ARN total d'oocystes de <i>T. gondii</i> , à partir de <i>M. edulis</i> et <i>D. polymorpha</i> (n=2).....	127
Tableau XIII : Résultats des modifications des étapes d'élution des oocystes (10 000) et de pré-extraction d'ARN à partir de la dreissène (n=2).	131
Tableau XIV : Détection des oocystes de <i>T. gondii</i> et <i>C. parvum</i> , et des kystes de <i>G. duodenalis</i> viables par RT-qPCR à partir de <i>M. edulis</i> et <i>D. polymorpha</i>	132
Tableau XV : Evaluation de la limite de détection des oocystes de <i>T. gondii</i> et <i>C. parvum</i> , et des kystes de <i>G. duodenalis</i> viables par RT-qPCR chez <i>M. edulis</i> et <i>D. polymorpha</i> (n=2).	134
Tableau XVI : Détermination de la limite de détection d'oocystes de <i>C. parvum</i> infectieux par CC-qPCR (LD ₉₅) en matrice eau.....	176
Tableau XVII : Cibles de qPCR pour <i>T. gondii</i>	186
Tableau XVIII : Nombre de souris infectées par <i>D. polymorpha</i> exposé à des oocystes de <i>T. gondii</i> (bioaccumulation et dépuration) présentant une séroconversion et le devenir des souris (mortalité avant 60 jours).	194
Tableau XIX : Nombre de souris infectées par <i>M. edulis</i> exposé à des oocystes de <i>T. gondii</i> (bioaccumulation et dépuration) présentant une séroconversion et le devenir des souris (mortalité avant 60 jours).	195
Tableau XX : Tableau de synthèse des différentes méthodes permettant d'étudier la viabilité et l'infectiosité des trois parasites dans l'eau ou dans les mollusques.	202

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
BSA	Bovine Serum Albumine
<i>C. parvum</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
CC-qPCR	Culture Cellulaire couplée à une quantitative Polymerase Chain Reaction
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cf.	confer
<i>D. polymorpha</i>	<i>Dreissena polymorpha</i>
DALY	Disability Adjusted Life Year.
dH ₂ O	distilled water
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EFSA	Autorité européenne de sécurité des aliments
EMA	Ethidium Monoazide Bromide
Euro-FBP	A European network for food-borne parasites
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FISH	Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridation
<i>G. duodenalis</i>	<i>Giardia duodenalis</i>
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
IAA	Industries AgroAlimentaires
ICR	Information Collection Rule
IFA	Immunofluorescence Assay
IMS-CG	Immuno Magnetic Separation <i>C. parvum</i> et <i>G. duodenalis</i>
InVS	Institut de Veille Sanitaire
IP	Iodure de Propidium
LMS	Lectin-Magnetic Separation
LOD	Limit Of Detection
<i>M. edulis</i>	<i>Mytilus edulis</i>

NASBA	Nucleic Acid Sequence Based Amplification
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OSPAR	protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est
pH	potentiel Hydrogène
PICT	Plate-forme en Imagerie Cellulaire et Tissulaire
PMA	Propidium MonoAzide
PNNS	Programme National Nutrition Santé
ppm	partie par million
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RASFF	Food and Feed Safety Alerts
réf.	Référence
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT	temperature ambiante
RT-qPCR	Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction
SAG	Surface AntiGen
SIDA	Syndrome De l'Immunodéficience Acquise
SVF	Sérum de Veau Foetal
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
US-EPA	United States Environmental Protection Agency
UV	UltraViolet
WGA	Wheat Germ Agglutinin
WHO	World Health Organization
ΔCq	réduction de signal en qPCR

PREAMBULE

La sécurité sanitaire des aliments est un problème essentiel de santé publique dans tous les pays. Les maladies d'origine alimentaires dues aux agents microbiens et aux polluants chimiques présents dans l'alimentation représentent de graves menaces pour la santé de milliards d'individus. L'intégration et le regroupement des industries alimentaires (IAA) ainsi que la mondialisation du commerce de ces aliments modifient les caractéristiques de la production et de la distribution des aliments. La distribution des produits alimentaires s'effectue sur des distances beaucoup plus importantes qu'autrefois, créant les conditions nécessaires à l'extension des épidémies d'origine alimentaire. Dans les pays développés, la part du budget alimentaire consacrée à des aliments préparés en dehors du foyer peut atteindre 50%. Toutes ces transformations conduisent à des situations dans lesquelles une source unique de contamination peut avoir des conséquences très étendues (FAO/OMS, 2003). De plus, l'engouement du consommateur pour les aliments crus ou peu cuits (sushis, sashimis...) et l'importation de fruits frais exotiques tout au long de l'année dans les pays industrialisés, en provenance de pays dans lesquels certains micro-organismes sont endémiques, contribuent aussi à augmenter le risque de transmission des maladies par les aliments (Ho *et al.*, 2002 ; Orlandi *et al.*, 2002). Les produits frais irrigués par des eaux potentiellement contaminées sont les denrées alimentaires les plus à risque.

Les risques liés aux microorganismes pathogènes d'origine alimentaires sont connus depuis des décennies. Les bactéries (*Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*...) ont été très largement étudiées et plus récemment, les virus entériques (virus de l'hépatite A, les norovirus...) ont émergé. Si *Norovirus* et *Campylobacter* sont parmi les microorganismes les plus fréquents qui causent des diarrhées, les parasites sont également des contributeurs majeurs, responsables de près de 104 millions de cas de diarrhées dans le monde en 2010, dont une majorité est due aux protozoaires, principalement *Cryptosporidium* spp. (WHO, 2015).

Ce travail est issu de la coopération entre le pôle ACTALIA Sécurité des aliments, un centre d'expertise en agroalimentaire, et une équipe de recherche universitaire (ESCAPE EA7510, Universités de Reims Champagne-Ardenne et Rouen), associés au sein d'une unité mixte technologique intitulée : « Protorisk : évaluation du risque lié aux protozoaires *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* et *Giardia* depuis la production primaire (fruits, légumes, mollusques) jusqu'aux consommateurs ». C'est donc ces trois protozoaires, et notamment *Toxoplasma* et *Cryptosporidium*, qui seront à la base de ce travail.

Les programmes de sécurité sanitaire des aliments privilégient de plus en plus une approche dite de la ferme à la table ou de la fourche à la fourchette, en tant que méthode efficace de réduction des dangers d'origine alimentaire. Cette méthode holistique de maîtrise des risques d'origine alimentaire prend en considération chacun des maillons de la chaîne, depuis la matière première jusqu'à la consommation. La matière première peut être contaminée par des eaux d'irrigation contenant les formes de résistance de ces protozoaires, c'est pourquoi nous avons développé des techniques applicables à cette matrice « simple ». Parmi les matrices alimentaires « complexes », nous avons choisi de nous focaliser sur deux espèces de mollusques. La première est la moule bleue, *Mytilus edulis*, espèce marine consommable pouvant être responsable de contamination de l'homme alors que la seconde, *Dreissena polymorpha*, appelée moule d'eau douce, n'est pas comestible mais est utilisée en surveillance environnementale, notamment des masses d'eau (Graczyk *et al.*, 2003; Palos Ladeiro *et al.*, 2014). Si la simple détection d'un pathogène au niveau de la ressource ou au niveau des eaux d'irrigation est incontournable dans l'évaluation de l'exposition aux parasites dans les aliments, la connaissance du caractère viable ou non du pathogène est également importante. En outre, la distinction entre parasite viable et infectieux s'impose puisque qu'un parasite viable n'est pas forcément infectieux, c'est le cas notamment pour les oocystes non sporulés dans la toxoplasmose.

Les méthodes développées doivent pouvoir être transférées aux IAA, et doivent donc être faciles à mettre en place et accessibles. C'est pourquoi nous avons essayé de prioriser les techniques de biologie moléculaire quand cela était possible, afin de caractériser la viabilité mais aussi le pouvoir infectieux des trois protozoaires, que ce soit sur une matrice simple, l'eau ou sur une matrice complexe, les mollusques.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

L'introduction de ce mémoire de thèse s'articule en cinq parties. Dans une première partie, la thématique de sécurité sanitaire sera présentée en focalisant sur les impacts sociaux, économiques et sanitaires puis sur la réglementation dans le secteur de l'agroalimentaire. Dans une seconde partie, nous verrons les trois parasitoses (toxoplasmose, la cryptosporidiose et la giardiose) transmises par l'alimentation, les formes infectieuses des parasites et leur résistance aux stress. Dans une troisième partie, nous étudierons la transmission environnementale des parasites *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis*. Puis, les différentes méthodes permettant d'analyser les trois parasites dans les denrées alimentaires seront détaillées, associées à un état de l'art sur la viabilité et l'infectiosité pour ces protozoaires. Enfin, la stratégie développée au cours de la thèse sera présentée.

1. Sécurité sanitaire : les conséquences sur les filières et la gestion publique du risque

1.1. Les impacts sociaux, économiques et sanitaires

La sécurité sanitaire des aliments est l'une des principales priorités de santé publique aux niveaux national, communautaire et international. Durant ces 25 dernières années, de nombreuses crises sanitaires d'origine alimentaire ont eu lieu : la maladie de la vache folle (Oosterveer, 2002), la crise liée à la dioxine (Dujardin *et al.*, 2000), la fièvre aphteuse (Sharley et Craven, 2001), les infections à *Escherichia coli* (INVS, 2005) ... Selon l'OMS, chaque année une personne sur 10 s'intoxique en consommant des aliments contaminés, et 420 000 en meurent et les maladies diarrhéiques entraînent 230 000 décès par an.

Les toxi-infections alimentaires résultent de la consommation d'aliments contaminés par des toxines produites par des micro-organismes spécifiques ou par la présence de micro-organismes infectieux. En France, une toxi-infection alimentaire collective est une maladie à déclaration obligatoire. Elle est définie par l'apparition d'au moins deux cas groupés d'une symptomatologie similaire, en générale gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire (Delmas *et al.*, 2006). En 2016, 4 786 toxi-infections d'origine alimentaire et hydrique ont été signalées en Europe, affectant 49 950 personnes, dont 3 869 (7,7%) ont été hospitalisées et 20 sont décédées (EFSA et ECDC, 2017). Parmi les agents pathogènes humains impliqués, les bactéries représentent la principale cause des infections et

des intoxications alimentaires (soit 33,9%) avec *Salmonella* (22,3%), *Campylobacter* (9,6%) et *Escherichia* (0,9%). Les bactéries sont suivies par les virus entériques (9,8%), principalement représentés par les *Norovirus* (7,9%), désormais plus fréquemment détectés, notamment en raison de la publication d'une norme pour leur détection/quantification des aliments (ISO 15216-1 :2013, 15216-2 :2013). Du point de vue de la sécurité des aliments, les parasites n'ont généralement pas bénéficié du même niveau d'attention que les autres risques biologiques et chimiques d'origine alimentaire. Ils ont souvent été négligés. Cependant, depuis quelques années le risque parasitaire commence à susciter un réel intérêt de la part des autorités sanitaires (Robertson *et al.*, 2013). En 2016, les parasites ont été incriminés dans 0,4% des toxi-infections d'origine alimentaire. Cependant, ce nombre de cas est sûrement sous-estimé, étant donné que les parasites ne sont pas recherchés et que pour un très grand nombre d'épidémies alimentaires (36%), l'agent pathogène responsable n'est pas identifié (EFSA et ECDC, 2017).

Outre leurs impacts sanitaires, les maladies infectieuses d'origine alimentaire ont d'importantes conséquences économiques et sociales. La prise en charge des malades est coûteuse. Aux Etats-Unis, le coût des toxi-infections alimentaires représentent respectivement 398, 45 et 35 millions de dollars par an pour *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* et *Giardia duodenalis* (Collier *et al.*, 2012 ; Karanis *et al.*, 2007). Les enjeux économiques sont aussi très importants pour les entreprises concernées par des crises sanitaires, les rappels de produit entraînant des pertes conséquentes. En 2005, lors d'une épidémie à *E. coli* dans les steack hachés, trois lots de viande ont été rappelés représentant environ 30 tonnes de viande. Plus largement, l'ensemble de la filière a subi la méfiance des consommateurs. Les secteurs de production, transformation mais aussi la restauration collective ont notamment été affectés par une baisse de la consommation qui a provoqué parfois leur fermeture.

D'après l'EFSA (2006), 42% des consommateurs pensent que les aliments qu'ils mangent sont néfastes pour leur santé. Ces dernières années, la médiatisation accrue des épidémies et des différents scandales alimentaires, ont contribué à une plus forte sensibilisation des consommateurs en termes de sécurité des aliments (Hugas *et al.*, 2007).

1.2. La réglementation dans le secteur de l'agroalimentaire

Dans le cadre de la protection des consommateurs, des normes sanitaires relatives aux denrées ont été définies en Europe et sont applicables dans les États membres. La maîtrise sanitaire des aliments se traduit ainsi sur le territoire national par une stricte application des évolutions réglementaires tout au long de la chaîne alimentaire. Suite aux crises sanitaires, la législation alimentaire européenne a été profondément remaniée. Elle trouve son origine dans le Livre blanc de la Commission sur la sécurité alimentaire. De nouvelles règles (responsabilité des opérateurs, traçabilité) sont entrées en vigueur le 1er janvier 2005 et la nouvelle réglementation relative à l'hygiène des aliments est entrée en application le 1er janvier 2006. Le paquet hygiène concerne toutes les étapes de la filière agroalimentaire : la production primaire (animale et végétale), la transformation, le transport, la distribution jusqu'aux consommateurs mais aussi les métiers de bouche (approche « de la fourche à la fourchette »). La qualité des produits agroalimentaires français s'appuie sur des contrôles sanitaires obligatoires et rigoureux, une surveillance continue avec des outils d'analyse (autocontrôles) et l'investissement de tous les intervenants de la chaîne alimentaire, les entreprises, les fournisseurs d'ingrédients ou d'emballages mais aussi les distributeurs.

Selon cette réglementation, les exploitants du secteur alimentaire doivent mettre en place des procédures obligatoires basées sur les principes de l'HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) et le recours aux guides de bonnes pratiques d'hygiène est fortement encouragé. Ces guides d'application volontaire, rédigés par les professionnels et validés par l'administration, ont pour vocation à aider les professionnels à respecter les règles générales d'hygiène et les principes HACCP.

Du point de vue microbiologique, le règlement (CE) 2073/2005, modifié par le Règlement (CE) n°1441/2007, définit deux types de critères microbiologiques qui concernent la sécurité et l'hygiène des procédés. Les critères de sécurité définissent « l'acceptabilité d'un produit ou d'un lot » et sont applicables aux produits mis sur le marché jusqu'à la fin de leur durée de consommation. Ces critères sont établis selon les catégories de denrées alimentaires et concernent des bactéries pathogènes (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *E. coli* ...) et des toxines (histamine). Les critères d'hygiène des procédés caractérisent « l'acceptabilité du fonctionnement du procédé de production » et fixent une valeur indicative de contamination dont le dépassement exige des mesures correctives pour maintenir l'hygiène du procédé. Ils ne sont pas applicables aux produits mis sur le marché et ne permettent donc pas d'émettre

des conclusions sur la conformité d'un produit. Le paquet hygiène recommande de prendre en considération tous les micro-organismes présents et capables d'affecter la santé des consommateurs, cependant à ce jour aucune réglementation n'impose par exemple la recherche des protozoaires dans les aliments. Le manque de méthode standardisée pour extraire puis détecter les parasites est probablement une des raisons principales.

2. Les parasitoses transmises par l'alimentation

Un classement des parasites responsables des épidémies d'origine alimentaire prenant en compte différents critères a été établi (FAO/OMS, 2014). *T. gondii* suivi par *C. parvum* sont respectivement à la 4^{ème} et 5^{ème} position et *G. duodenalis* est classé à la 11^{ème} position. Ces trois protozoaires sont principalement transmis à l'Homme suite à la consommation d'aliments ou d'eau souillée (Slifko *et al.*, 2000). Les formes environnementales (oocystes ou kystes) sont excrétées dans l'environnement en grande quantité par les hôtes infectés, résistent aux conditions environnementales et peuvent donc persister longtemps dans l'environnement. Depuis 1990, *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis* ont été incriminés dans de nombreuses épidémies d'origine alimentaire ou hydrique (Baldursson et Karanis, 2011 ; Robertson et Chalmers, 2013).

En 2016, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* et *Giardia duodenalis* ont été classés parmi les dix parasites d'origine alimentaire les plus importants en Europe (**Figure 1**) et sont largement disséminés à travers le monde entier. L'eau, les fruits et les légumes sont les principaux vecteurs de contamination par ces trois protozoaires. En Europe de l'ouest, *Toxoplasma gondii* et *Cryptosporidium parvum* sont identifiés comme les deux premiers parasites d'origine alimentaire à considérer.

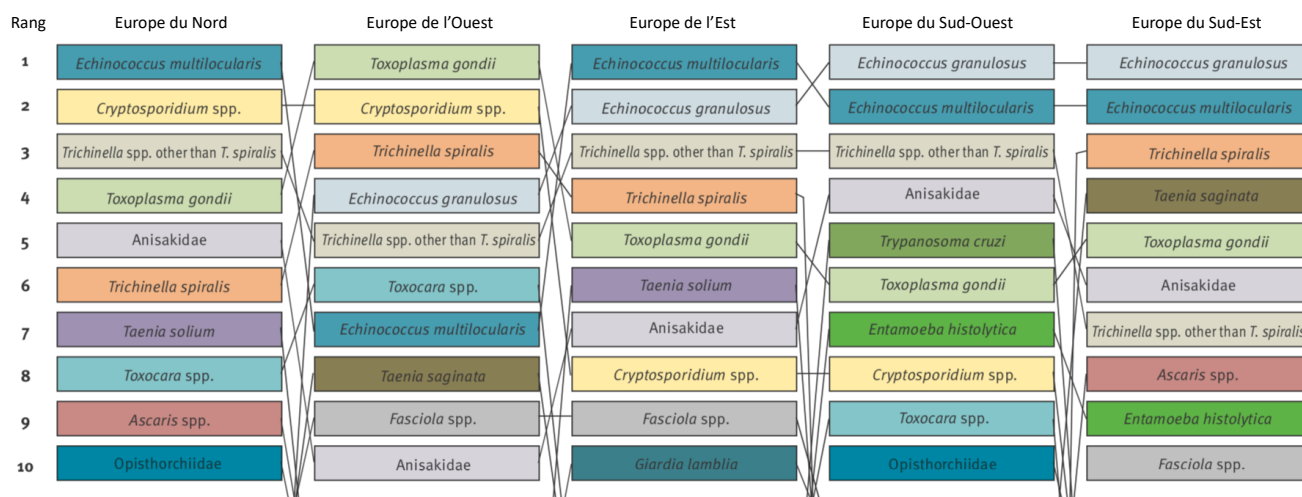


Figure 1 : Comparaison du classement des parasites d'origine alimentaire dans différentes parties de l'Europe sur la base des critères Euro-FBP en 2016.

Source : Bouwknegt et al., 2018.

Chaque année à l'échelle mondiale, 1,9 millions de nouveaux cas de toxoplasmose congénitale sont répertoriés entraînant la perte d'environ 1,2 millions de DALY (Torgerson et Mastroiacovo, 2013). En 2010, *Cryptosporidium* a été responsable de 8,6 millions de cas lié à l'alimentation causant 48 000 morts et une perte de 4,2 millions de DALY (Khalil *et al.*, 2018) et 171 000 de DALY pour *Giardia* (Torgerson *et al.*, 2015).

2.1 La toxoplasmose

La toxoplasmose est l'une des maladies parasitaires les plus répandue dans le monde avec plus d'un tiers de la population adulte mondiale qui possède des anticorps contre *T. gondii* (Tenter *et al.*, 2000). A ce jour, le genre *Toxoplasma* possède une seule espèce, *gondii* (Sabin, 1939), qui regroupe de nombreux isolats dont la plupart sont regroupés en trois génotypes multilocus principaux (type I, II et III).

La prévalence de la toxoplasmose est très variable en fonction de l'âge (Wilking *et al.*, 2016), des habitudes alimentaires, de l'hygiène, de la présence de félinés, du climat mais aussi des pays. Entre 2013 et 2015, la séroprévalence était supérieure à 80 % en Ethiopie (Abamecha et Awel, 2016) alors qu'elle était comprise entre 30 et 40% au Cameroun (Wam

et al., 2016) et en Thaïlande (Van Enter *et al.*, 2017), 24,1% en Arabie Saoudite (Aqeely *et al.*, 2014). En France, chez les femmes enceintes, la séroprévalence baisse depuis une cinquantaine d'années. Estimée à 80% en 1960 (Desmonts *et al.*, 1965a), elle est passée à 63,3% en 1980 (Papoz *et al.*, 1983). Entre 1995 et 2010 elle est passée de 54,3% (Ancelle *et al.*, 1996) à 36,7% (Tourdjman *et al.*, 2015) causant 200 000 à 300 000 nouveaux cas chaque année (AFSSA, 2005). La réduction de la séroprévalence de la toxoplasmose au cours des années est liée à l'amélioration des mesures d'hygiène alimentaire, tant au niveau individuel qu'au niveau industriel, au changement des habitudes alimentaires avec une augmentation de la cuisson à cœur des viandes chez les femmes enceintes et une forte diminution de la consommation de viandes ovines (30%) (FranceAgriMer, 2012). La prévalence est variable aussi selon les régions, avec de fortes prévalences observées en Ile-de-France, en Aquitaine et en Outre-Mer (Tourdjman *et al.*, 2015).

Seulement 24 épidémies de toxoplasmose, dont 17 liées aux aliments et cinq liées à l'eau, ont été recensées dans le monde de 1965 à 2010 (Anses, 2011b). La principale cause est liée au fait que la maladie est le plus souvent asymptomatique et échappe au diagnostic. Chez les individus immunocompétents, la toxoplasmose est asymptomatique dans environ 80 % des cas (Dardé et Peyron, 2002). Cependant, il peut y avoir des adénopathies, qui sont indolores mais volumineuses, de la fièvre (Jones *et al.*, 2014), plus rarement des atteintes oculaires (Couvreux et Thulliez, 1996) et exceptionnellement des formes graves (pulmonaires, viscérales, neurologiques ou cutanées). Chez les individus immunodéprimés (atteints de SIDA, greffés ou sous traitement chimiothérapeutique), l'absence d'immunité cellulaire aggrave les conséquences de la réactivation d'une toxoplasmose antérieure par rupture d'un kyste ou lors d'une transplantation d'organe contenant des bradyzoïtes (Chehrazi-Raffle *et al.*, 2015). Le système immunitaire du patient n'est plus capable de limiter la propagation de *T. gondii* dans l'organisme et les symptômes prennent une proportion beaucoup plus importante. Il peut y avoir des atteintes cérébrales avec notamment des abcès cérébraux, des atteintes pulmonaires, des atteintes oculaires et des infections disséminées pouvant entraîner la mort du patient (Dardé, 2008 ; Lewis *et al.*, 2015).

T. gondii peut passer la barrière placentaire et infecter le fœtus étant ainsi responsable de la toxoplasmose congénitale. La gravité de la toxoplasmose congénitale est principalement liée à l'âge gestationnel au moment de l'infection du fœtus (Remington *et al.*, 2006 ; McAuley 2014). En France, la toxoplasmose congénitale touche environ 300 enfants par an (Davenel *et al.*, 2010). Dans la priorisation des maladies parasitaire en Europe, les deux présentations

(toxoplasmose acquise et toxoplasmose congénitale) ont été évaluées (Bouwknegt *et al.*, 2018).

L'Homme peut être contaminé par les trois stades infectieux de *T. gondii* (sporozoïtes provenant d'oocystes, bradyzoïtes et tachyzoïtes) selon plusieurs modes dont le principal est l'ingestion (**Figure 2**).

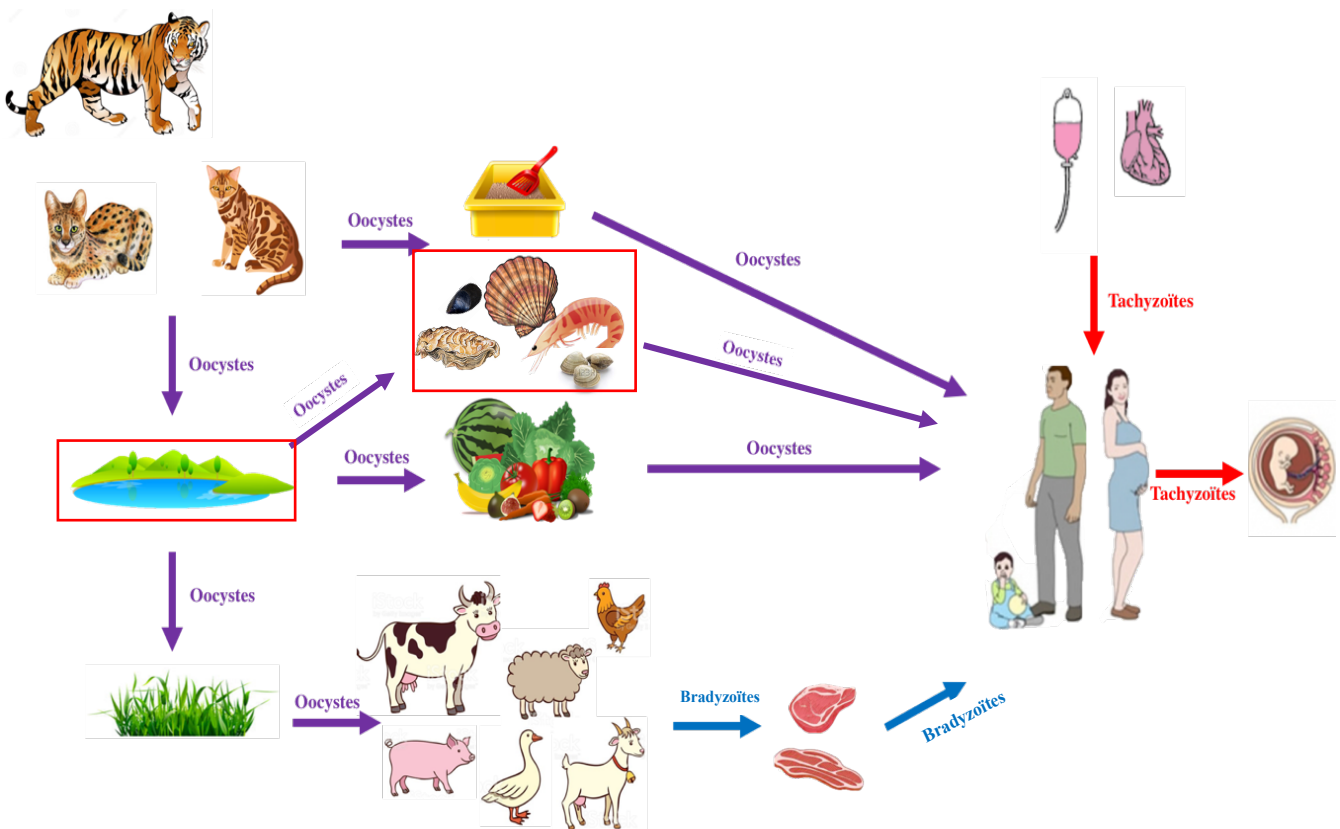


Figure 2 : Différentes sources de contamination de l'Homme par *T. gondii*.

Les encadrés rouges indiquent les matrices d'intérêt étudiés dans le mémoire de thèse.

Source : Image adaptée de Esch et Petersen, 2013.

T. gondii peut se retrouver sous forme de kystes dans les tissus musculaires des hôtes intermédiaires et se différencier en bradyzoïtes qui peuvent infecter l'Homme lors de la consommation de viande crue ou peu cuite (Desmonts *et al.*, 1965b ; Condoleo *et al.*, 2018). L'infection par les tachyzoïtes peut avoir lieu lors de transmission transplacentaire lorsqu'une femme se contamine pendant sa grossesse et être à l'origine d'une toxoplasmose congénitale (Remington *et al.*, 2001). Ils peuvent également infecter l'Homme par inoculation

conjonctivale lors de manipulation en laboratoire (Herwaldt, 2001), lors de transfusion de sang (Beauvais *et al.*, 1976 ; Nelson *et al.*, 1989) ou lors d'ingestion de lait de chèvre ou brebis non pasteurisé (Ossani *et al.*, 2017 ; Basnet *et al.*, 2009 ; Skinner *et al.*, 1990). N'étant pas détruits par les sucs gastriques, les oocystes sont responsables de la contamination des herbivores et de l'Homme indirectement *via* la consommation de fruits, de légumes (Ekman *et al.*, 2012) crus mal lavés et d'eau (Jones et Dubey, 2010, Balasundaram *et al.*, 2010). La transmission des oocystes de *T. gondii* est aussi possible à partir de crustacés (moules, palourdes, huîtres...) consommés crus ou peu cuits (Ghozzi *et al.*, 2017 ; Ribeiro *et al.*, 2015 ; Staggs *et al.*, 2015). C'est cette forme parasitaire, qui commence à être reconnue comme responsable d'infection (Boyer *et al.*, 2011), qui nous intéressera dans ce travail.

2.2 La cryptosporidiose et la giardiose

La cryptosporidiose est une parasitose cosmopolite. Elle a été signalée dans 106 pays situés en Afrique, dans le Pacifique, en Europe, au Moyen-Orient, en Asie, aux Caraïbes, en Amérique du Nord, Centrale et du Sud à l'exception de l'Antartique (Ripert et Guyot, 2003 ; Fayer et Xiao, 2008). Même si les données de prévalence sont actuellement incomplètes, le nombre d'infection est plus élevé dans les pays en développement que dans les pays développés (Cacciò et Widmer, 2014). Parmi les 27 espèces de cryptosporidies décrites à ce jour, les hôtes sont variables touchant aussi bien les mammifères, les reptiles, les oiseaux, les amphibiens et les poissons (**Tableau I**) (Ryan *et al.*, 2014). Trois espèces sont pathogènes pour l'Homme immunocompétent : *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis* et *Cryptosporidium meleagridis*, les deux premiers étant de loin les plus fréquents. En revanche, la barrière d'espèce est levée chez les immunodéprimés qui peuvent être infectés par de nombreuses autres espèces du genre *Cryptosporidium* (Ryan *et al.*, 2015). Avant 1982 et l'apparition du syndrome d'immunodéficience acquise, seule une dizaine de cas avait été rapportée. Après les épidémies d'origine hydrique survenues aux Etats-Unis (McKenzie *et al.*, 1994) et au Royaume-Uni (Smith *et al.*, 2006), un regain d'attention s'est porté sur cette parasitose.

Depuis, d'autres épidémies ont été rapportées. Alors que l'impact de cette parasitose semble actuellement décroître chez les malades atteints du SIDA en raison de l'utilisation de la tri-thérapie dans les pays industrialisés, elle n'en demeure pas moins un problème de santé publique. Cependant, dans les pays en voie de développement, où l'accès à la tri-thérapie est impossible, la situation reste préoccupante (Pozio et Morales, 2005). Le parasite a aussi été

classé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme pathogène ayant une importance en santé publique du fait qu'il soit capable d'infecter à de très faibles doses et de sa grande résistance aux traitements conventionnels de l'eau.

Tableau I : Espèce de *Cryptosporidium* validées et leurs hôtes majoritaires.

Source : Ryan et al., 2014 et 2015.

Espèce	Hôtes principaux	Espèce retrouvée chez l'Homme	Espèce	Hôtes principaux	Espèce retrouvée chez l'Homme
<i>C. andersoni</i>	Bovin	Oui	<i>C. molnari</i>	Poisson (dorade)	Non rapporté
<i>C. baileyi</i>	Poulet	Oui	<i>C. muris</i>	Souris	Oui
<i>C. bovis</i>	Bovin	Oui	<i>C. parvum</i>	Homme, bovin, mouton	Oui
<i>C. canis</i>	Chien	Oui	<i>C. ryanae</i>	Bovin	Non rapporté
<i>C. cuniculus</i>	Lapin	Oui	<i>C. serpentis</i>	Serpent, lézard	Non rapporté
<i>C. erinacei</i>	Hérissons, cheval	Oui	<i>C. tyzzeri</i>	Souris	Oui
<i>C. fayeri</i>	Kangourou	Oui	<i>C. suis</i>	Sanglier	Oui
<i>C. felis</i>	Chat	Oui	<i>C. scrofarum</i>	Sanglier	Oui
<i>C. fragile</i>	Crapaud	Non rapporté	<i>C. ubiquitum</i>	Mouton, chèvre	Oui
<i>C. galli</i>	Poulet	Non rapporté	<i>C. varanii</i>	Lézard	Non rapporté
<i>C. hominis</i>	Homme	Oui	<i>C. viatorum</i>	Homme	Oui
<i>C. huwi</i>	Poisson (Guppy)	Non rapporté	<i>C. wrairi</i>	Cochon d'inde	Non rapporté
<i>C. macropodum</i>	Kangourou	Non rapporté	<i>C. xiaoi</i>	Mouton, chèvre	Oui
<i>C. meleagridis</i>	Dindon, Homme	Oui			

Dans la majorité des cas, l'incubation est généralement de deux à 10 jours avant le déclenchement d'une gastro-entérite dont l'évolution est habituellement spontanément résolutive en deux semaines (Ripert et Guyot, 2003). En cas de cryptosporidiose, ce sont les diarrhées et les douleurs abdominales qui entraînent les patients à aller consulter un médecin, ce qui mène à un diagnostic de laboratoire. Les nausées, les vomissements et la fièvre (< 39°C) correspondent à d'autres caractéristiques cliniques de moins grande ampleur (Chalmers et Davies, 2010). L'incubation peut durer plusieurs semaines voire même plusieurs mois

avant le déclenchement d'une diarrhée, profuse, aqueuse, continue plusieurs mois ou survenant par épisodes après des rémissions. D'autres symptômes comme des problèmes de malabsorption, désordre hydrique ou une perte de poids peuvent surgir et conduire au décès des patients (Widmer et Sullivan, 2012 ; Striepen, 2013). Chez les enfants, notamment ceux victimes de malnutrition, la cryptosporidiose est plus sévère et se manifeste par une importante perte de poids, un retard de croissance et une déshydratation.

Parmi les espèces du genre *Giardia*, seul *G. duodenalis* est connu pour affecter l'Homme et donc représenter un problème de santé publique. *G. duodenalis* est un protozoaire flagellé appartenant à l'ordre des *Diplomonadida* (Adam, 2001). La caractérisation moléculaire de ce genre a indiqué l'existence de huit assemblages différents (A à H). Les assemblages A et B infectent la plus grande variété d'espèces d'hôtes dont l'Homme (Monis *et al.*, 1996). Les autres assemblages n'infectent pas l'Homme et sont spécifiques de leurs hôtes. *G. duodenalis* est un parasite de répartition mondiale. Le taux d'infection par *Giardia* chez les humains est généralement plus faible dans les pays développés, 4% en Belgique (Geurden *et al.*, 2009), 1,5% en Allemagne (Sagebiel *et al.*, 2009), par rapport aux pays en développement, 23,8% au Pérou (Cooper *et al.*, 2010), 40,7 % en Ouganda (Johnston *et al.*, 2010) et 23,7 % en Malaisie (Mahdy *et al.*, 2009). Dans les pays en développement, les infections sont souvent associées à de mauvaises conditions sanitaires, à une mauvaise qualité de l'eau et à un surpeuplement (Younas *et al.*, 2008), alors que dans les pays développés, les cas sont généralement associés aux voyages et à l'immigration internationale (Ekdahl et Andersson, 2005).

Tout comme la toxoplasmose, la giardiose est le plus souvent asymptomatique (Favennec *et al.*, 2006 ; Nikolić *et al.*, 2011) chez les patients immunocompétents. Les personnes asymptomatiques peuvent excréter des kystes infectieux qui permettront de véhiculer la transmission de la maladie. Dans les autres cas, les symptômes apparaissent généralement entre une et trois semaines. Comme pour la cryptosporidiose, les symptômes associés à la giardiose sont principalement des troubles d'ordre digestifs. Cette maladie se caractérise par des diarrhées modérées, des douleurs abdominales et des nausées. Les personnes immunodéprimées sont plus susceptibles de développer une anorexie ou une déshydratation chronique (Carcamo *et al.*, 2005 ; Onbasi *et al.*, 2005). Chez les enfants, les symptômes observés sont des diarrhées grasses et abondantes, des problèmes de malabsorption des nutriments (Quihui-Cota *et al.*, 2008) entraînent des retards de croissance (Prado *et al.*, 2005). Sans traitement, les symptômes peuvent soit disparaître spontanément en

huit jours ou soit devenir chronique avec l'apparition de signe de malabsorption (Chochillon *et al.*, 1986) et une perte de poids.

Les différents modes de contamination de l'Homme par les oocystes de *C. parvum* et les kystes *G. duodenalis* sont relativement similaires (**Figure 3**). Ils sont généralement transmis indirectement par l'eau de boisson ou l'eau de baignade (eau de rivière ou de lac, piscine) à cause des excréments d'animaux infectés qui atteignent ces sources d'eau (Mattsson *et al.*, 2008 ; Xiao *et al.*, 2018). Lorsqu'un accident de contamination fécale se produit dans une piscine, les baigneurs sont exposés à de nombreux agents pathogènes mais la probabilité de transmission de la cryptosporidiose est supérieure à celle des autres pathogènes (dont la giardiose) car *C. parvum* résiste au traitement par le chlore et il n'est pas efficacement éliminé par les systèmes de filtration. *G. duodenalis* a fait l'objet de nombreuses études et notamment dans les eaux usées ou les eaux de surface au Canada (Metro Vancouver, 2009, Van Dyke *et al.*, 2012, Nova Scotia Environment, 2013, Prystajec *et al.*, 2014) ou les eaux souterraines au Canada et aux Etats-Unis (Hynds *et al.*, 2014).

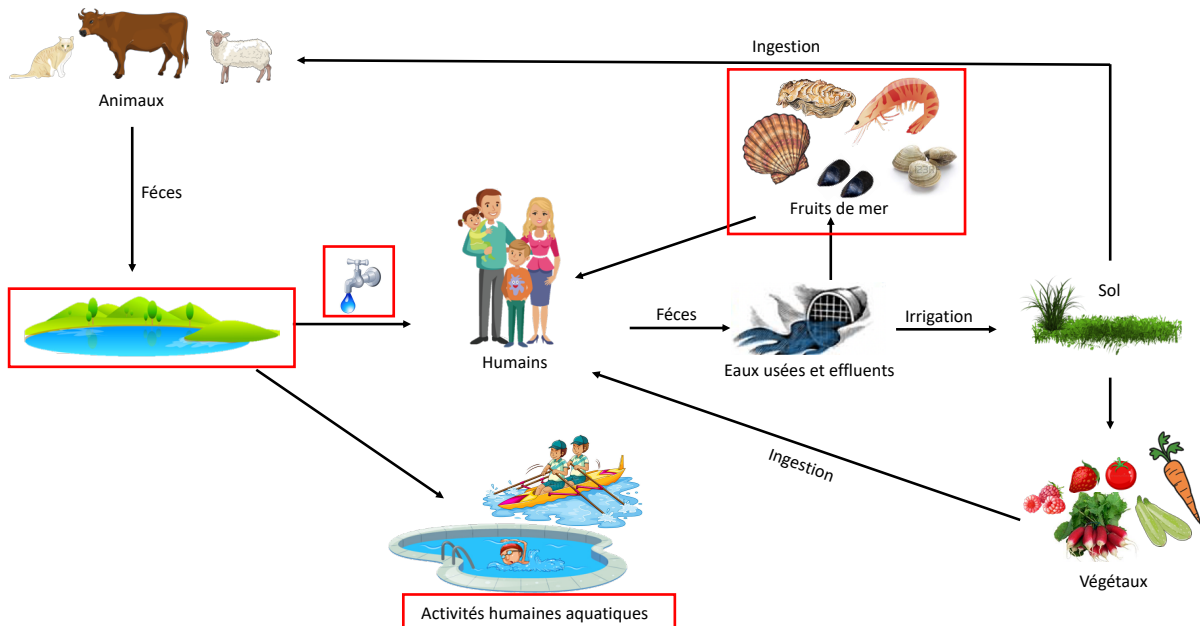


Figure 3 : Cycle de transmission des oocystes de *C. parvum* et kystes de *G. duodenalis*.

Les encadrés rouges indiquent les matrices d'intérêt du mémoire de thèse. *Source* : Image adaptée de Armon et Cheruti, 2012.

La transmission peut aussi être d'origine alimentaire. Aux États-Unis, 8% des toxi-infections alimentaires d'origine nationale sont dues à *Cryptosporidium spp.* (Scallan *et al.*,

2011). Les oocystes et les kystes peuvent entrer dans la chaîne alimentaire de différentes manières. Les aliments ou le matériel peuvent être contaminés directement par des personnes infectées ou par des manipulateurs d'aliments qui sont en contact avec des personnes infectées (Dixon, 2015). Cela peut se produire tout au long de la chaîne alimentaire. Le lavage des produits frais et de l'équipement avec de l'eau contaminée est une autre voie de transmission, tout comme l'irrigation des potagers ou encore la production de coquillage en eau contaminée. Dans le monde entier, les oocystes de *C. parvum* et les kystes de *G. duodenalis* sont retrouvés dans les aliments non transformés et souvent consommés crus comme les végétaux (la salade, le radis, la carotte, le basilic...) (Ahmad *et al.*, 2016 ; Mohamed *et al.*, 2016) ou encore les crustacés telles que moules, palourdes, coques, huîtres (Robertson et Gjerder, 2008 ; Tei *et al.*, 2016 ; Coupe *et al.*, 2018).

La transmission inter-humaine de *Cryptosporidium* et *Giardia* est aussi possible et favorisée dans les zones surpeuplées, les collectivités familiales, hospitalières ou encore dans les garderies ou les écoles (Thompson, 2008 ; Dixon 2016, FAO / WHO 2014). Cette transmission est favorisée par les porteurs sains.

2.3 Les formes infectieuses

2.3.1. Les oocystes de *Toxoplasma gondii*

Comme indiqué dans le paragraphe 2.1, *T. gondii* présente trois stades infectieux mais seule, la forme environnementale, l'oocyste, a été étudiée dans le cadre de ce travail.

Les oocystes représentent une forme de résistance et de contamination issue de la multiplication sexuée qui n'existe que chez les félinés en particulier le chat. Ils sont initialement non sporulés (10 à 12 μm de diamètre (Dubey *et al.*, 1998), c'est à dire qu'ils ne contiennent pas de sporozoïtes et ne sont donc pas infectieux. Ils sont émis lors de la phase aiguë de l'infection dans les fèces des félinés. C'est uniquement après sporulation dans le milieu extérieur, un à cinq jours après son excrétion à température ambiante (15-25°C) (Dubey *et al.*, 1998) qu'un oocyste non sporulé deviendra sporulé (11 μm de largeur sur 13 μm de longueur (Dubey *et al.*, 1998). Ce dernier est constitué de deux sporocystes (6 μm de largeur et 8 μm de longueur) qui renferment quatre sporozoïtes chacun, porteurs de l'information génétique (Ferguson *et al.*, 1979 ; Speer I 1998). Les sporozoïtes de *T. gondii* (**Figure 4**), de forme ovoïde (largeur : 2 μm et longueur : de 6 à 8 μm), sont présents au nombre de huit dans un oocyste sporulé.

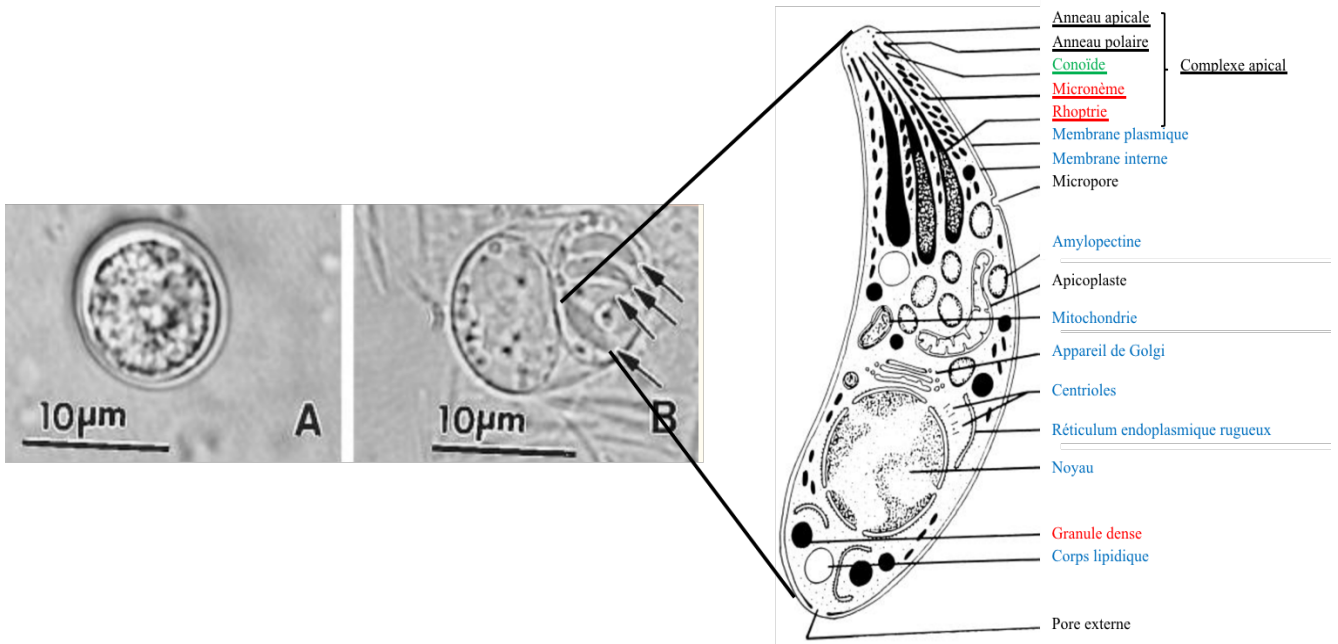


Figure 4 : Photo d'un oocyste et ultrastructure d'un sporozoïte de *T. gondii*.

(A) Oocyste non sporulé, (B) Oocyste sporulé contenant deux sporocystes qui renferment quatre sporozoïtes indiqués par des flèches noires. Le sporozoïte est composé d'organites sécrétoires spécifiques au parasite (**en rouge**), de structures cytosquelettiques inhabituelles (**en vert**), d'une structure en forme de cône au niveau apical, d'apicoplaste et des organites eucaryotes conventionnels (**en bleu**). Les structures caractéristiques du phylum des *Apicomplexa* sont soulignées. *Source* : image adaptée de Dubey *et al.*, 1998.

2.3.2 Les oocystes de *Cryptosporidium parvum*

De forme sphérique à ovoïde, les oocystes de *C. parvum* (**Figure 5**) ont un diamètre compris entre 4 et 5 μm (Fayer *et al.*, 2000). Chaque oocyste contient quatre sporozoïtes (4,9 x 1,2 μm), libres et mobiles, sans sporocyste contrairement aux oocystes de *T. gondii*. Chez *C. parvum*, le micropyle et les granules polaires présents chez les autres coccidies ne sont pas retrouvés. A l'un des pôles, une suture est visible sur la paroi, cette suture permet aux sporozoïtes de sortir de l'oocyste lors du phénomène d'excystation.

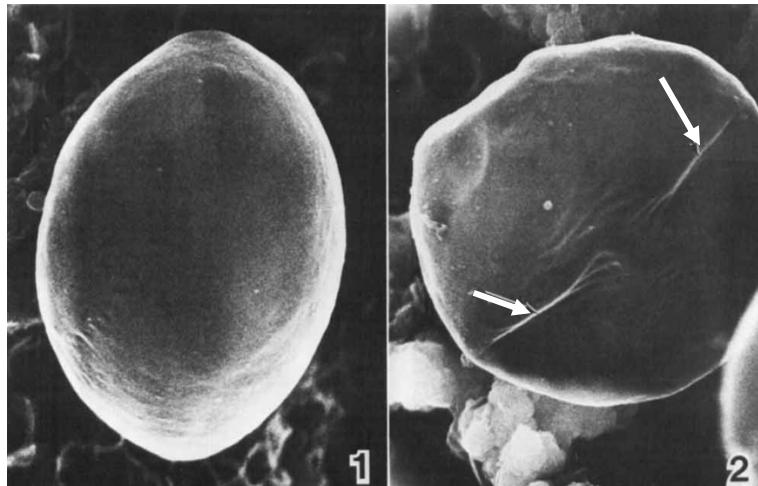


Figure 5 : Oocystes de *C. parvum* par microscopie électronique à balayage.

1. Oocyste mature intact (x 24 000); 2. Oocyste mature présentant des sutures sur la paroi (indiquées par des flèches blanches; x 22 000). Source : Reduker et Speer, 1985.

2.3.3 Les kystes de *Giardia duodenalis*

Au cours de son cycle parasitaire, *G. duodenalis* présente deux stades infectieux de structure différente : les trophozoïtes et les kystes (**Figure 6**). Seuls les kystes ont été étudiés dans ce travail de thèse.

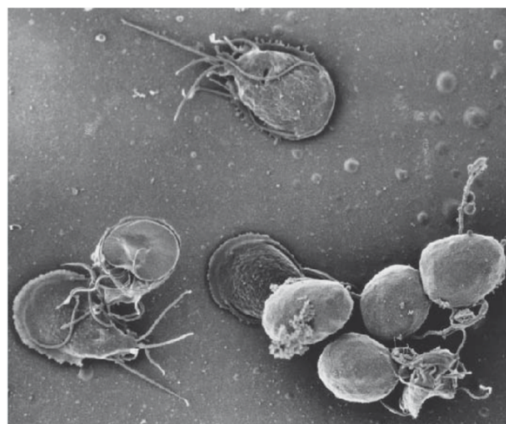


Figure 6 : Trophozoïtes et kystes de *G. duodenalis*.

Trophozoïtes (en haut et en bas à gauche) et kystes (en bas à droite) observés au microscope électronique à balayage. Source : © CDC/Dr Stan Erlandsen.

De forme ovoïde, les kystes (7-10 μm x 8 -12 μm) représentent la forme immobile résistante dans le milieu extérieur.

2.3.4 La résistance des formes environnementales

Les oocystes de *T. gondii* et de *C. parvum* et les kystes de *G. duodenalis* sont incapables de se multiplier dans l'environnement, mais ils résistent dans de nombreuses conditions environnementales souvent drastiques et peuvent conserver leur caractère infectieux.

2.3.4.1 Les traitements physiques

L'exposition directe aux rayons UV peut altérer la viabilité des oocystes sporulés de *T. gondii* (Dumètre *et al.*, 2008) mais ils ne sont pas totalement inactivés par des doses UV dépassant celles utilisées en traitement de l'eau ($\geq 500 \text{ mJ.cm}^{-2}$) (Wainwright *et al.* 2007a). Les oocystes de *T. gondii* sont aussi sensibles à de fortes températures. En effet, ils ne survivent que 32 jours à 35°C et ne restent infectieux que pendant 1h à 50°C et 1 minute à 60°C (Dubey, 1998). En revanche, un traitement thermique induit par radiofréquence (1 min à 60°C) n'inactive pas totalement les oocystes de *T. gondii* (Wainwright *et al.* 2010). De plus, les oocystes de *T. gondii* perdent leur infectiosité lors d'une conservation à sec (sans humidité) dès 24h (Dubey *et al.*, 1970a) ou lors d'un traitement ionisant à 0,5 kGy sur des végétaux (AFSSA, 2005).

Des études ont montré que les oocystes de *C. parvum* sont très sensibles à une exposition à de hautes températures sur un temps court : des oocystes maintenus 2 min à 64,2°C ou 1 min à 72,4°C perdent leur infectiosité *in vivo* (Harp *et al.*, 1996). En revanche, une exposition à de très basses température (7j à 10°C) conduit à une inactivation partielle des oocystes (67%). Seule la congélation à des températures extrêmes comme 45s à -60°C ou 20s à -75°C fait perdre aux oocystes leur pouvoir infectieux (Moriarty *et al.*, 2005). Par contre, 33% des oocystes sont toujours viables à -22°C pendant 21h (Robertson *et al.*, 1992). La dessiccation n'est pas un traitement totalement efficace car 3% des oocystes sont encore viables après 2h de dessiccation à température ambiante (Robertson *et al.*, 1992). Une réduction de l'infectiosité des oocystes de *C. parvum* a été observée sur des framboises dopées et traitées par des UV (4 J/cm²) (Le Goff *et al.*, 2015). Collins *et al.*, (2005), ont montré une réduction de l'infectivité de *C. parvum* lorsque les tissus d'huître sont exposés à

des micro-ondes de 1 s (43,2 °C), 2 s (54,0 °C) et 3 s (62,5 °C). Cependant, ce traitement altère les qualités organoleptiques (texture et couleur) de l'huître rendant le traitement inutilisable.

Les kystes de *G. duodenalis* sont quant à eux sensibles à la dessiccation (55°C) et à la congélation (-4°C) pendant une semaine et perdent leur infectiosité après 7 jours à 25°C (Erickson et Ortega, 2006). De plus, une réduction de la charge parasitaire est possible grâce à l'utilisation des rayonnements ultraviolets (400 J/m²) (Anses, 2011a).

2.3.4.2 Les traitements chimiques

Les procédés de désinfections par la chloration sont inefficaces sur les oocystes de *T. gondii* (Wainwright *et al.*, 2007b), qui ne sont pas totalement inactivés par l'ozone également (Wainwright *et al.* 2007b, Dumètre *et al.*, 2008). Une réduction d'au moins 2 log₁₀ de la viabilité a été détectée après traitement avec une solution à 10% de formaline ou 10% de Clorox® (Villegas *et al.*, 2010). Ces derniers sont inactivés au bout de 24h dans des mélanges d'acide sulfurique/dichromate, d'éthanol/acide acétique (Dubey, 1970a) ou dans de l'acide paracétique 5% (Ito *et al.*, 1975). Pourtant, les milieux acides (acide sulfurique à 2% ou bichromate de potassium à 2.5%) sont d'excellents milieux de sporulation et de conservation des oocystes de *T. gondii*. Les oocystes de *T. gondii* résistent moins à certains désinfectants basiques notamment à l'hydroxide d'ammonium 5% (Dubey *et al.*, 1970a), l'ammoniaque 5,5 % (Dubey, 2004).

De nombreux désinfectants classiques tel que le crésol, les dérivés iodés ou encore les dérivés de benzylkonium n'inhibent pas ou très peu l'infectiosité des oocystes de *C. parvum* (Campbell *et al.*, 1982, Peeters *et al.*, 1989 ; Korich *et al.*, 1990 ; Gyürék *et al.*, 1997). La viabilité des oocystes est altérée lors d'une exposition à de l'ammoniac à 3% (Liang et Keeley, 2012). Seul le dioxyde de chlore à 1,3 ppm, l'ammoniac à 5% ou le formaldéhyde à 10% sont efficaces pour détruire les oocystes de *C. parvum*. Les pH acides semblent plus favorables à la survie des oocystes comme le suggère la plus grande quantité d'oocystes retrouvée dans des sols de fermes au pH acide par rapport à des sols aux pH neutre et basique aux Etats-Unis (Barwick *et al.*, 2003).

Tout comme les oocystes de *T. gondii* et *C. parvum*, pour les kystes de *G. duodenalis*, il n'existe actuellement pas de données de résistance aux traitements chimiques sur d'autres matrices que l'eau. Il a été montré que les kystes de *G. duodenalis* sont 30 fois moins

résistants à l'ozone et 14 fois moins résistants au chlore par rapport à des concentrations identiques utilisées sur les oocystes de *C. parvum* (Korich *et al.*, 1990). Les désinfectants à base d'ammonium quaternaire sont efficaces. Ces derniers sont détruits en 1 minute à température ambiante pour des concentrations recommandées (Barr, 1998).

2.3.4.3 Les conditions environnementales

Dans l'eau, douce ou salée, les oocystes de *T. gondii* sont infectieux (Miller *et al.*, 2008) 54 mois à + 4°C (Dubey, 1998) et pendant 28 jours à -21°C (Frenkel et Dubey, 1973). Les oocystes de *T. gondii* peuvent survivre plus de 100 jours dans le sol sec (7,4%) et le sol humide (43,7%) (Lélu *et al.*, 2012), voir même plusieurs années. En effet, des études ont montré leur capacité à résister 18 mois dans les fèces de chats entre -20°C et 35°C (Frenkel et Dubey, 1973) et les oocystes sont capables de persister à la surface ou jusqu'à une profondeur de 10 cm (Dumètre et Dardé, 2003). Cette résistance est donc favorisée par les habitudes des chats à enterrer leurs fèces dans le sol limitant les effets délétères causés par les conditions climatiques (chaleur, sécheresse, rayonnement UV...). Dans les fèces, 30 à 60% des oocystes de *T. gondii* perdent leur infectiosité suite à une exposition au soleil (Yilmaz et Hopkins, 1972).

Tout comme pour les oocystes de *T. gondii*, la salinité de l'eau de mer n'a pas d'impact préjudiciable sur les oocystes de *C. parvum* qui sont toujours infectieux et qui peuvent survivent plus d'un an dans cet environnement (Fayer *et al.*, 1998b ; AFSSA, 2002). Certains oocystes résistent même à une forte salinité (35%) à 18 ° C pendant 40 jours (Freire-Santos *et al.*, 1999). La majorité des oocystes de *C. parvum* est viable quatre à douze mois dans l'eau ou dans un sol humide soumis à des variations naturelles de température (0 à 20°C). Cependant, la durée d'infectiosité passe à 3 mois pour des températures de 25°C et 30°C puis à une semaine pour une température de 35°C (Fayer *et al.*, 1998b). De façon générale, la durée de survie de cette forme de résistance diminue avec une augmentation de la température (Pokorny *et al.*, 2002 ; Li *et al.*, 2010). Les oocystes de *C. parvum* peuvent être préservés de la dessiccation dans la terre, les végétaux ou encore les matières fécales, qui augmentent l'imperméabilité de leur paroi (Robertson *et al.*, 1992). Ceci leur permet de résister plus longtemps dans le sol par rapport à l'eau et de créer un réservoir durable d'oocystes infestants.

D'après Fever (2012), dans l'eau potable, les kystes de *Giardia* sont infectieux pendant 14 jours entre 20°C et 28°C. Une survie plus longue a été observée dans l'eau de rivière, avec plus de trois mois de survie entre 0°C et 4°C et un mois entre 20°C et 28°C. Dans l'eau de mer, les kystes de *Giardia* ont la capacité de survivre pendant deux mois à 4°C. De plus, ils restent

infectieux pendant des mois dans les zones fraîches et humides et s'accumulent rapidement dans l'environnement. Dans le sol, l'infectiosité du kyste est seulement réduite de 10% après 49 jours à 4°C et totalement perdue après sept jours à 25°C.

3. Transmission environnementales de *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis*

3.1. Epidémies d'origine hydrique

Les excréments des animaux contaminent fréquemment l'eau utilisée pour la baignade, les loisirs, la distribution pour la consommation humaine et l'irrigation des cultures. D'après l'OMS, en 2015, 71% de la population mondiale ont accès à de l'eau potable, avec de fortes disparités entre les différentes régions et pays du monde. A l'échelle mondiale, au moins 2 milliards de personnes utilisent encore une source d'eau potable contaminée par des fèces, causant 502 000 décès dus à des diarrhées chaque année. La diarrhée reste la deuxième cause de mortalité, en particulier chez les enfants de moins de 5 ans (Bryce *et al.*, 2005 ; Jonhson *et al.*, 2010) et les parasites ont été identifiés comme principaux agents pathogènes des diarrhées d'origine hydrique.

L'ampleur de l'implication des parasites dans les épidémies d'origine hydrique mondiale entre le début des années 1900 et décembre 2016 a été examinée. Au cours de cette période, 905 épidémies ont été documentées dans le monde 325 entre le début de 1900 et 2004 (Karanis *et al.*, 2007), 199 entre janvier 2004 et décembre 2010 (Baldursson et Karanis, 2011) et 381 entre janvier 2011 et décembre 2016 (Efstratiou *et al.*, 2017). La majorité de ces épidémies a été signalée dans des pays développés d'Amérique du Nord et d'Europe, mais aussi en Australie et en Nouvelle-Zélande. Ces pays ont mis en place des systèmes de surveillance et de notification qui facilitent la diffusion auprès du public des données enregistrées et des rapports détaillés sur les foyers parasitaires d'origine hydrique (Efstratiou *et al.*, 2017). En revanche, les données épidémiologiques restent limitées pour les pays en développement, par exemple des régions d'Asie, d'Afrique et d'Amérique latine. Ceci est

principalement dû à l'absence de systèmes de documentation et l'utilisation de méthodes de détection inadéquates (Karanis *et al.*, 2007, Baldursson et Karanis, 2011). En outre, il n'y a pas eu d'efforts systématiques et coordonnés pour collecter des données épidémiologiques sur l'incidence des maladies attribuées aux protozoaires car elles ne sont pas à déclaration obligatoire (Yoder *et al.*, 2008).

Actuellement, les niveaux de contamination biologique de l'eau sont évalués à partir d'indicateurs fécaux comme *Escherichia coli* et les entérocoques (Chauret *et al.*, 1995, Figueras et Borrego, 2010). Cependant, évaluer la qualité biologique des plans d'eau à partir de ces indicateurs ne semble pas refléter la contamination parasitaire (Tram et Dalsgaard, 2014). Entre 1984 et 1992 en Amérique du Nord, *Cryptosporidium* a été impliqué dans de nombreuses épidémies liées à une eau du robinet conforme microbiologiquement à la réglementation (Kramer *et al.*, 1996). Depuis la surprenante épidémie de cryptosporidiose à Milwaukee (Winsconsin, Etats-Unis), touchant plus de 400 000 personnes (McKenzie *et al.*, 1994) avec 4400 hospitalisations et 69 décès, des efforts ont été mis en place pour prévenir les populations à risque. Cependant, les infections hydriques perdurent. En 2015, 10 915 cas de cryptosporidioses confirmés (41% de plus qu'en 2014), et 18 031 cas de giardioses ont été signalés en Europe (ECDC, 2018a,b). De 2011 à 2015, le Royaume-Uni et l'Allemagne représentent les deux pays majoritairement touchés par ces deux parasites. Ces deux parasites ont notamment été décrits comme agents pathogènes les plus répandus dans les eaux de surface (lacs, réservoirs, rivières, ruisseaux), l'eau de puits mais aussi l'eau de sources susceptible d'être contaminée par l'eau de surface dans les pays développés (**Tableau II**). Par exemple, au Pérou, 14,5% des eau de lavage étaient contaminé par *C. parvum* (Ortega *et al.*, 1997). En 2017, Efstratiou *et al.* ont montré que *Cryptosporidium* spp. et *Giardia* spp. ont été impliqués respectivement dans 63% et 37% des épidémies hydriques d'origine parasitaire survenues de 2011 à 2016 dans le monde.

Tableau II : Epidémies hydriques décrites pour *G. duodenalis* et *C. parvum* depuis 2006.*Sources : Efstratiou et al., 2017 ; Ahmed et Karanis, 2017 et Baldursson et al., 2011.*

	Pays (année)	Nombre de cas	Sources de contamination	Référence
G. <i>duodenalis</i>	Etats-Unis (Mai 2006)	6	Rivière naturelle	Yoder <i>et al.</i> , 2008
	Nouvelle-Zélande (2006)	22	Multiple	Institute of Environmental Science and Research Ltd (ESR), 2006
	Etats-Unis (Septembre 2006)	49	Fontaine	Eisenstein <i>et al.</i> , 2008
	Etats-Unis (Setembre 2007)	31	Eau communautaire	Daly <i>et al.</i> , 2010
	Canada (2007)	-	Eau de source	Public Health Agency of Canada, 2007
	Nouvelle-Zélande (2007)	32	Multiple	Institute of Environmental Science and Research Ltd, 2008
	Etats-Unis (Août 2007)	13	Eau non potable (parc)	Brunkard <i>et al.</i> , 2011
	Etats-Unis (Juillet-Août 2007)	50	Eau récréative privée	Karon <i>et al.</i> , 2011
	Etats-Unis (2007 - 2008)	38	Eau récréative traitée	Hlavsa <i>et al.</i> , 2011
	Finlande (Novembre 2007 - Février 2008)	-	Eau de boisson	Rimhanen-Finne <i>et al.</i> , 2010
	Nouvelle-Zélande (2008)	63	Multiple	Institut of Environmental Science and Research Ltd, 2008
	Nouvelle-Zélande (2009)	44	Multiple	Institut of Environmental Science and Research Ltd, 2008
	Canada (2009)	26	Eau naturelle	CDC, 2013
	Etats-Unis (2009)	7	Eau de puits (privé)	CDC, 2013
	Etats-Unis (2009)	8	Interconnexiun potable / usée	eau CDC, 2013
	Etats-Unis (2009-2010)	7	Eau récréative	Hlavsa <i>et al.</i> , 2014
Corée (Avril 2010)	25	Fuite d'une canalisation	Cheun <i>et al.</i> , 2013	

	Pays (année)	Nombre de cas	Sources de contamination	Référence
G. duodenalis	Etats-Unis (Juin 2010)	20	Canalisation contaminée	CDC, 2013
	Etats-Unis (Juin 2010)	6	Puits	CDC, 2013
	Belgique (Décembre 2010)	222	Eau du robinet	Braeye <i>et al.</i> , 2015
	Etats-unis (Novembre 2011-Août 2012)	82	Multiple	Beer <i>et al.</i> , 2015a,b
	Etats-Unis (2011-2012)	159	Eau récréative	Hlavsa <i>et al.</i> , 2015
	Canada (2013)	75	Piscine	Niagara, 2013
C. parvum	Angleterre (Mai 2006)	35	Eau de surface / eau de puits	Hoek <i>et al.</i> , 2008
	Irlande (2007)	14	Inondation	Pelly <i>et al.</i> , 2007
	Norvège (Mars 2007)	25	Eau de boisson	Hajdu <i>et al.</i> , 2008
	Etats-Unis (Juin - Septembre 2007)	814	Eau récréative traitée	Hlavsa <i>et al.</i> , 2011
	Angleterre (Octobre - Décembre 2007)	4	Piscine public	Coetzee <i>et al.</i> , 2008
	Etats-Unis (Août - Septembre 2008)	25	Eau récréative traitée	Hlavsa <i>et al.</i> , 2011
	Palestine (Octobre 2008)	30	Eau de source	Hussein, 2011
	Australie (Janvier - Avril 2009)	45	Piscine publique	Waldron <i>et al.</i> , 2011
	Norvège (Mars-Avril 2009)	74	Inconnue	Rimšeliėnė <i>et al.</i> , 2011
	USA (Juin 2011)	20	Inconnue	CDC, 2012
	Irlande (2012)	10	Inconnue	Mahon et Doyle, 2017
	Corée (Mai 2012)	126	Eau du robinet	Moon <i>et al.</i> , 2013; Cho <i>et al.</i> , 2013
	Etats-Unis (Août 2013)	2780	Eau de ville traitée non filtrée	deSilva <i>et al.</i> , 2016
	France (2017)	> 150	Eau potable	CNR Cryptosporidiose, 2018
	Guyane (2018)	50	Eau du robinet	Données non publiées

Par rapport à *Cryptosporidium* et *Giardia*, *T. gondii* est beaucoup moins décrit (Tableau III). De 1976 à 2009, ce parasite a été impliqué dans seulement 21% des épidémies hydriques (Meireles *et al.*, 2015) dont certaines sont dues à la présence des félinés. Les deux principales épidémies liées à de l'eau de boisson sont survenues au Canada (5 000 cas en 1995) et au Brésil (294 cas en 2002) (Bultel et Derouin, 2006). Au Brésil, un risque accru

d'infection à *T. gondii* a été décrit lié à la consommation d'eau non filtrée (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003).

Tableau III : Epidémies hydriques rapportées pour *T. gondii*.

Source : Meireles *et al.*, 2015.

	Pays (année)	Nombre de cas	Aliments contaminés	Référence
<i>T. gondii</i>	Panama (Janvier-Février 1979)	39	Eau de surface	Benenson <i>et al.</i> , 1982
	Canada (1995)	110	Eau de boisson	Bowie <i>et al.</i> , 1997
	Brésil (1999)	113	Inconnu	Gattás <i>et al.</i> , 2000
	Brésil (2001)	294	Eau municipale traitée non filtrée	de Moura <i>et al.</i> , 2006
	Brésil (2002)	290	Eau de boisson	Taverne, 2002
	Guyane française (Décembre 2003 - Janvier 2004)	11	Inconnu	Demar <i>et al.</i> , 2007
	Brésil (2003-2005)	8	Eau non traitée	Khan <i>et al.</i> , 2006
	Inde (Septembre 2004 - Février 2005)	178	Eau municipale	Palanisamy <i>et al.</i> , 2006
	Inde (Août 2004 - Juillet 2005)	248	Eau municipale	Balasundaram <i>et al.</i> , 2010
	Amérique du sud (2005)	9	Inconnu	Madeira et Búrigo, 2012
	Brésil (2018)	677		Bahia-Oliveira (Publication personnelle)

3.2 Epidémies d'origine alimentaire

Depuis 1979, le système d'alerte rapide pour les denrées alimentaires et les aliments pour animaux (RASFF) permet l'échange d'informations, au niveau européen, sur les risques sanitaires liés à des denrées alimentaires ou aliments pour animaux. Concernant le danger pour l'homme lié à la présence d'oocystes de *T. gondii* et *C. parvum* et de kystes de *G. duodenalis* dans les aliments, les principales matrices vulnérables sont les produits frais (végétaux et fruits) et les coquillages en raison de leur exposition dans l'environnement et de leur consommation crue ou peu cuite.

Actuellement, la France est le 4^{ème} producteur de fruits et légumes en Europe après l'Espagne, l'Italie et la Pologne (Agreste, Eurostat). En 2016, 7,8 millions de tonnes de fruits et légumes ont été produits dont 5,3 Mt de légumes et 2,5 Mt de fruits (Agreste, Centre

technique interprofessionnel des fruits et légumes). Les fruits et légumes apportent dans notre alimentation quotidienne des fibres, des vitamines, des minéraux, dont les apports nutritionnels conseillés ont été établis. Dans le but d'améliorer la santé de la population française, les autorités encouragent même la consommation d'au moins cinq fruits et légumes par jour à travers le Programme National Nutrition Santé (PNNS). Cependant, leur mode de consommation (crus) ne limite pas la présence d'une éventuelle contamination qui peut avoir lieu avant et/ou après la récolte, au cours des différentes étapes allant du producteur jusqu'aux consommateurs. En 2016, 100 alertes impliquant les fruits et légumes ont été déclarées par le RASFF.

Les fruits et légumes sont les plus fréquemment impliqués dans les alertes mais le RASFF a aussi rapporté 98 cas concernant les produits de la pêche, 75 cas impliquant la viande/ produits de viande et 1 cas impliquant l'eau.

De par leur grande capacité de filtration, les mollusques peuvent bioaccumuler de nombreux micro-organismes au niveau de leur système digestif (Palos Ladeiro *et al.*, 2014). Leur mode de consommation (crus ou peu cuits) ne permet pas l'élimination du danger microbiologique pour le consommateur. Les Français sont d'importants consommateurs de mollusques et de crustacés. Selon France AgriMer, chaque année la production française est en moyenne de 200 000 tonnes métriques de mollusques et crustacés dont 39% de moules et 38,2 % d'huîtres produites. Cependant, le niveau de consommation de fruit de mer étant élevé (37 kg/an), la pêche française ne suffit pas. En 2016, la France a importé de grandes quantités de mollusques provenant de pays européens (Royaume-Unis, Irlande, Espagne, Pays-Bas) voir même d'Amérique du Nord (Canada, Etats-Unis) ou d'Amérique latine (Pérou, Chili, Argentine) (banque de données : Global Trade Tracker 2017).

En 2016, 0,4% des épidémies alimentaires sont liées aux parasites avec 93 cas humains dont neuf personnes hospitalisées (EFSA/ECDC, 2017). Globalement, les parasites d'origine alimentaire sont un sujet très négligé en matière de sécurité des aliments, principalement en raison du manque de sensibilisation des autorités publiques, des consommateurs ainsi que des médecins généralistes et de l'absence de méthodes de détection standardisées. De plus, les maladies parasitaires ne sont pas à déclaration obligatoire et elles présentent de longues périodes d'incubation et peuvent être asymptomatiques. Cela complique encore l'association entre la maladie et l'aliment et conduit à une sous-estimation du nombre de cas rapportés et de la réelle incidence des maladies parasitaires d'origine alimentaire.

De 1984 à 2015, 31 épidémies alimentaires, représentant au total 2 893 cas, liées aux oocystes de *Cryptosporidium* spp ont été recensées (**Tableau IV**). Les aliments impliqués sont les herbes aromatiques, les crudités (carotte, tomate et salade), le cidre de pomme, du lait non pasteurisé, de la viande crue et une sauce béarnaise faite maison.

Concernant *G. duodenalis*, depuis 2011 aucune épidémie alimentaire récente n'a été rapportée (**Tableau IV** ; Adam *et al.*, 2016). En 1983, 8 épidémies alimentaires avec 198 cas ont été décrites sur des fruits et légumes principalement. Récemment, des prévalences de 1,5 à 11% de *G. duodenalis* ont été détectées dans de nombreux légumes (poivrons, radis, cresson, oignon, concombre, tomate, laitue, chou, carotte) et des fruits en Egypte (Eraky *et al.*, 2014 ; Ahmad *et al.*, 2016), en Ethiopie (Tefera *et al.*, 2014), en Iran (Rahmati *et al.*, 2017 ; Olyaei et Hajivandi, 2013), au Nigéria (Omowaye et Audu, 2012) ; en Arabie Saoudite (Al-Megrin, 2010) et au Soudan (Mohamed *et al.*, 2016).

Pour les oocystes de *T. gondii*, les études portent principalement sur l'identification des facteurs de risques conduisant à une infection. Entre 2,1% et 41% des échantillons de légumes prélevés au hasard dans des restaurants égyptiens (Ahmad *et al.*, 2016), 6,6% et 18,36% de ceux mis en vente sur différents marchés, en Arabie Saoudite et au Kurdistan, ont révélé la présence de *T. gondii* (Al-Megrin, 2010 ; Saida and Nooraldeen, 2014). Suite à la consommation de ces légumes contaminés, aucune infection symptomatique n'a été déclarée. Le risque réel parasitaire est très largement sous évalué. Seules les épidémies liées à des souches ayant un fort pouvoir pathogène, comme celle retrouvée dans de la laitue au Brésil, sont détectables car elles provoquent d'importants signes cliniques (**Tableau IV**).

Tableau IV : Epidémies alimentaires rapportées pour *T. gondii* (forme oocyste), *Cryptosporidium* spp. et *G. duodenalis**Sources : Ahmed et Karanis, 2018 et Ryan et al., 2018.*

	Pays (année)	Nombre de cas	Aliments contaminés identifiés ou suspectés	Références
<i>Cryptosporidium</i> spp	France (2018)	22	Inconnu	Données non publiées
	France (2017)	> 150	Produits laitiers	CNR Cryptosporidiose, 2018
	Etats-Unis (2015)	2	Lait cru de vache	TDH, 2015
	Royaume-Uni (2015)	424	Salade	Trienekens <i>et al.</i> (Données non publiées)
	Etats-Unis (2014)	11	Lait cru de chèvre	CDC, 2015 ; Rosenthal <i>et al.</i> , 2015
	Angleterre/Ecosse (2012)	648	Salade	McKeer <i>et al.</i> , 2015
	Finlande (2012)	250	Salade frisée	Åberg <i>et al.</i> , 2015
	Salvador (2011)	67	Inconnu	Kasper <i>et al.</i> , 2012
	Suède (2010)	16	Inconnu	Gherasim <i>et al.</i> , 2012
	Suède (2010)	89	Herbes aromatiques	Gherasim <i>et al.</i> , 2012
	Etats-Unis (2009)	46	Sandwich (jambon, laitue, tomate ou oignons)	CDC, 2011; Collier <i>et al.</i> , 2011
	Norvège (2009)	74	Carotte rapée	Rimšeliene <i>et al.</i> , 2011 ; Johanson <i>et al.</i> , 2015
	Suède (2008)	18	Roquette	Insulander <i>et al.</i> , 2013
	Suède (2008)	21	Sauce béarnaise au persil frais haché	Insulander <i>et al.</i> , 2008
	Finlande (2008)	72	Laitue	Pönka <i>et al.</i> , 2009
	Japon (2006)	4	Viande crue (bœuf)	Yoshida <i>et al.</i> , 2007
	Allemagne (2006)	Inconnu	Lait et produits laitiers	EFSA, 2007
	Danemark (2005)	99	Carotte et poivron rouge	Ethelberg <i>et al.</i> , 2009
	Etats-Unis (2004)	212	Cidre de pomme	Danyluk <i>et al.</i> , 2012 ; Vojdani <i>et al.</i> , 2008
	Etats-Unis (2003)	144	Cidre de pomme	Danyluk <i>et al.</i> , 2012 ; Vojdani <i>et al.</i> , 2008
Etats-Unis (2003)	144	Cidre de pomme	Blackburn <i>et al.</i> , 2006	
Australie (2001)	8	Lait non pasteurisé	Harper <i>et al.</i> , 2002	
Etats-Unis (1998)	152	Fruits/légumes manipulés	Quiroz <i>et al.</i> , 2000	
Etats-Unis (1997)	54	Oignons	CDC, 1998	

	Pays (année)	Nombre de cas	Aliments contaminés identifiés ou suspectés	Références
<i>Cryptosporidium</i> spp	Etats-Unis (1996)	31	Cidre de pomme	CDC, 1997
	Royaume-Uni (1995)	50	Lait de vache	Gelletlie <i>et al.</i> , 1997
	Etats-Unis (1995)	15	Salade de poulet	CDC, 1996
	France (1993)	160	Cidre de pomme	Millard <i>et al.</i> , 1994
	Russie (1990)	13	Boisson à base de yaourt (Kefir)	Romanova <i>et al.</i> , 1992
	Mexique (1986)	1	Salade	Sterling <i>et al.</i> , 1986
	Mexique (1985)	22	Lait de vache non pasteurisé	Soave <i>et al.</i> , 1989
	Royaume-Uni (1984)	24	Saucisse et lait cru	Casemore <i>et al.</i> , 1986
	Mexique (1984)	22	Lait	Elsser <i>et al.</i> , 1986
<i>G. duodenalis</i>	Salvador (2011)	2	Inconnu	Kasper <i>et al.</i> , 2012
		26	Légumes crus	Mintz <i>et al.</i> , 1993
		27	Glace	Quick <i>et al.</i> , 1992
		-	Soupe de tripes	Karabiber et Akras, 1991
	Etats-Unis	10	Salade de fruits	Porter <i>et al.</i> , 1990
		88	Sandwichs	White <i>et al.</i> , 1989
		13	Salade de pâtes	Peeters <i>et al.</i> , 1989
		29	Conserve de saumon	Osterholm <i>et al.</i> , 1981
	3	Pudding de Noël	Conroy, 1960	
<i>T. gondii</i>	Brésil (2009)	14	Laitue	Ekman <i>et al.</i> , 2012

3.3 Cas particulier des mollusques

Aucune épidémie alimentaire impliquant *T. gondii*, *C. parvum* ou *G. duodenalis* n'a été décrite et la majorité des études portent sur la détection des oocystes de *C. parvum* (Tableau V). On peut tout de même noter l'intérêt grandissant pour les oocystes de *T. gondii* au cours de ces dernières années (Jones *et al.*, 2014 ; Pal *et al.*, 2014), suggérant un éventuel transfert trophique de *T. gondii* des mollusques contaminés aux mammifères aquatiques (Shapiro *et al.*, 2012, Simon *et al.*, 2013, Goyette *et al.*, 2014).

Tableau V : Prévalence des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum*, et des kystes de *G. duodenalis* dans les mollusques bivalves.

IFA : Immunofluorescence, FITC : Hybridation *in situ* en fluorescence.

	Mollusques	Pays	Prévalence	Méthode de détection	Référence
<i>T. gondii</i>	Moules (<i>Perna canaliculus</i>)	Nouvelle Zélande	16.4% (9,4% viable)	Nested PCR, nPCR-RFLP, RT-PCR	Coupe <i>et al.</i> , 2018
	Palourdes (<i>Ruditapes decussatus</i>)	Tunisie	6.6%	qPCR, séquençage	Ghozzi <i>et al.</i> , 2017
	Moules (<i>Mytilus spp.</i> et un mélange de <i>M. californianus/galloprovincialis/trossulus/edulis</i>)	Etats-Unis	43,5%	qPCR	Staggs <i>et al.</i> , 2015
	<i>Mytilus californianus</i>	Etats-Unis	1,4%	qPCR	Shapiro <i>et al.</i> , 2015
	Huîtres (<i>Crassostrea rhizophorae</i>)	Brésil	8,1%%	PCR	Ribeiro <i>et al.</i> , 2015
	Moules (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	Turquie	39,6%	qPCR	Marangi <i>et al.</i> , 2015
			9.4% (6-30 oocystes/moule)		Aksoy <i>et al.</i> , 2014
	Huîtres (<i>Crassostrea gigas</i>)	Italie	16,7%	Nested PCR, PCR	Putignani <i>et al.</i> , 2011
	Palourdes (<i>Tapes decussatus</i>)		3,6%		
	Huîtres (<i>Crassostrea rhizophorae</i>)	Brésil	3,3%	Nested PCR, PCR-RFLP, <i>in vivo</i>	Esmerini <i>et al.</i> , 2010
Moules (<i>Mytilus californianus</i>)	Etats-Unis	78,8%	IFA, PCR-RFLP, séquençage	Miller <i>et al.</i> , 2008	
<i>G. duodenalis</i>	Moules (<i>Perna canaliculus</i>)	Nouvelle Zélande	1%	Nested PCR	Coupe <i>et al.</i> , 2018
	Palourdes (<i>Ruditapes decussatus</i>)	Tunisie	1,6%	qPCR, séquençage	Ghozzi <i>et al.</i> , 2017
	Myes (<i>Mya arenaria</i>)	Etats-Unis	37,5%	PCR	Tei <i>et al.</i> , 2016
	Moules (<i>Geukensia demissa</i>)		4,5%		
	Huîtres (<i>Crassostrea virginica</i>)		60,0%		
	Moules (<i>Mytilus edulis</i>)		20,6%		

	Mollusques	Pays	Prévalence	Méthode de détection	Référence
<i>G. duodenalis</i>	Moules (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	Italie	10,0%	qPCR	Marangi <i>et al.</i> , 2015
	Moules (<i>Mytilus edulis</i>)	Canada	18,0%	IFA	Lévesque <i>et al.</i> , 2010
	Moules (<i>Mytilus edulis</i>)	Norvège	59% - 70%	IFA, FISH	Robertson et Gjerde, 2008
	Moules (<i>Modiolus modiolus</i>)		76,0%		
	Huîtres (<i>Ostrea edulis</i>)		77,0%		
	Moules (<i>Mytilus edulis</i>)	Irlande	6,1 kystes/g	IFA, FISH	Lucy <i>et al.</i> , 2008
	Huîtres (<i>Crassostrea gigas</i>)	Hollande	3,4%	IFA	Schets <i>et al.</i> , 2007
	Moules (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	Espagne	42,0%	IFA	Gómes-Courso <i>et al.</i> , 2005a; 2005b
	Palourdes (<i>Corbicula fluminea</i>)	Etats-Unis	ND	IFA, PCR	Miller <i>et al.</i> , 2005
	Huîtres (<i>Ostrea edulis</i>)	Espagne	11,1%	Nested PCR	Gómes-Couso <i>et al.</i> , 2004
<i>C. parvum</i>	Moules (<i>Perna perna</i>)	Brésil	10% (tractus gastrointestinaux)	Microscopie et immunomarquage	Santos <i>et al.</i> , 2018
			11% (branchies)		
			6,33% (tractus)		
			8,86% (branchies)		
	Myes (<i>Mya arenaria</i>)	Etats-Unis	50,0%	PCR	Tei <i>et al.</i> , 2016
	Moules (<i>Geukensia demissa</i>)		11,0%		
	Moules (<i>Mytilus edulis</i>)		1,0%		
	Moules (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	Italie	43,3%	qPCR	Marangi <i>et al.</i> , 2015
	Moules (<i>Mytilus spp</i>)	Etats-Unis	26,9%	qPCR	Staggs <i>et al.</i> , 2015
	Moules (<i>Mytilus edulis</i>)	Canada	73,0%	IFA	Lévesque <i>et al.</i> , 2010
	Moules (<i>Perna viridis</i>)	Thaïlande	12,5%	IFA	Srisuphanunt <i>et al.</i> , 2009
	Moules (<i>Mytilus edulis</i>)	Irlande	22,3 oocystes/g	FISH-IFA	Lucy <i>et al.</i> , 2008
	Huîtres (<i>Crassostrea rhizophorae</i>)	Brésil	10,0%	IFA	Guiguet <i>et al.</i> , 2008
	Coques (<i>Tivela mactroides</i>)		50,0%		
	Moules (<i>Mytilus edulis</i>)	Norvège	75,5% - 84%	IFA, FISH	Robertson et Gjerde, 2008
	Moules (<i>Modiolus modiolus</i>)		74,0%		
	Huîtres (<i>Ostrea edulis</i>)		72,0%		
Huîtres (<i>Crassostrea gigas</i>)	Hollande	6,1%	IFA	Schets <i>et al.</i> , 2007	
Huîtres commerciales (<i>Crassostrea virginica</i>)	Etats-Unis	88,7% (23% viable)	IFA, PCR, FISH	Graczyk <i>et al.</i> , 2007	
Palourdes (<i>Ruditapes philippinarum</i>)	Italie	0,14% - 1,15%	Semi-nested PCR, séquençage	Molini <i>et al.</i> , 2007	

	Mollusques	Pays	Prévalence	Méthode de détection	Référence	
<i>C. parvum</i>	Palourdes (<i>Dosinia exoleta</i> , <i>Ruditapes philippinarum</i> , <i>Venerupis pullastra</i> , <i>V. rhomboideus</i> , <i>Venus verrucosa</i>), Moules (<i>Mytilus galloprovincialis</i>), Huîtres (<i>Ostrea edulis</i>)	Espagne	95% (nested-PCR)	IFA, nested PCR, PCR-RFLP	Leoni <i>et al.</i> , 2007	
	Moules (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	Espagne	29,3%	IFA, nested PCR, PCR-RFLP, séquençage	Gómes-Courso <i>et al.</i> , 2006	
	Moules (<i>Mytilus edulis</i>)	France	100,0%	IFA, PCR, <i>in vivo</i>	Li <i>et al.</i> , 2006	
	Palourdes (<i>Corbicula fluminea</i>)	Etats-Unis	38% (1-7 oocystes/bivalve)	IFA, PCR	Miller <i>et al.</i> , 2005	
	Praires (<i>Chamelea gallina</i>)	Italie	71,9%	IFA, PCR	Giangaspero <i>et al.</i> , 2005	
	Moules (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	Royaume-Uni	15,0%	IFA, nested PCR, PCR-RFLP	Gómez-Courso <i>et al.</i> , 2004	
	Coques (<i>Cerastoderma edule</i>)	Royaume-Uni Espagne	5,6%	IFA, nested PCR, PCR-RFLP IFA, Marquage de viabilité (IP)	Gómez-Courso <i>et al.</i> , 2004 Gómez-Couso <i>et al.</i> , 2003	
	Palourdes (<i>Dosinia exoleta</i> , <i>Ruditapes philippinarum</i> , <i>Venerupis pullastra</i> , <i>V. rhomboideus</i> , <i>Venus verrucosa</i>)		50%-55,6%			
	Moules (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	Espagne Espagne,	36,4% - 54,5%			
	Huîtres (<i>Ostrea edulis</i>)	Italie, Irlande,	55,6% - 66,7%			
	Moules (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	Royame-Uni	32,7% (51,4 % viable)			
	Palourdes (<i>Ruditapes decussatus</i> , <i>uditapes philippinarum</i> , <i>Venerupis pulastra</i>)	Espagne,	29,4% (60% viable)			
	Huîtres (<i>Ostrea edulis</i>)	Italie, Irlande, Royame-Uni	54,8% (47,8% viable)			
	Coques (<i>Cerastoderma edule</i>)	Egypte	20,8% (60% viable)			
Coques (<i>Caelatura Iaronia pruneri</i> / <i>Donax trunculus limiacus</i>)		oocystes infectieux	IFA, Marquage de viabilité (IP) Coloration Ziehl-Neelsen, <i>in vivo</i>			Gómez-Couso <i>et al.</i> , 2003 Negm, 2003

	Mollusques	Pays	Prévalence	Méthode de détection	Référence		
<i>C. parvum</i>	Huîtres et Palourdes (Bivalves commerciaux)	Etats-Unis	3,7% (IFA), 35,2% (PCR), non infectieux (<i>in vivo</i>)	IFA, PCR, nested PCR, PCR-RFLP, <i>in vivo</i>	Fayer <i>et al.</i> , 2003		
	Huîtres (<i>Crassostrea virginica</i>)	Etats-Unis	81% (IFA)	IFA, nested PCR, PCR-RFLP	Fayer <i>et al.</i> , 2002		
	Moules (<i>Mytilus edulis</i>)	Irlande	12,5%	IFA, PCR-RFLP	Lowery <i>et al.</i> , 2001		
	Palourdes (<i>Ruditapes philippinarum</i>)	Italie/ Angleterre	62,5%	IFA	Freire-Santos <i>et al.</i> , 2000		
	Praires (<i>Venus verrucosa</i>)	Espagne	100,0%	IFA	Freire-Santos <i>et al.</i> , 2000 Gomez-Bautista <i>et al.</i> , 2000		
	Palourdes (<i>Venerupis pullastra</i>)	Espagne Etats-Unis	50,0%	IFA			
	<i>Dosinia exoleta</i>		100,0%	IFA IFA, PCR-RFLP, <i>in vivo</i>			
	Moules (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)		40,0%				
	Huîtres (<i>Ostrea edulis</i>)		83,3%				
	Moules (<i>Mytilus galloprovincialis</i>), Coques (<i>Cerastoderma edule</i>)		1,5 × 10 ⁴ - 31 × 10 ⁵ oocystes	IFA, PCR-RFLP, <i>in vivo</i>			
	Coques (<i>Cerastoderma edule</i>)		3 × 10 ⁴ oocystes				
	Moules (<i>Ischadium recurvum</i>)			51,1%		IFA	Gomez-Bautista <i>et al.</i> , 2000 Graczyk <i>et al.</i> , 1999
	Huîtres (<i>Crassostrea virginica</i>)		Etats-Unis	6,7% - 86,7% en fonction des sites		IFA, <i>in vivo</i>	Fayer <i>et al.</i> , 1998a
	Moules (<i>Mytilus edulis</i>)		Irlande	9,0%		IFA	Chalmers <i>et al.</i> , 1997

3.4 Biosurveillance des masses d'eau

Les mollusques peuvent aussi avoir un rôle de surveillance de la qualité des eaux. Alors que les risques chimiques et bactériologiques dans l'eau sont maintenant bien connus, les risques liés aux parasites sont beaucoup moins documentés. Les invertébrés, et en particulier les bivalves, sont considérés comme des organismes sentinelles utilisés dans de nombreux programmes de biosurveillance. En Europe, le Programme de Biosurveillance Méditerranéenne du PNUE est responsable des travaux liés à la protection de la mer Méditerranée contre la pollution provenant de sources et d'activités terrestres ; la Commission OSPAR tente de protéger le milieu marin du Nord-Est Atlantique en utilisant les mollusques et les poissons comme outils bioindicateurs. Plus récemment, la directive-cadre européenne

sur l'eau a fait de la pollution de l'eau une priorité avec comme principaux objectifs (i) l'assainissement de l'eau polluée et (ii) garantir la propreté des eaux propres. La communauté des invertébrés a été utilisée pour discriminer les sites contaminés par des perturbateurs endocriniens (Matozzo *et al.*, 2008), par les polluants organiques (Porte *et al.*, 2006), par des traces de métaux (Amiard *et al.* 2006) et par l'exposition aux pesticides (Fulton et Key, 2001). En tant qu'espèces filtrantes, les mollusques peuvent accumuler les contaminants et les concentrer en forte quantité dans leurs tissus (Graczyk *et al.*, 2003; Palos Ladeiro *et al.*, 2014). Leurs larges distributions, leurs comportements sédentaires, la possibilité de les étudier en conditions contrôlées en laboratoire et *in situ* (encagement) en ont fait des bioindicateurs de choix pour l'analyse des sites.

Les mollusques sont exposés au risque de contamination par les protozoaires qui pénètrent dans leurs écosystèmes marins, notamment *via* les écoulements agricoles et les rejets d'eaux usées (Gómez-Couso *et al.*, 2005 ; Putignani *et al.*, 2011). L'un des principaux mollusques utilisés en biosurveillance en eau douce de *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis* est *Dreissena polymorpha* (2 - 3,5 cm de longueur), aussi appelée la moule zébrée (Graczyk *et al.*, 2004 ; Lucy *et al.*, 2008 ; Kerambrun *et al.*, 2016) (**Figure 7**).



Figure 7 : Moule zébrée utilisée en biosurveillance de la qualité des eaux douces.

Source : ©BioPix : N Sloth.

La dreissène est capable de filtrer de grands volumes d'eau entre 5 mL/h et 400 mL/h (Ackerman 1999, Costa *et al.*, 2008) avec une préférence pour les particules comprises entre 15 μm - 40 μm) (Ten Winkel et Davids, 1982). Leur maintien en laboratoire est relativement facile et leurs réponses physiologiques au stress notamment chimique sont bien

documentées (Buschini *et al.*, 2003 ; Voets *et al.*, 2006 ; Binelli *et al.*, 2008; Minguez *et al.*, 2009). Cette espèce envahissante peut être utilisée en biomonitoring passif (Camusso *et al.*, 2001 ; Le Goff *et al.*, 2006) ou actif (Boening, 1999 ; Bervoets *et al.*, 2004, 2005 ; Bourgeault *et al.*, 2010 ; Palais *et al.*, 2011) pour mettre en évidence une contamination de l'eau par les oocystes de *C. parvum* et les kystes de *G. duodenalis* (Graczyk *et al.*, 2004 ; Lucy *et al.*, 2010). De plus, *D. polymorpha* a révélé une grande performance pour l'élimination de *C. parvum* et *G. duodenalis* dans de l'eau expérimentalement contaminée (Graczyk *et al.*, 2003) et serait capable de bioaccumuler *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis* de façon proportionnelle au niveau de contamination de son environnement (Palos-Ladeiro *et al.*, 2014).

Les mollusques d'eau de mer peuvent également être utilisés en biosurveillance de la qualité de l'eau du littoral. C'est notamment le cas de *Mytilus edulis*, aussi appelée moule bleue, qui est une espèce commerciale, généralement consommée peu cuite, et pouvant donc représenter un risque important pour la santé des consommateurs (Binelli *et al.*, 2015). Considérée comme une espèce sentinelle, elle est présente au sud de l'océan Arctique, au nord des océans Atlantique et Pacifique. Typique des eaux marines côtières (littorales et sublittorales; < 99 m), la moule bleue a déjà été recensée dans des eaux plus profondes (100 à 499 m) et donc plus froides (Theroux et Wigler, 1983). Dans une moindre mesure que la dreissène, la moule bleue est capable de filtrer entre 1 313 mL/h et 2 410 mL/h (Winter, 1973).

M. edulis a d'abord été signalée comme hébergeant des oocystes de *C. parvum* en 1997 (Chalmers *et al.*, 1997) puis les oocystes sont retrouvés par la suite dans des moules provenant d'Espagne (Gomez-Bautista *et al.*, 2000), du Royaume-Uni, d'autres pays européens (Lowery *et al.*, 2001, Gómez-Couso *et al.*, 2003, 2004), des États-Unis (Graczyk *et al.*, 1999) et au Canada (Lévesque *et al.*, 2010).

4. Les méthodes d'analyses de *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis* dans les denrées alimentaires

A l'heure actuelle, des méthodes normalisées existent pour détecter les oocystes de *C. parvum* et les kystes de *G. duodenalis* dans l'eau et les végétaux à feuilles vertes et fruits à baies. Ces méthodes basées sur la microscopie ne permettent cependant pas de caractériser le potentiel infectieux des parasites détectés et donc de contribuer à l'évaluation du risque. Pour les oocystes de *T. gondii* en revanche, aucune méthode d'analyse normalisée n'est actuellement disponible. Quel que soit le parasite et la matrice concernée, aucune réglementation n'existe et aucun critère n'est établi.

4.1 Méthodes de détection de *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis* dans l'eau et les aliments

Les oocystes de *Cryptosporidium spp.* et les kystes de *Giardia* bénéficient de deux techniques normalisées de détection dans les eaux : la méthode ICR-US-EPA de 1995 (ICR : Information Collection Rule) et une méthode qui regroupe la norme française NF T90-455 de l'AFNOR (2001) et la méthode 1623 de l'US-EPA (2001). A partir d'un grand volume d'eau, les oocystes et kystes sont concentrés par filtration sur cartouche, purifiés à l'aide d'une séparation immunomagnétique (IMS-CG) puis détectés en microscopie à immunofluorescence (IFA). Cependant, aucune méthode de référence n'existe pour la détection des oocystes de *T. gondii* dans l'eau. Toutefois les méthodes de recherche de ce parasite dans l'eau sont relativement proches de celles développées pour les oocystes de *C. parvum* et kystes de *G. duodenalis*. Selon le volume d'eau, trois méthodes de concentration ont été décrites: la filtration de grand volume d'eau (500 à 1000 L), à l'aide de cartouches, en acrylique tissé (Gelman Envirochek Standard) et en polyéthersulfone (High-Volume) (Isaac-Renton *et al.*, 1998 ; Villena *et al.*, 2004) ; la floculation avec des sels de fer ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) ou d'aluminium ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) qui n'est pas applicable au traitement de volumes importants (Kourenti *et al.*, 2003) ; et la centrifugation pour analyser des prélèvements de faible volume. Cette étape est suivie d'une purification des oocystes par flottation en utilisant des solutions de saccharose et de Percoll-saccharose ayant une densité différente (1,104-1,140) (Dubey *et al.*, 1970b; Isaac-Renton *et al.*, 1998 ; Villena *et al.*, 2004). En revanche, la

flottation ne permet pas la distinction microscopique de *T. gondii* par rapport à *Hammondia* et *Neospora*, autres coccidies proches du genre. Elle doit être associée à des essais *in vivo* ou des méthodes de détection par biologie moléculaire. Deux méthodes de capture des oocystes de *T. gondii* par IMS utilisant des anticorps monoclonaux (mAb 3G4 et 4B6) spécifiques de la paroi des oocystes ont été développées (Dumètre et Dardé, 2005, 2007). Cependant, ces deux anticorps se sont avérés réagir également avec les débris en suspension. Récemment, une nouvelle méthode de séparation magnétique à l'aide de lectines (LMS) couplée à une détection par microscopie ou PCRq a été décrite pour des échantillons d'eau concentrés (Harito *et al.*, 2017a). Cette technique est basée sur la capacité de liaison entre la paroi des oocystes âgés et une lectine (Wheat Germ Agglutinin, WGA). L'application de la LMS aux oocystes fraîchement excrétés est tout de même possible en utilisant un pré-traitement à la pepsine (Harito, 2016). Contrairement à l'IMS, la LMS est une méthode de purification non spécifique en raison de la liaison de WGA à un très grand nombre de glycoconjugués également présents chez différents organismes dans l'eau.

Seule la norme ISO 18744:2016 existe pour la recherche et le dénombrement par microscopie à fluorescence des oocystes de *Cryptosporidium* spp. et les kystes de *G. duodenalis* dans les légumes verts frais à feuilles et les fruits à baies. Comme pour l'eau, cette méthode est basée sur une concentration des parasites à partir de la matrice alimentaire par centrifugation, puis une purification par IMS suivie par une détection et quantification des parasites par IFA.

Pour les oocystes de *T. gondii*, aucune méthode normalisée n'est disponible. La concentration peut se faire directement après élution des matrices (Hohweyer *et al.*, 2016) mais des étapes préalables ont également été décrites telles que la filtration (Kniel *et al.*, 2002 ; Lindsay *et al.*, 2008) ou la flottation en saccharose (Lalonde et Gajadhar, 2016). Avant l'étape de lavage, une floculation au CaCO₃ peut également être employée pour concentrer et récupérer les oocystes de *T. gondii* des fruits et des légumes (Lass *et al.*, 2012). La détection peut être réalisée à l'aide d'une analyse microscopique basée sur des critères morphologiques (Al-Megrin, 2010, Shafa-ul-Haq *et al.*, 2014), mais est limitée par le manque de sensibilité qui dépend notamment de l'interprétation de l'analyste. La détection dans les matrices végétales par qPCR a également été décrite (Lass *et al.*, 2012, Hohweyer *et al.*, 2016 ; Marchioro *et al.*, 2016).

Concernant la détection des trois protozoaires dans les coquillages, différents protocoles dépendant de l'espèce et des tissus considérés pour l'analyse ont été décrits. Ceci a fait l'objet d'une revue bibliographique publiée par l'équipe (Hohweyer *et al.*, 2013). Globalement, les échantillons subissent une étape d'homogénéisation en présence ou non d'enzymes digestives, puis une étape de concentration est effectuée par filtration/centrifugation. La concentration peut être précédée d'une étape de purification par flottation, gradient ou IMS, associée ou non à une étape de délipidation. La détection est effectuée par microscopie ou biologie moléculaire (Hohweyer *et al.*, 2013). Des optimisations dans le cadre de l'UMT Protorisk ont conduit à retenir un protocole de pré-traitement basé sur l'utilisation de la trypsine 1X en sac stomacher pour les matrices mollusques.

Quelle que soit la méthode utilisée, normalisée ou non, aucune ne fournit une information concernant la viabilité et/ou l'infectiosité des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum*, et les kystes de *G. duodenalis*. Or, étant donné que seul un parasite viable est potentiellement infectieux, et peut conduire à des symptômes chez l'Homme, il est donc nécessaire d'avoir des méthodes pour étudier ces deux paramètres.

4.2 Méthodes d'étude de la viabilité et l'infectiosité

Dès le commencement de cette thèse, une recherche bibliographique (**Article 1** : Rousseau *et al.*, 2018) a été réalisée afin de recenser toutes les méthodes disponibles pour évaluer la viabilité et l'infectiosité des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum*, et des kystes de *G. duodenalis* dans l'eau et les matrices alimentaires. Les avantages/inconvénients de chaque méthode et une stratégie d'analyse a été proposée pour évaluer l'exposition de l'homme à ces trois protozoaires.

Un kyste de *Giardia* infectieux est défini comme un kyste viable capable de libérer ses trophozoïtes, lesquels peuvent ensuite se multiplier dans des conditions de culture appropriées. Un oocyste infectieux de *Cryptosporidium* spp. ou *T. gondii* est défini comme un oocyste viable capable d'excyster et de libérer ses sporozoïtes, qui peut ensuite infecter les cellules hôtes et se différencier en un stade répliatif. En revanche, un oocyste/kyste viable est défini comme étant vivant mais n'est pas nécessairement infectieux car ses trophozoïtes/sporozoïtes ne se répliqueraient pas dans l'hôte ou ne provoqueraient pas d'infection dans les cellules sensibles.

La méthode de référence pour étudier la viabilité des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum* et des kystes de *G. duodenalis* est le modèle animal. L'inoculation d'oocystes ou de kystes *in vivo* permet aux parasites de pouvoir achever leur cycle infectieux. Pour chaque parasite, plusieurs modèles et méthodes sont décrits. Pour *C. parvum*, la méthode d'évaluation de l'infectiosité consiste à quantifier le nombre d'oocystes observés dans l'intestin ou dans les fèces. Les souris néonatales BALB/c et NMRI néonatales sont considérées comme les modèles les plus appropriés pour évaluer l'infectiosité des oocystes de *C. parvum*. Les gerbilles semblent être le seul modèle permettant l'évaluation de l'infectiosité des kystes de *G. duodenalis* et pour *T. gondii*, les souris mais également les chats et les cochons ont été utilisés pour mettre en évidence le caractère infectant. Ces modèles ont permis d'identifier des oocystes infectieux des trois parasites dans des échantillons d'eau et de mollusques et ont été largement utilisés pour déterminer l'efficacité d'inactivation de traitements chimiques et physiques dans une matrice simple et alimentaires. Cependant, l'utilisation des animaux est longue, coûteuse et soulève d'importants problèmes éthiques limitant leur utilisation en routine. Une méthode alternative aux bioessais est l'infection de cultures cellulaires, plus facile à mettre en œuvre en laboratoire et plus accessible pour les laboratoires d'analyse, permettant d'évaluer le risque lié à la présence de ces parasites dans les aliments. Cette méthode a été utilisée avec succès pour quantifier l'infectiosité des oocystes de *Cryptosporidium* spp. et de *T. gondii* dans l'eau. Cependant, aucune méthode de ce type n'a été proposée à l'heure actuelle pour détecter des oocystes infectieux dans les matrices alimentaires.

Comme seuls les parasites viables sont potentiellement infectieux et provoquent une maladie, la viabilité est une caractéristique majeure à déterminer pour l'évaluation des risques liés aux protozoaires dans les aliments. L'électrorotation et d'autres méthodes biophysiques permettent d'étudier la viabilité en partant du principe que toute modification visible de la morphologie, de l'intégrité de la paroi et du contenu interne des oocystes/kystes peut indiquer une perte de viabilité au niveau d'un seul parasite. Cependant, l'utilisation de ces méthodes n'a pas encore été adoptée et semble peu pertinente sur des matrices environnementales et alimentaires.

Le dékystement *in vitro* et les marqueurs de viabilité sont deux autres méthodes qui ont été décrites en matrice eau pour étudier la viabilité de *C. parvum* et *G. duodenalis*. Ces méthodes présentent de nombreux inconvénients qui conduisent majoritairement à une estimation erronée de l'exposition aux dangers. Le dékystement *in vitro* nécessite une grande quantité de parasites et aucune corrélation avec l'infectiosité n'a été observée. La limite

majeure des approches d'exclusion de marqueurs est qu'une cellule non viable peut avoir une membrane intacte et exclure le marqueur comme une cellule viable. L'exposition à des parasites infectieux sera donc surestimée. Les méthodes basées sur l'inclusion et l'exclusion de marqueurs souffrent de la non-spécificité des colorants dits vitaux.

Plusieurs méthodes de biologie moléculaire ont été décrites pour étudier la viabilité des parasites. La majorité est basée sur la détection de l'ARN, produit uniquement par des cellules métaboliquement actives, par RT-qPCR, hybridation *in situ* de sondes fluorescentes (FISH) et amplification isothermale (NASBA). Cependant, le principal problème est la stabilité de l'ARN qui reste détectable même dans des parasites non infectieux. Par conséquent, ces méthodes peuvent surestimer le nombre d'oocystes et kystes viables et potentiellement infectieux, et par conséquent surestimer l'exposition des humains aux parasites infectieux.

Une stratégie prometteuse, reposant sur l'utilisation de marqueurs intercalants d'acides nucléiques tels que le traitement au monoazoture d'éthidium ou de propidium (EMA ou PMA) couplée à un système PCR, a été décrite. Cette méthodologie a été largement appliquée aux bactéries, au virus, aux champignons et récemment aux parasites en particulier sur les oocystes de *Cryptosporidium* spp. et les kystes de *G. duodenalis* dans des échantillons d'eau. Jusqu'à présent, aucune étude n'a décrit ce type d'approche pour détecter la viabilité des oocystes de *T. gondii*, ni la viabilité des trois protozoaires dans des matrices alimentaires.

Tous les tests de viabilité sont basés sur l'évaluation de paramètres physiologiques distincts qui peuvent varier selon les traitements appliqués, les protozoaires concernés et leur état physiologique d'origine. Par conséquent, les futures recherches devraient se concentrer sur la caractérisation de l'effet des méthodes d'inactivation sur la structure et le métabolisme des oocystes et des kystes afin de pouvoir sélectionner et développer des techniques appropriées pour la mesure de l'infectiosité.

Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne stages (cysts/oocysts) of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii*: a review of methods

Angélique Rousseau^{1,2,5}, Stéphanie La Carbona^{2,*}, Aurélien Dumètre³, Lucy J. Robertson⁴, Gilles Gargala⁵, Sandie Escotte-Binet¹, Loïc Favennec⁵, Isabelle Villena¹, Cédric Gérard⁶, and Dominique Aubert¹

¹ EA 3800, Protozooses transmises par l'alimentation, Laboratoire de Parasitologie Mycologie, Université de Reims Champagne Ardenne, Faculté de Médecine, SFR Cap Santé Fed 4231, 51 Rue Cognacq Jay, 51096 Reims, France

² ACTALIA Food Safety Department, 310 Rue Popielujko, 50000 Saint-Lô, France

³ Aix Marseille Univ, IRD (Dakar, Marseille, Papeete), AP-HM, IHU-Méditerranée Infection, UMR Vecteurs – Infections Tropicales et Méditerranéennes (VITROME), Marseille, France

⁴ Department of Food Safety and Infection Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Norwegian University of Life Sciences, PO Box 8146 Dep., 0033, Oslo, Norway

⁵ EA 3800, Protozooses transmises par l'alimentation, Laboratoire de Parasitologie Mycologie, Université de Rouen, 76183 Rouen Cedex, France

⁶ Food Safety Microbiology, Nestlé Research Center, PO Box 44, CH-1000 Lausanne 26, Switzerland

Received 22 September 2017, Accepted 9 February 2018, Published online

Abstract– *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Toxoplasma gondii* are protozoan parasites that have been highlighted as emerging foodborne pathogens by the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization. According to the European Food Safety Authority, 4786 foodborne and waterborne outbreaks were reported in Europe in 2016, of which 0.4% were attributed to parasites including *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Trichinella*. Until 2016, no standardized methods were available to detect *Giardia*, *Cryptosporidium* and *Toxoplasma* (oo)cysts in food. Therefore, no regulation exists regarding these biohazards. Nevertheless, considering their low infective dose, ingestion of foodstuffs contaminated by low quantities of these three parasites can lead to human infection. To evaluate the risk of protozoan parasites in food, efforts must be made towards exposure assessment to estimate the contamination along the food chain, from raw products to consumers. This requires determining: (i) the occurrence of infective protozoan (oo)cysts in foods, and (ii) the efficacy of control measures to eliminate this contamination. In order to conduct such assessments, methods for identification of viable (i.e. live) and infective parasites are required. This review describes the methods currently available to evaluate infectivity and viability of *G. duodenalis* cysts, *Cryptosporidium* spp. and *T. gondii* oocysts, and their potential for application in exposure assessment to determine the presence of the infective protozoa and/or to characterize the efficacy of control measures. Advantages and limits of each method are highlighted and an analytical strategy is proposed to assess exposure to these protozoa.

Key words: Viability, Infectivity, *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Toxoplasma*, Risk assessment, Food, Methods

Résumé – Estimation de la viabilité et infectiosité des stades (kystes et oocystes) de *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. et *Toxoplasma gondii* transmis par la nourriture et l'eau : une revue des méthodes. *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. et *Toxoplasma gondii* sont des parasites protozoaires qui ont été soulignés comme agents pathogènes émergents dans les aliments par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et l'Organisation Mondiale de la Santé. Selon l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments, 4786 épidémies d'origine alimentaire et hydrique ont été enregistrées en Europe en 2016, dont 0.4% ont été attribuées à des parasites, incluant *Cryptosporidium*, *Giardia* et *Trichinella*. Jusqu'en 2016, aucune méthode standardisée n'était disponible pour détecter les kystes de *Giardia* et les oocystes de *Cryptosporidium* et *Toxoplasma* dans les aliments. Aucune réglementation n'est donc proposée concernant ces dangers. Cependant, compte tenu de leur faible dose infectieuse, l'ingestion d'une quantité

*Corresponding author: s.lacarbona@actalia.eu

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

d'aliments faiblement contaminés peut entraîner une infection de l'homme. Pour évaluer le risque lié aux protozoaires dans les aliments, des efforts doivent être faits dans l'évaluation de l'exposition pour estimer la contamination le long de la chaîne alimentaire, depuis la matière première jusqu'aux consommateurs. Cette évaluation nécessite de déterminer : (i) la prévalence de parasites infectieux dans les aliments, (ii) l'efficacité des mesures de maîtrise pour éliminer cette contamination. Pour mener une telle évaluation, des méthodes capables d'identifier des parasites viables (vivants) et infectieux sont requises. Cette revue décrit les méthodes actuellement disponibles permettant d'évaluer l'infectiosité et la viabilité des kystes de *G. duodenalis* et des oocystes de *Cryptosporidium* spp. et *T. gondii*, et leur potentiel pour être appliquées dans l'évaluation de l'exposition pour déterminer la présence de parasites infectieux et/ou caractériser l'efficacité des mesures de maîtrise. Les avantages et limites de chaque méthode sont présentés et une stratégie d'analyses est proposée pour évaluer l'exposition à ces protozoaires.

1 Introduction

Giardia duodenalis and *Cryptosporidium* spp. are enteric parasites of humans and various other mammals [205,206]. Their cysts and oocysts are usually excreted in high numbers in the feces of infected hosts (e.g., up to 10^9 *Cryptosporidium* oocysts per gram of calf feces) and are immediately infectious upon excretion without requiring a period of development in the environment. Oocysts of the coccidian parasite *Toxoplasma gondii* are shed exclusively in the feces of felids. One infected cat can excrete millions of non-sporulated oocysts shortly after infection [56]. Oocysts become infectious for humans and other warm-blooded animals by sporulation one to five days later, depending on aerobic and temperature conditions [57]. *Giardia duodenalis* cysts, and *Cryptosporidium* spp. and *T. gondii* oocysts can be encountered in different terrestrial and aquatic ecosystems where they can persist for months, possibly years. In addition, these parasites are extremely resistant to many chemical and physical inactivation agents [59]. The cysts and oocysts of these parasites can be transmitted to humans by the fecal-oral route, directly by contact with contaminated hosts (animals or humans depending on the parasites), or indirectly by the waterborne or foodborne routes. Consistent with this, *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. accounted for the largest waterborne outbreaks reported between 1998 and 2012 in the European Nordic countries, with more than 50,000 persons infected, although Caliciviruses and *Campylobacter* were the pathogens most frequently involved [95]. Concerning worldwide waterborne outbreaks due to parasitic protozoa, *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. are the most commonly reported etiological agents [61]. *T. gondii* oocysts have been responsible for waterborne outbreaks to a lesser extent, being responsible for 2% of parasitic protozoan outbreaks between January 2004 and December 2010 [16,120]. However, due to the usually non-acute nature of infection with *Toxoplasma*, the number of waterborne infections associated with this parasite is probably underestimated. In 2016 in Europe, 4786 food-borne outbreaks, including waterborne outbreaks, were reported, of which 0.4% were due to parasites including *Cryptosporidium*, *Giardia* and

Trichinella [60]. However, this number may be underestimated considering the large number of outbreaks where the causative agent remains unknown (36%). For the foodborne route, fruits and vegetables, in particular those consumed raw or minimally processed, are probably of greatest relevance [155,175]. Waters used to irrigate fruits and vegetables can be contaminated by *Cryptosporidium* spp., *G. duodenalis*, and *T. gondii* [10,39,147,161,207]. Foods can also be contaminated by oocysts and cysts due to poor hygiene conditions during transformation or preparations, through food handlers, surfaces, or equipment [64,72]. Concerning *T. gondii*, food transmission is more likely through ingestion of cysts in raw or undercooked meat but this is now considered to be a less predominant source of infection in certain areas or populations [31,201].

The low infectious dose for these protozoan parasites means that the associated risk to public health is increased. The ID₅₀ (number of oocysts required to infect 50% of exposed people) was estimated to be between 10 and 83 oocysts in healthy adults for *C. hominis* [40], and < 10 to 2000 oocysts for different strains of *C. parvum* [170,204]. Similarly, 10 to 100 cysts of *G. duodenalis* can lead to symptomatic parasitic disease [180]. *Giardia* and *Cryptosporidium* infections cause mild to severe recurrent diarrhea or intestinal disorders, and *Cryptosporidium* is one of the four pathogens involved in most of the cases of diarrhea in children younger than 5 years in low-income countries [130]. For *T. gondii*, the ID₅₀ is estimated between 1 and 10 oocysts in rodent models [56]. In immunocompetent individuals, infections are usually asymptomatic, resulting in the formation of latent cysts in tissues and organs throughout the body [182]. Infections can, however, sometimes lead to severe ocular, cerebral, or multivisceral complications, especially in congenitally infected infants and in immunocompromized people. Along with the immunity status of the host, the genetic type of *Toxoplasma* is also relevant regarding the development of clinical disease.

Risk assessment in foods includes four components: hazard identification, exposure assessment, hazard characterization, and risk characterization [65]. The oocyst and cyst stages of *Cryptosporidium*, *T. gondii* and *Giardia*

are now recognized as hazards in some foodstuffs, and data are available concerning their characterization. Efforts should now focus on determining exposure assessment. This step includes the estimation of the presence of infective protozoa and their amounts in foods along the food chain. For *Cryptosporidium* and *Giardia* (oo)cysts, exposure assessment is partially addressed through the species/genotypes and genetic assemblages, respectively. Indeed, only some species and/or genotypes of *Cryptosporidium* spp. are pathogenic in humans [167,174]. For *G. duodenalis*, only assemblages A and B are responsible for the vast majority of human infections [206]. In addition to these taxonomic data, information on the infectivity of (oo)cysts is also critical to establish the public health significance of protozoan transmission stages in the environment. However, the Standard Method now available for detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in fresh produce [112] is based on immunofluorescence assay microscopy that does not provide this level of information, and neither do other methods that are based on molecular biology detection. These methods have been used to detect these three protozoa in different types of food [4,105,151]. Thus, a rapid and efficient method to distinguish infective (oo)cysts from non-infective (oo)cysts is needed for exposure assessment. Although both *in vitro* and *in vivo* methods have been developed to evaluate the viability and infectivity of the (oo)cysts of these parasites, currently none of these seem to be suitable for routine application in the water and food industries. *In vitro* methods include parasite excystation, fluorogenic dye inclusion/exclusion coupled with DNA amplification or not, ability to invade cells and replicate within, reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) of specific gene targets, and fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *In vivo* methods consist of animal infectivity assays.

This paper aims to describe the different methods currently available to determine the infectivity and viability of *G. duodenalis* cysts, and *Cryptosporidium* spp. and *T. gondii* oocysts. An infectious *Giardia* cyst is defined as a viable cyst that is able to release its trophozoites, which can then multiply under appropriate culture conditions. An infectious oocyst of *Cryptosporidium* spp. or *T. gondii* is defined as a viable (oo)cyst that is able to excyst and release its sporozoites, which can then infect host cells and differentiate within into a replicative stage. In comparison, a viable (oo)cyst is defined as being alive but not necessarily infective because its trophozoites/sporozoites would fail to replicate in the host or to cause infection in susceptible cells. The implementation of these methods in the framework of exposure assessment in food is also presented according to two main objectives: i) determining the occurrence of infective parasites in naturally contaminated samples; and ii) determining the efficacy of control measures. Advantages and limitations of each method are described in order to propose an analytical strategy to address component three of risk evaluation in foods, i.e. assessing exposure to these infective parasites.

2 Evaluation of infectivity

2.2 Bioassay

The bioassay method consists of inoculating (oo)cysts into animals in order to observe an infection. This represents the gold standard to study (oo)cyst infectivity. For each parasite, several models and methods are described. However, as well as being extremely expensive, the use of animals raises major ethical concerns that complicate bioassay applications and should be limited.

2.2.1 *Cryptosporidium* spp.

Animal models, including calves, neonatal mice, pigs and lambs, have shown that *Cryptosporidium* spp. and strains vary in their ability to cause symptomatic infections in various hosts. Models include drug-immunosuppressed and immunodeficient rats [32,179] and mice (SCID, knockout) [21,38,94,156,177,212,230], pigs [101], and gnotobiotic piglets [223,224]. However, the relevance to human infections of infectivity data in animals is unclear. Neonatal mouse models are becoming the reference rodent models for the detection of infectious *C. parvum* oocysts, allowing the determination of the ID₅₀ or the lowest infectious dose (LID) required to establish infection. Neonatal BALB/c [11,169] and NMRI suckling mice [49,227] are considered the most appropriate models to evaluate *C. parvum* infectivity, but other models have been used (e.g., CD-1/ICR [73] and ARC/Swiss [102]). By standardizing laboratory methods and data analysis, Korich et al. [128] obtained reproducible results in inter-laboratory trials using CD-1 neonatal mice. The method to assess infectivity involves quantifying the number of oocysts observed in the intestine [73] or in the feces [103]. In terms of sensitivity, for some experiments and models, a single oocyst can be recognized as infectious using this approach [49,228]. However, because bioassays often use different animals or strains of neonatal mice, different strains of *C. parvum*, and/or different methods to detect the infection, such studies have often produced contradictory results [188,194]. Most of the animal models are not susceptible to infection by *C. hominis* or by the other species that sporadically infect humans (particularly immunocompromised individuals) such as *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis* and *C. cuniculus*. The only animal models, to date, for *C. hominis* infection are the gnotobiotic pig model [224,225] and the immunosuppressed Mongolian gerbil model [14]. Mouse models allow identification of infective *C. parvum* oocysts in water and shellfish samples, and have been relatively widely used to determine inactivation efficacy of chemical and physical treatments in a simple matrix, but also in different types of food matrices (beverages and solids) (Table 1).

2.2.2 *Giardia duodenalis*

Few rodent animal models have been described for the evaluation of the infectivity of human isolates of *G. duodenalis*, i.e. genetic assemblages A and B. These

Table 1. Methods to determine (oo)cyst infectivity and their application in exposure assessment.

Methods	Parasites	Applications	
		Detection in naturally contaminated samples	Determination of the efficacy of control measures ^a
Bioassays – Ability of (oo)cysts to induce infection of animals	Cp	River water [210] Wastewater [109] Mussels, clams, oysters, cockles [67,69,70,71,88,90,143]	Simple matrix^b: H ₂ O ₂ -based disinfectants [176] Chlorine dioxide [198] Ozone [141,187], ozone + monochloramine/+ chlorine [27,28] Salinity: 10, 20 and 30 ppt of salt at 10 °C or 20 °C (12 w) [68] UV [11,46,148,154,187,195,198] US [172] Pasteurization [99] Storage 15 °C (9 m) [115] Storage 4 °C and 10 °C (8 w) [142] Storage –10 °C to + 35 °C (24 w) [68] Food matrix: UV – Fresh apple cider [98] PUV – Raspberries [131] HHP, e-beam, microwaves – Oysters [42,43] Heat (steam cooking) – Mussels [91] Pasteurization – Milk [99] Storage 6 °C (4 w) – Apple [150]
	G	Wastewater [82,109,140] Raw and chlorinated drinking water [111]	Simple matrix: Ozone [74] UV [37,139,140,154,196] Gamma irradiation [203]
	T	Water [12,110,219] Oysters, mussels [63]	Simple matrix: Chlorine [222] Ozone [59,222] UV [59,220,223] HHP [145] Gamma-irradiation [55] Radiofrequency [221] Storage –10 °C to 70 °C (up to 54 m) [53] Food matrix: HHP – Raspberries [146] Storage 4 °C (up to 8 w) – Raspberries and blueberries [126]
Cell culture infection – Ability of (oo)cysts to invade and infect cells	Cp	Wastewater [85] Water [133,190]	Simple matrix: Chlorine [15,193], Chlorine dioxide [198], MOS [122] Ozone [122,187] UV [83,122,123,186,187,195,198] Heat 38 °C to 70 °C [193] Storage 15 °C (9 m) [115] Food matrix: Organic acids and hydrogen peroxide – Fruit juices [127]
	Ch	NA	Simple matrix: UV [118]
	T	NA	Simple matrix: Chlorine [218] Iodophore-based disinfectants, formalin, acidified ethanol [218] Ozone [59] UV [59,223]

^a Relevant for water and food industries;^b Simple matrix: water or buffer.NA: No available data. Cp: *C. parvum*; Ch: *C. hominis*; G: *Giardia duodenalis*; T: *Toxoplasma gondii*.H₂O₂: hydrogen peroxide; MOS: mixed-oxidant solution; UV: ultraviolet; PUV: pulsed-ultraviolet; HHP: high hydrostatic pressure; US: ultrasound; m: months; w: weeks.

assemblages are not naturally able to infect mice and rats [132,232], but inoculation of trophozoites, and not cysts, can still lead to infection of these animals (only neonatal ones, however) [41,137]. Mongolian gerbils appear to be the only model enabling the assessment of cyst infectivity and are also suitable to explore giardiasis symptoms and clinical resistance [18]. In this model, cyst shedding seems discontinuous and infection is usually assessed by determining the presence of trophozoites in the small intestine by microscopy 7 to 10 days after parasite inoculation [2,137]. *G. duodenalis* genetic assemblages A, B and E have all been used to infect gerbils, although assemblage E is less virulent [23]. This technique has been applied to evaluate the efficacy of physical (UV and gamma irradiations) and chemical (ozone) treatments on cysts in a simple matrix, and to assess the exposure of humans to infective cysts in naturally-contaminated samples (Table 1).

2.2.3 *Toxoplasma gondii*

A review of the relationship between seroprevalence in the main livestock species and presence of *T. gondii* in meat analyzed the data from studies providing a direct comparison of two or more direct detection methods into a performance matrix [171]. It was clear from this that the cat bioassay performs best, followed by the mouse bioassay. However, the bioassay in cats is performed in very few laboratories because of the difficulty in implementing an assay with considerable associated ethical issues; therefore, Swiss Webster and SCID mice are the main animal models to assess infectivity of *T. gondii* oocysts [54,56,119], SCID mice being the most sensitive. Mice are tested for *T. gondii* seroconversion four weeks post-infection and brain preparations are then examined for tissue cysts by microscopy [219]. Such models have been used to evaluate the presence of infective oocysts in water and shellfish samples (Table 1), and to estimate infectivity of oocysts in soil [136]. Bioassays were also successfully used to evaluate the efficacy of different treatments (e.g., oxidants, UV, high hydrostatic pressure) and the impact of storage time and temperatures on the infectivity of oocysts in simple matrices or adhering to the surface of raspberries and blueberries (Table 1).

To summarize, animal models have been reliably used to evaluate the exposure of humans to infective parasites and can be applied to foods. However, these methods suffer from limitations, the major one being ethical concerns, but also definition of a suitable animal model, lack of reliability when low numbers are used, and expense (Table 3). These disadvantages challenge the scientific community to develop and investigate alternative methods to accurately assess infectivity.

2.3 Cell culture infection

2.3.1 *Cryptosporidium* spp.

Investigators have turned to cell cultures as a model for *Cryptosporidium* infection to avoid the problems associated with animal models. Multiple cell lines support

Cryptosporidium replication, and complete life cycle development has been established in several of them [35,214]. Human cell lines are of particular interest, since they can support the development of *C. parvum* and *C. hominis* parasites. These cell lines are highly relevant for human infections as oocyst infectivity and dose-response relationships can easily be studied, and some aspects of *Cryptosporidium* pathogenicity, such as cell damage and barrier permeability, can also be examined. Human enterocytes HCT-8 are currently the model of choice for evaluating oocyst infectivity because they are relatively easy to maintain and support infection with low oocyst numbers [214]. Moreover, the results obtained with HCT-8 cell lines have been shown to have a better correlation with the neonate BALB/c and CD-1 mouse models than those obtained with Caco-2 and MDCK cell lines [187,198]. A non-carcinoma, human small intestinal epithelial cell type, named FHs 74 Int has been described as exhibiting higher levels of infection susceptibility compared with other cell types [216]. A recent study described a further cell line (COLO-680N) as a cell-culture platform that is easy-to-handle and enables the long-term sustainable production of infective oocysts at a laboratory scale, and is presumed will provide a valuable tool for viability assessment as well as other investigations [159].

Cell cultures can be inoculated with whole purified oocysts, mixtures of intact and excysted oocysts, and free or purified sporozoites. Numerous studies have tried to improve the success of cell culture assays by pre-activation of oocysts with bile salts [124], improving culture medium composition [122,213], and favoring sporozoite-host cell contact by centrifugation before co-culture [125]. Compared with PCR and RT-qPCR [51,133], fluorescent labeling and enumeration of developing parasitic foci in cell monolayers is one of the simplest and the most reliable ways to assess oocyst infectivity [117,190,197]. It has been shown that an electrical impedance-based device is able to provide insights on *Cryptosporidium* development in HCT-8 cell cultures. By quantifying the magnitude of the impedimetric response, this device can be used as an infectivity sensor as early as 12 h post-infection [52]. Cell culture assays have been reported to achieve a sensitivity of one single infectious oocyst and are unlikely to be subject to false-positive results [117]. However, no data are available for species other than *C. parvum* and *C. hominis*.

Cell-culture assays have been used to assess the exposure of humans to infective *Cryptosporidium* spp. oocysts in various types of environmental water samples (Table 1), although in the most recent large waterborne outbreaks of cryptosporidiosis, they do not appear to have been applied [22,50]. This approach also seems relevant to assess the efficacy of control measures that can be used in food industries (i.e. oxidants, organic acids, heating or storage at 2-8 °C) in simple matrices and in fruit juices, but it has not been extensively applied in foods (Table 1).

2.3.2 *Giardia duodenalis*

Two studies have described *in vitro* cell culture of *G. duodenalis* combined with PCR or RT-PCR assay

[8,84]. However, as *Giardia* is not an intracellular parasite and can be successfully cultivated in the absence of other cells (i.e., axenic culture), the value of such an assay to assess the infective potential is unclear.

2.3.3 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii parasites can multiply in virtually any nucleated cell types; however, only murine L20B fibroblasts and human foreskin fibroblasts (HFF) cells have been used to determine the impact of UV, oxidants and other chemicals on oocysts in simple matrices, combined with microscopy to detect tachyzoite foci (Table 1). To date, there seems to have been no application of this method to food matrices.

In conclusion, cell culture appears to be a good alternative method to bioassays for those parasites that are intracellular, showing a good correlation with infectivity for both *Cryptosporidium* and *T. gondii* oocysts. Thus, this technique has the potential to provide reliable estimates of exposure to infective protozoa from field to fork. Nevertheless, application of this method on complex food matrices has still not been described (Table 3). Due to its shorter time-to-results than bioassays and its reported ability to detect as few as one infective oocyst (*C. parvum*), this method should be of interest in prospective occurrence investigations. However, for retrospective investigations, when hazards are detected in foods or in case of foodborne outbreaks, more rapid results are essential so that contaminated foods can be removed from the market.

3 Evaluation of viability

Evaluation of viability means determining whether (oo)cysts are alive. However, living, intact, metabolically functional (oo)cysts are not necessarily infective, because their trophozoites/sporozoites can fail to cause infection of their hosts. Hence, to obtain a reliable assessment of the exposure of humans to infective parasites, methods to measure viability are of greatest use if they correlate with the results from infectivity assays. If such a correlation is not established, then detection of viable (oo)cysts does not mean that infective parasites are present, and thus any risk may be overestimated. It thus follows, in using such an assay to determine the efficacy of a treatment process, the effectiveness of the process may be underestimated or the process may be wrongly considered non-effective. In contrast, if false negatives are found, or the method has a poor recovery performance, the population of infective (oo)cysts may be underestimated. In these latter cases, the efficacy of a particular process could be overestimated, and the subsequent risk posed to the population underestimated. In terms of food safety, it is generally considered preferable to use an assay that may overestimate the risk (and underestimate process efficacy), than the other way around, as this conservative approach (“worst-case scenario” approach) ensures that the public health risk is minimized.

3.1 Changes in morphology and physical properties

Any visible modification in the morphology, wall integrity, and internal content of the cysts and oocysts may indicate a loss of viability at the single parasite level. Cysts and oocysts with shape deformation, openings in their walls, and/or filled with a granular content with no evidence of intact sporozoites (*C. parvum* and *T. gondii*) or internal bodies (*G. duodenalis*), likely represent non-viable parasites that can be observed microscopically [215]. Non-invasive methods have been described to determine the viability of the oocysts and cysts as a function of their size, morphology and surface electric charges. For instance, electrorotation is a qualitative technique that can be used to detect changes in the morphology and physicochemical properties of microorganisms subjected to an electric rotating field. This approach has been successfully used to investigate the viability of *C. parvum* [86,87] and *G. intestinalis* [47], and the sporulation state of *Cyclospora cayetanensis* which is closely related to *T. gondii* [47]. More recently, microfluidic devices have been designed to measure the size and deformability of *C. parvum* and *C. muris* oocysts by force spectroscopy [153]. This method has been reported to reliably discriminate *C. parvum* from *C. muris* oocysts, and viable from heat-killed *C. parvum* oocysts based on the deformability properties of the oocysts. Such methods could be useful for evaluating the viability of *C. parvum* oocysts in environmental samples with low backgrounds, such as drinking water. However, the use of these methods has not yet been widely adopted, if at all, and their use in the framework of exposure assessment in foods has not been investigated. As the structure and physico-chemical properties of (oo)cysts may be modified in the environment, including in food matrices, and following stressing treatments [160], without affecting viability, it seems unlikely that electrorotation and other biophysical methods will develop beyond being research tools.

3.2 Excystation assays

It is generally assumed that parasites able to excyst *in vitro* are viable and likely to be infectious. In order to induce excystation and release of sporozoites (*Cryptosporidium* and *T. gondii*) and trophozoites (*Giardia*), several treatments have been described that are based upon mimicking the conditions that the parasite would encounter *in vivo* in a susceptible host. Thus, *C. parvum* oocysts can be incubated at 37°C in solutions containing trypsin with or without sodium taurocholate, or surfactants (sodium dodecyl sulfate) [36,66,178], but excystation rates can vary depending on the dose, time and pre-treatment temperature [124]. Pre-treating *C. parvum* oocysts with acidic and sodium hypochlorite solutions can enhance excystation of the sporozoites [36,184]. An excystation assay has also been described for *C. muris* [157]. Due to the additional presence of sporocysts in *T. gondii* oocysts, sporozoite excystation first requires opening of the oocyst wall, which is usually achieved *in*

vitro by physical means (sonication or bead beating), then disruption of the sporocyst wall following incubation in digestive solution containing bile salts [79]. Standard protocols for excystation of *Giardia* trophozoites from cysts have been available for many decades [25,26,100,181] and tend to use two sequential steps, a low-pH induction step (using, for example, acidified saline solutions at pH 2-2.7, often supplemented with L-cysteine hydrochloride and glutathione), followed by an excystation step in which the cysts are exposed to a medium such as trypsin in Tyrodes solution at pH 8. Bile supplementation may also be used. However, successful *in vitro* excystation is assemblage-dependent, and researchers often struggle to achieve excystation when working with non-laboratory adapted field strains [211].

Excystation is measured as the percentage of excysted (oo)cysts determined by phase contrast microscopy, or qPCR assays [173]. In order to differentiate between excystation and “bursting” of the oocysts due to stress, it is important, for *Cryptosporidium* at least, that active sporozoite ratios are also determined. Sporozoites that have failed to excyst can be visualized inside the oocysts with a DNA binding dye, such as 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) [36]. The excystation method requires a large number of purified (oo)cysts, and an insufficient number may occur when investigating naturally contaminated samples. Consistent with this, only one study reported the use of excystation assays to assess exposure to infective *C. parvum* in drinking water (Table 2). In most studies evaluating the impact of oxidants or UV on *Cryptosporidium* and *Giardia* (oo)cysts, excystation does not correlate with infectivity assays (Table 2). Indeed, the ability of the parasites to excyst does not necessarily mean that the parasites will complete their development in the host. Thus, excystation methods overestimate the exposure of humans to infective parasites, and treatments that do not kill the parasites but cause them to become no longer infectious to cells, may have their inactivation credit underestimated. However, in contrast, *in vitro* excystation may also overestimate inactivation efficacy should substantial numbers of viable (potentially infectious) (oo)cysts fail to excyst when subject to a particular protocol, but nevertheless still remain infective for animals [108]. The same overestimation could also occur should excysted sporozoites of *C. parvum* rapidly lose their viability *in vitro* [152].

To conclude, despite there being a good correlation with the viability measure based on vital dyes exclusion (PI), excystation assays have many limitations and cannot be considered as an appropriate method to assess the risk of infection associated with exposure to parasites detected in food (Table 3).

3.3 Viability assays using dyes for live and dead cells

A commonly used approach to assess viability is to use inclusion and exclusion of specific dyes, often known as

vital dye assays, as colored markers of viability. The dye inclusion or exclusion can be evaluated by microscopy (fluorescence microscopy, if the dye used is fluorescent). As each cell (or parasite) can be coded individually according to its dye uptake/activation or exclusion, the assay can be applied to individual parasites or low numbers. If large numbers of parasites are used, then flow cytometry or cell sorting can be used [164]. Relatively few experiments have investigated the use of such dyes for investigating the viability of *Toxoplasma* oocysts, and the double walls of oocysts and sporocysts indicate that uptake of dyes into these oocysts may be more complex. In addition, the characteristic autofluorescence occurring with *T. gondii* oocysts may act as a confounder [58].

3.3.1 Dye exclusion methods

These methods are based on dyes that can penetrate selectively into cells that have lost their membrane integrity and are excluded by live cells, thus these dyes stain parasites that are dead. Dyes that have been used successfully for this assessment include non-fluorescent dyes such as trypan blue [202], and fluorescent dyes such as eosin, ethidium bromide (EB), ethidium monoazide (EMA), propidium monoazide (PMA), and propidium iodide (PI). EB has been extensively used as a DNA intercalating agent, emitting red fluorescence in the dead cells [229], as well as PI. EMA and PMA, both similar to EB and PI respectively, display an azide group, allowing cross-linkage to DNA upon light exposure, but the main limit of EMA is that it can penetrate into intact cells [168].

Trypan blue stain has been used to assess the effect of household disinfectants on protozoan parasites contaminating fresh produce, including *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts, with preliminary results supported by infection studies [62]. PI has been successfully applied to assess the viability of *C. parvum* oocysts in such complex food matrices as shellfish [78]. This dye probably remains the most commonly used and thus, only studies referring to PI are reviewed in Table 2. Whereas PI assays have been shown to correlate with *in vitro* excystation of *C. parvum* oocysts [36], and have been widely used in studies in which natural die off in the environment is measured, for investigation of the use of oxidants and UV, PI staining of *C. parvum* and *Giardia* (oo)cysts in simple matrices tends not to correlate with infectivity (Table 2). This is probably due to the method by which these decontamination treatments interact with the parasite DNA.

One major limitation of dye-exclusion approaches is that a cell can have an intact membrane but will nevertheless be non-viable. Thus, parasites that are non-viable but have an intact membrane will not stain with those dyes. Hence, dye-exclusion technique leads to the overestimation of the exposure of humans to infective parasites and to the underestimation of the efficacy of control measures.

Table 2. Methods to determine (oo)cyst viability and their application in exposure assessment.

Methods	Parasites	Applications			
		Detection in naturally contaminated samples	Agreement with infectivity assays	Determination of the efficacy of control measures ^a	Agreement with infectivity assays
Excystation Ability of trophozoites / sporozoites to escape from the cysts / oocysts after stimulation	Cp	Drinking water [80]	NA	Simple matrix^b: H ₂ O ₂ -based disinfectants [176]	–
				Chlorine [29], Chlorine dioxide, Monochloramine [129]	–
				Ozone [29,34,73,129]	–
				Ammonia [116]	–
				Liming, alum and ferric sulfate floccing [183]	NA
				UV [77,89,123,154,158]	–
				Freezing [183]	NA
				Storage at 4 °C and 10 °C (8 w) [142]	–
				Dessication [183]	NA
					G
				UV [84]	–
				Storage at 4 °C (up to 56 d) [25]	NA
Vital dye-exclusion (propidium iodide) Ability of cells to exclude the dye (membrane intact cells) & staining of dead cells	Cp	Wastewater [6] Surface water [190] Marine water [191] Drinking water [6] Cockles, mussels, clams [90] Oysters [90,191]	NA – [§] NA NA NA NA	Simple matrix: H ₂ O ₂ -based disinfectants [176]	–
				Chlorine [29]	–
				Ozone [29,34]	–
				Ammonia [116]	–
				Liming, alum and ferric sulfate floccing [183]	NA
				UV [77,89,154,158]	+ / –
				Freeze-thaw [121]	NA
				Freezing [183]	NA
				Storage 4 °C and 20 °C (12 w) [166]	NA
				Dessication [183]	NA
	G	Drinking and wastewater [6]	NA	Simple matrix: UV [37,84,162]	–
				Gamma radiation [203]	–
				Storage 4 °C (up to 56 d) [24]	NA
RT-PCR Ability of cells to produce mRNA	Cp	NA	NA	Simple matrix: H ₂ O ₂ [hsp70] [144]	NA
				Chlorine, Chlorine dioxide, MOS [hsp70, β -tubulin] [15,97]	–
				Ozone [hsp70] [97]	NA
				Ammonia [hsp70] [144]	NA
				Heat 60 °C to 95 °C [hsp70] [97,209]	–
				Freeze [hsp70] [97]	NA
				Storage 15 °C (9 m) [cpag] [114,115]	+ / –
				Storage 4 °C (48 m) [hsp70] [144]	NA
				Storage RT and 4 °C (20 to 39 w) [β -tubulin] [226]	+
				Food matrix: Storage 4 °C (8 d) – Basil [hsp70] [104]	NA
	G	Wastewater [17,24]	NA	Simple matrix: Heat 60 °C to 95 °C [β -giardin] [209]	–
				Food matrix: Storage 4 °C (8 d) – Basil [β -giardin] [104]	NA

Table 2. (continued).

Methods	Parasites	Applications			
		Detection in naturally contaminated samples	Agreement with infectivity assays	Determination of the efficacy of control measures ^a	Agreement with infectivity assays
	T	NA	NA	Simple matrix: Chlorine-based disinfectant [<i>sporoSAG</i> , <i>ACT1</i>] [218] Acidified ethanol and iodophore-based disinfectant [<i>sporoSAG</i> , <i>ACT1</i>] [218] Formalin [<i>sporoSAG</i> , <i>ACT1</i>] [218] UV [<i>sporoSAG</i> , <i>ACT1</i>] [223] Heat 60 °C to 80 °C [<i>sporoSAG</i> , <i>ACT1</i>] [209,218] Food matrix: Storage 4 °C (8 d) – Basil [<i>sporoSAG</i>] [104]	+ + – – – NA
FISH Ability of cells to produce rRNA	Cp	Water [138] Oysters [93]	NA NA	Simple matrix: Gamma irradiation [185] Storage 15 °C (9 m) [93]	NA –
	G	Water [138]	NA	NA	NA
PMA-PCR Ability of cells to exclude PMA (membrane intact cells) & no amplification in dead cells	Cp	Water [149]	NA	Simple matrix: H ₂ O ₂ [144] Ammonia [144] Heat 70 °C [33] Storage at RT (14 m) [33] Storage 4 °C (up to 48 m) [<i>hsp70</i>] [144]	NA NA NA NA NA
	G	Water [149]	NA	NA	NA

^a Relevant for water and food industries;

^b Simple matrix: water or buffer.

NA: No available data. Cp: *C. parvum*; G: *Giardia duodenalis*; T: *Toxoplasma gondii*.

H₂O₂: hydrogen peroxide; UV: ultraviolet; RT: room temperature; m: months; w: weeks; d: days.

(–): no agreement with infectivity assays means that: i) viability and infectivity assays are not concordant (i.e. viability (+) and infectivity (–), and conversely (rarely)); ii) and/or lower inactivation levels or no inactivation are measured by viability assays compared to infectivity assays.

(+): viability and infectivity assays are concordant.

(+/-): agreement with infectivity varies according to studies

§: 12/15 samples showed no correlation with cell culture assays.

3.3.2 Dye inclusion/exclusion methods

In order to overcome some of the deficiencies of the dye exclusion technique, inclusion-exclusion methods have been developed in which viable cells, as well as excluding specific dyes, also include specific dyes, and the dyes are used simultaneously in an inclusion-exclusion assay. One approach is to incubate cells with a non-fluorescent dye. These diffuse into living cells and then, following cleavage by intracellular enzymes present only in live cells, a fluorescent molecule is produced which is then detected. One such dye is fluorescein diacetate (FDA), which is nontoxic for many cell types [189], and is a substrate for a cell-permanent esterase leading to the production of fluorescein, which accumulates in live cells only if their membrane is intact, and exhibits green fluorescence when excited by blue light, indicating a viable cell. This was

suggested to be used in conjunction with PI as an exclusion-inclusion assay for *Giardia muris* cysts, as a model for *G. duodenalis* [192]. Unfortunately, however, further investigation revealed that *G. duodenalis* cysts that stained with PI could also often stain with FDA [199], presumably because of the enzyme remaining active despite the cyst itself no longer being viable. A similar approach has also been followed with the redox dye 5-cyano-2,3-ditoyl tetrazolium chloride (CTC), that should only show staining when the respiratory electron transport system (ETS) shows activity (i.e., the parasite is viable). Although initial studies provided promising results [113], the same type of problem of activity even in dead cells is likely to limit the usefulness of this approach. An alternative approach to these non-fluorescent dyes is the use of dyes that are nuclear intercalates such as SYTO-9, SYTO-17, SYTO-59-64 and hexidium, and DAPI. SYTO-

Table 3. Advantages and limitations of the techniques used to assess infectivity and viability.

Methods	Parasites	Advantages	Limitations
Bioassays [I]	Cp & Ch / G / T	<ul style="list-style-type: none"> - Requires a single (oo)cyst - Application on complex food matrices - Reliable exposure assessment of humans to infective protozoa. - Reliable assessment of inactivation efficacy 	<ul style="list-style-type: none"> - Ethical concerns - Expensive method and labor intensive - Lack of reliability with low numbers of (oo)cysts - Discrimination of large but not fine differences between treatments - Long time-to-results (one week minimum)
Cell Culture [I]	Cp & Ch / T	<ul style="list-style-type: none"> - Correlation with bioassays - Requires a single (oo)cyst - Reliable exposure assessment of humans to infective protozoa - Reliable assessment of inactivation efficacy 	<ul style="list-style-type: none"> - Lack of standardized assays - Medium (48/72h) to long (10 days) time to results - Not applicable to <i>Giardia</i> - No application on complex food matrices
Methods based on morphology and physical properties [V]	C / G	<ul style="list-style-type: none"> - Correlation between electrorotation and PI exclusion method - Rapid - Require a single (oo)cyst 	<ul style="list-style-type: none"> - Require purified (oo)cysts - No data on viability relative to infectivity measure - No application in exposure assessment in food
Excystation [V]	C / G / T	<ul style="list-style-type: none"> - Correlation with PI exclusion method - Rapid - Non-expensive 	<ul style="list-style-type: none"> - Requires large numbers of purified (oo)cysts - Variable excystation rate - Over/underestimation of the exposure of humans to infective protozoa* - Over/underestimation of inactivation efficacy* - No application on complex food matrices
Vital dye exclusion [V]	C / G / T	<ul style="list-style-type: none"> - Correlation with excystation for PI dye (C) - Rapid and relatively simple - Non-expensive - Requires a single (oo)cysts - Application on complex food matrices 	<ul style="list-style-type: none"> - Requires purified (oo)cysts - Few applications for <i>T. gondii</i> - Overestimation of the exposure of humans to infective protozoa* - Underestimation of inactivation efficacy*
RT-PCR [V]	C / G / T	<ul style="list-style-type: none"> - Rapid - Identification of (oo)cysts of human health significance - Easy to standardize - Requires low numbers of (oo)cysts - Application on complex food matrices 	<ul style="list-style-type: none"> - Limit of detection variable depending on matrices - Overestimation of the exposure of humans to infective protozoa* - Underestimation of inactivation efficacy*
FISH [V]	C	<ul style="list-style-type: none"> - Rapid - Non-expensive - Requires a single (oo)cysts 	<ul style="list-style-type: none"> - Requires purified (oo)cysts - Overestimation of the exposure of humans to infective protozoa* - Underestimation of inactivation efficacy* - No application on complex food matrices
NASBA [V]	C	<ul style="list-style-type: none"> - Correlation with PI exclusion method - Rapid - Non-expensive - Requires low numbers of (oo)cysts 	<ul style="list-style-type: none"> - Overestimation of the viable population - Non-quantitative - No data on viability relative to infectivity measure - No application in exposure assessment in food
PMA-PCR [V]	C	<ul style="list-style-type: none"> - Rapid - Requires low numbers of (oo)cysts - Can be coupled to genotyping - Easy to standardize 	<ul style="list-style-type: none"> - Overestimation of the viable population - No data on viability relative to infectivity measure - No application in exposure assessment in food

[I]: infectivity. [V]: viability. C: *Cryptosporidium* spp.; Cp: *C. parvum*; Ch: *C. hominis*; G: *Giardia duodenalis*; T: *Toxoplasma gondii*. Based on the comparison of viability relative to infectivity.

dyes seem to provide viability assay results that correlate with the infectivity of *C. parvum* oocysts to CD-1 mice but not to excystation assays [19,20,165] assessing the efficacy of oxidants, UV and thermal treatments. That said, recent experiments have shown that of seven SYTO dyes investigated, all were more likely to stain dead *Cryptosporidium* oocysts than live oocysts [208], indicating some degree of confusion around use of vital dye stains.

In conclusion, there is considerable confusion and potential for subjectivity regarding dyes used for inclusion. Vital dye exclusion overestimates the exposure of humans to infective protozoa, suggesting that this technique may not be appropriate for exposure assessment. However, given its applicability to foods, its suitability for low numbers of parasites, and its cost-effectiveness, among others advantages (Table 3), it may

provide initial results, particularly when investigating whether individual parasites identified on fresh produce are potentially infectious or whether a treatment is efficient to kill (oo)cysts.

3.4 Molecular methods

3.4.1 RNA-based methods

3.4.1.1 Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)

RT-PCR techniques are emerging as alternatives to the use of vital dyes for evaluating viability. These methods are based on the production of mRNA in cells that are metabolically functional and active, and hence considered as viable.

3.4.1.1.1 *Cryptosporidium parvum*

For *Cryptosporidium* oocysts, RT-PCR assays targeting the *hsp70* gene have been described as being highly sensitive. Indeed, the level of *hsp70* mRNA can be enhanced by heating. This allows increasing the sensitivity especially when working on initial low levels of mRNA or in complex matrices [81]. Other targets have also been described, such as genes encoding β -tubulin [226], amylogluconidase [114], *COWP*, *CP2* or 18S rDNA [135]. However, 18S rRNA remains stable for a prolonged period (up to at least 48 h) in heat-killed oocysts, and hence is not a good marker of viability [76,135]. RT-PCR was used to assess the efficacy of temperature and chemicals on *Cryptosporidium* oocysts in simple and complex matrices (Table 2). However, correlation with infectivity seems to depend on the applied treatments and the targeted mRNA: β -tubulin mRNA production was reported to correlate with oocyst infectivity after long-term storage at cold and room temperatures but not following oxidant treatments, while *hsp70* mRNA production correlated with cell culture assays in oocysts submitted to oxidants, but not to heat treatment (Table 2).

3.4.1.1.2 *Giardia duodenalis*

The *hsp70* gene has also been described for the detection of viable *Giardia* cysts in simplex assays [1,134], but also in duplex RT-PCR with *C. parvum* [163]. Other targets such as *ef1a*, *adhe* and β -*giardin* mRNAs have been used, the latter being the most suitable to study the viability of *Giardia* cysts in environmental samples (Table 2). However, β -*giardin* mRNA RT-PCR assays have been shown to detect viable but non-infectious cysts following heat treatments, indicating that this method underestimates the efficacy of these treatments (Tables 2 and 3).

3.4.1.1.3 *Toxoplasma gondii*

To estimate the viability of *T. gondii* oocysts, RT-PCR assays targeting two genes have been described:

SporoSAG, which is highly expressed in the sporulated oocyst, and *act1* expressed in both sporulated and unsporulated oocysts [218]. As previously described for *Cryptosporidium*, correlation of RT-PCR with infectivity assays appears variable according to the applied treatments, with good agreement following chlorine- and iodine-based disinfectants, and acidified-ethanol, but not after heating or exposure to formalin or UV (Table 2).

To summarize, the RT-qPCR technique is rapid, sensitive, and can directly assess the likelihood for a human to be infected by detected protozoa. However, although mRNA is the least stable nucleic acid, compared with rDNA, tRNA and rRNA, it can nevertheless persist for a long time after the death of the parasites, even in non-favorable conditions. This has recently been described for mRNA from dead *Plasmodium* ookinetes that remained detectable more than 24 h inside the mosquito midgut [96]. Hence, RT-qPCR assays can overestimate the number of viable and potentially infectious (oo)cysts, and consequently will overestimate the exposure of humans to infective parasites and underestimate the efficacy of control measures (Table 3). However, this method can be useful as a first step of screening of different treatments applied to complex matrices to benchmark inactivation potential.

3.4.1.2 Fluorescence in situ hybridization (FISH)

The fluorescence *in situ* hybridization (FISH) method consists in targeting a nucleic acid sequence using a specific synthetic fluorescent oligonucleotide probe. rRNA is considered to be the ideal viability target for several reasons: (i) high sensitivity; (ii) short half-life (although as described in 3.4.1.1, in parasites the half-life is longer); (iii) present in high copy number in viable cells [9]. Hence, a FISH 'positive' signal depends on the amount of target rRNAs present in a cell, the longevity of that target within the cell and accessibility for probing, the fluorescence intensity of bound probe and the presence of RNases. Probes targeting different regions of the 18S rRNA specific to *C. parvum*, *C. hominis* and *G. duodenalis* have been described for the detection of viable (oo)cyst [5,48,92,217]. The FISH technique is described as a rapid and cheap method, with a fast time-to-result (3 hours), enabling the specific simultaneous visualization of one or more viable (oo)cyst species [92,138]. Nevertheless, it remains scarcely used in surveys (Table 2). Although in some studies FISH assays have shown correlation with *in vitro* excystation of *C. parvum* oocysts [217], this is not always the case and no agreement with infectivity assays has been observed [115]. Furthermore, rRNA is able to persist for 6 days after *C. parvum* oocyst heat treatment, presumably because it is protected within the oocyst [200], and consistent with this, gamma-irradiated oocysts of *Cryptosporidium* have been shown to give a positive FISH signal while being dead (Table 2). Thus, this method cannot be considered as a reliable measure to assess the exposure of humans to infective (oo)cysts and the inactivation efficacy of treatments (Table 3).

3.4.1.3 Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)

Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) is an isothermal and sensitive technique for amplification of RNA targets that has been described for many microorganisms and has recently been reviewed [106]. This method can detect viable cells through selective amplification of mRNA, even in a background of genomic DNA. Compared with RT-qPCR techniques, amplification is performed at a single temperature (41 °C), and consequently does not need thermal cycling equipment. The detection of products of NASBA reaction is quite labor-intensive including ethidium bromide-stained agarose gel electrophoresis, which requires a confirmatory step by probe hybridization, enzyme-linked gel assays, electrochemiluminescence (ECL) detection and fluorescence correlation spectroscopy. *MIC1* and *hsp70* mRNAs have been described as target molecules for *Cryptosporidium* oocysts [13,107]. This method has been shown to correlate with the PI exclusion method [44] and to be suitable to detect viable *C. parvum* oocysts in spiked environmental waters, in the presence of organic, inorganic and biological contaminants, and with detection limit below ten viable oocysts per analyzed sample [13]. However, oocysts that had been killed by exposure to sodium hypochlorite, freeze-thawing or boiling were also detected, indicating again the stability of the RNA and the lack of suitability of this method for detecting only viable oocysts; indeed, freeze-thawing seemed to give an even stronger NASBA signal [107]. To date, no study describes the use of this method to evaluate the occurrence of parasites in naturally contaminated samples and to assess the efficacy of industrial processes on the protozoan parasites, and no such assays have been proposed for *T. gondii* or *G. duodenalis*.

In conclusion, because of the stability of mRNA for extended periods in oocysts that have been experimentally inactivated (e.g., after heating, freeze-thawing or chemical treatments), it is clear that this technique detects both live and dead oocysts. Moreover, although quantitative NASBA has been described, the cell concentration seems not to be reliable, and thus this method is unsuitable for inactivation studies. Therefore, this technique appears not to be appropriate for exposure assessment in food (Table 3).

3.4.2 DNA-based methods: EMA/PMA PCR

Combination of viability dyes like EMA and PMA with PCR has been developed to study the viability of different foodborne pathogens [231]. As described in the “dyes” section (3.3.1), the use of EMA and PMA in viability assessment is based on the impermeability of live cells to both dyes that penetrate damaged and permeable cell (considered as non-viable) only. Once inside the nucleus, EMA and PMA can be photoactivated, which leads to their covalent binding to DNA and prevents PCR amplification in non-viable cells [30,75]. Thus, a PCR

signal should be obtained only for viable cells (i.e. non-damaged and non-permeable cells). However, in contrast with PMA, EMA has been described as able to penetrate into viable cells due to the variability of cell membrane structure and of active membrane transport efficacy [75,168]. EMA is also considered more toxic than PMA and this toxicity is time and temperature dependent [75]. Hence, PMA should lead to better discrimination of viable cells than EMA.

PMA-PCR and PMA-qPCR targeting the *hsp70*, *COWP* and 18S rRNA encoding genes have been described for *Cryptosporidium* oocysts [3,7,33,144]. For *Giardia*, PMA-qPCR based on the detection of the *b-giardin* gene has been shown to be able to quantify viable cysts in artificially contaminated wastewater samples accurately. This target has appeared as more effective than the triosephosphate isomerase (*tpi*) and glutamate dehydrogenase (*GDH*) genes [7]. In this study, the authors have also shown that the longer the amplicon, the more effective the exclusion of dead cysts. Comparison with infectivity assays has not been performed, and PMA-qPCR appears not to correlate with RT-qPCR data (unpublished data). Only a few studies have described the use of PMA-PCR to identify viable parasites in naturally contaminated water samples, and to assess the efficacy of chemicals and temperature on *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts (Table 2). Up to now, no study has described PMA-qPCR applied to *T. gondii*. However, the ability to specifically detect viable protozoa seems to depend on the applied treatment and is impaired in complex samples (unpublished data). Thus, this technique may overestimate the exposure to infective protozoa.

4 Conclusion

To date, only techniques allowing infectivity evaluation are able to provide a reliable assessment of the exposure of humans to protozoa in food (Table 3). They can even be sufficiently sensitive to detect low levels of contamination and directly address the likelihood that individuals will be infected by consumption of contaminated food. On the one hand, bioassays can be directly applied to food samples but they suffer from major ethical concerns; additionally they are restrictive, expensive, and implementation is complex, with prolonged time-to-results. Hence, bioassays are not suitable for routine analysis for control measure verifications or any surveys intended to assess the global exposure of consumers. On the other hand, cell cultures can produce results more rapidly (but still 2 to 10 days), and this method could be more available and appropriate for routine laboratories (but still requiring specific skills, including long-term cell culture). However, it requires purified (oo)cysts, which can be challenging to obtain when working on food matrices. Both methods produce reliable inactivation data, but some authors have suggested that bioassays and cell culture may be able to highlight only substantial inactivation.

Most techniques assessing (oo)cyst viability appear to overestimate the occurrence of infective parasites and subsequent exposure of humans along the food chain. When used for investigating the efficacy of control measures, they tend to underestimate their inactivation efficacy (Table 3). RNA-amplification based assays (RT-PCR, NASBA) are interesting alternative techniques because they can be standardized and may be suitable for routine analyses of food samples (implementation and results interpretation). Moreover, being a quantitative approach, RT-qPCR allows the definition of viability reduction levels. However, these positive aspects are undermined by the apparent and clear stability of RNA within parasites, such that dead parasites are likely to be considered viable, overestimating exposure of humans to infective parasites and underestimating the efficacy of control measures. Although PMA-PCR seems to be an exciting and relevant technique, unfortunately it is only limited to simple matrices and to the evaluation of control measures that would permeabilize the (oo)cysts and allow the dye to penetrate. Excystation assays provide an active measure of activity and the effect of an intervention, but require clean suspensions and high numbers of parasites to be of any use. Their application beyond experimental studies of *Cryptosporidium* oocysts seems limited, and they are not easy to standardize in routine laboratory analyses. Although vital dye assays have considerable limitations, particularly with respect to overestimation of viability due to membrane impermeability not necessarily correlating with viability, and the subjectivity of any microscopy-based technique, their simplicity, cost-effectiveness, and potential for application to low parasite numbers may make them useful for initial screening purposes – both with regard to assessing infection potential of contaminant parasites and investigating treatment effects. However, results should always be backed up with another technique, and their disadvantages should not be overlooked.

To conclude, none of the techniques currently available appear to be entirely suitable for reliable assessment of the exposure of humans to infective protozoa in food or for routine verifications of control measures. In order to be able to produce data to refine exposure and subsequently better characterize the risk, we suggest that two actions should be carried out in parallel: – i) Determine initial levels of contamination using DNA-based assays: these are known to be sensitive enough for detecting low quantities of parasites, are easy to standardize, and are accessible for routine analyses. Although false positives are not expected, their potential should not be overlooked due to the occurrence of “loose” target DNA, without the actual organism being present. These methods overestimate the exposure to infective parasites by detecting all populations of (oo)cysts (i.e. live and infectious, live and non-infectious, dead), and therefore will give the maximum occurrence and level of contamination for a given matrix. For *Cryptosporidium* and *Giardia*, determination of the species and the genetic assemblages respectively, is part of the exposure

assessment. These important taxonomic details can be determined by DNA-based assays and directly address the infectious potential for humans.

- ii) Characterize the efficacy of treatments in place to control parasites using a combination of techniques. Simple vital dye inclusion/exclusion methods may be the preliminary approach, providing initial data on the inactivation potential of different treatments. To determine inactivation levels, which are the reference measure for food operators (\log_{10} viability reduction), RT-qPCR-based assays could be applied. They will overestimate the level of infective protozoa (quantification of live and infectious, live and non-infectious, and possibly dead (oo)cysts), leading to an underestimation of the efficacy of the treatments. But this action will allow the determination of the “worst case scenario” for a specific combination food/process, providing at the same time, confidence that when a target inactivation is reached, higher inactivation occurs in reality. Cell culture methods are improving in applicability, and, as imaging techniques become more accessible and cheap, will be of value in assessing invasion of cell cultures. Appropriate infectivity assays (bioassays), should be minimized for ethical and operational reasons, but can be used to confirm results obtained by *in vitro* assays.

All viability assays are based on evaluation of distinct physiological parameters that could vary depending on the applied treatments, the protozoa in question, and their original physiological state. Hence, future research should focus on the characterization of the effect of inactivation methods on the structure and the metabolism of (oo)cysts to be able to select and develop suitable techniques for infectivity measurement.

Acknowledgements. This work was funded by the UMT ACTIA PROTORISK and the University of Reims Champagne-Ardenne, in the framework of a PhD thesis with a CIFRE agreement between ACTALIA and the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation. This work was also supported by the French National Research Agency (grant ANR-17-CE21-0005-07). This review is based upon collaboration within the framework of Working Group 3 of COST Action FA1408 “A European Network for Foodborne Parasites: Euro-FBP”, supported by COST (European Cooperation in Science and Technology).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Abbaszadegan M, Huber MS, Gerba CP, Pepper IL. 1997. Detection of viable *Giardia* cysts by amplification of heat shock-induced mRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 324–328.
2. Adell AD, Miller WA, Harvey DJ, Van Wormer E, Wuertz S, Conrad PA. 2014. Individual subject meta-analysis of parameters for *Giardia duodenalis* shedding in animal experimental models. *BioMed Research International*, 2014, 476142.

3. Agulló-Barceló M, Moss JA, Green J, Gillespie S, Codony F, Lucena F, Nocker A. 2014. Quantification of relative proportions of intact cells in microbiological samples using the example of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Letters in Applied Microbiology, 58, 70–78.
4. Aksoy U, Marangi M, Papini R, Ozkoc S, Bayram Delibas S, Giangaspero A. 2014. Detection of *Toxoplasma gondii* and *Cyclospora cayentanensis* in *Mytilus galloprovincialis* from Izmir Province coast (Turkey) by Real Time PCR/High-Resolution Melting analysis (HRM). Food Microbiology, 44, 128–135.
5. Alagappan A, Bergquist PL, Ferrari BC. 2009. Development of a two-color fluorescence *in situ* hybridization technique for species-level identification of human-infectious *Cryptosporidium* spp. Applied and Environmental Microbiology, 75, 5996–5998.
6. Alarcón MA, Beltrán M, Cárdenas ML, Campos MC. 2005. Presence and viability of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in drinking water and wastewater in the high basin of Bogotá river. Biomedica, 25, 353–365.
7. Alonso JL, Amorós I, Guy RA. 2014. Quantification of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in wastewater using propidium monoazide quantitative real-time PCR. Parasitology Research, 113, 2671–2678.
8. Alum A, Sbai B, Asaad H, Rubino JR, Khalid Ijaz M. 2012. ECC-RT-PCR: a new method to determine the viability and infectivity of *Giardia* cysts. International Journal of Infectious Diseases, 16, e350–e353.
9. Amann RI, Ludwig W, Schleifer K-H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews, 59, 143–169.
10. Amorós I, Alonso JL, Cuesta G. 2010. *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts on salad products irrigated with contaminated water. Journal of Food Protection, 73, 1138–1140.
11. Arrowood MJ, Xie L-T, Rieger K, Dunn J. 1996. Disinfection of *Cryptosporidium parvum* oocysts by pulsed light treatment evaluated in an *in vitro* cultivation model, 1996. Journal of Eukaryotic Microbiology, 43, 88S–88S.
12. Aubert D, Villena I. 2009. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne Region, France. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 104, 290–295.
13. Baemumner AJ, Humiston MC, Montagna RA, Durst RA. 2001. Detection of viable oocysts of *Cryptosporidium parvum* following nucleic acid sequence based amplification. Analytical Chemistry, 73, 1176–1180.
14. Baishanbo A, Gargala G, Delaunay A, François A, Ballet J-J., Favennec L. 2005. Infectivity of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* genotype 2 isolates in immunosuppressed mongolian gerbils. Infection and Immunity, 73, 5252–5255.
15. Bajszár G, Dekonenko A. 2010. Stress-induced *hsp70* gene expression and inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts by chlorine-based oxidants. Applied and Environmental Microbiology, 76, 1732–1739.
16. Baldursson S, Karanis P. 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks – An update 2004–2010. Water Research, 45, 6603–6614.
17. Baque RH, Gilliam AO, Robles RD, Jakubowski W, Slifko TR. 2011. A real-time RT-PCR method to detect viable *Giardia lamblia* cysts in environmental waters. Water Research, 45, 3175–3184.
18. Belosevic M, Faubert GM, MacLean JD, Law C, Croll NA. 1983. *Giardia lamblia* infections in Mongolian gerbils: an animal model. Journal of Infectious Diseases, 147, 222–226.
19. Belosevic M, Guy RA, Taghi-Kilani R, Neumann NF, Gyürék LL, Liyanage LRJ, Millard PJ, Finch GR. 1997. Nucleic acid stains as indicators of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. International Journal for Parasitology, 27, 787–798.
20. Belosevic M, Guy RA, Taghi-Kilani R, Neumann NF. 1997. Vital dye staining of *Giardia* and *Cryptosporidium*. American Water Works Association, Denver, Co.
21. Benamrouz S, Guyot K, Gazzola S, Mouray A, Chassat T, Delaire B, Chabé M, Gosset P, Viscogliosi E, Dei-Cas E, Creusy C, Conseil V, Certad G. 2012. *Cryptosporidium parvum* infection in SCID mice infected with only one oocyst: qPCR assessment of parasite replication in tissues and development of digestive cancer. PLOS ONE, 7, e51232.
22. Benedict KM, Reses H, Vigar M, Roth DM, Roberts VA, Mattioli M, Cooley LA, Hilborn ED, Wade TJ, Fullerton KE, Yoder JS, Hill VR. 2017. Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water – United States, 2013–2014. Morbidity and Mortality Weekly Report, 66, 1216–1221.
23. Bénére E, Van Assche T, Van Ginneken C, Peulen O, Cos P, Maes L. 2012. Intestinal growth and pathology of *Giardia duodenalis* assemblage subtype A(I), A(II), B and E in the gerbil model. Parasitology, 139, 424–433.
24. Bertrand I, Maux M, Helmi K, Hoffmann L, Schwartzbrod J, Cauchie H-M. 2009. Quantification of *Giardia* transcripts during *in vitro* excystation: interest for the estimation of cyst viability. Water Research, 43, 2728–2738.
25. Bingham AK, Jarroll EL Jr, Meyer EA, Radulescu S. 1979. *Giardia* sp.: physical factors of excystation *in vitro*, and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. Experimental Parasitology, 47: 284–91.
26. Bingham AK, Meyer EA. 1979. *Giardia* excystation can be induced *in vitro* in acidic solutions. Nature, 277, 301–302.
27. Biswas K, Craik S, Smith DW, Belosevic M. 2003. Synergistic inactivation of *Cryptosporidium parvum* using ozone followed by free chlorine in natural water. Water Research, 37, 4737–4747.
28. Biswas K, Craik S, Smith DW, Belosevic M. 2005. Synergistic inactivation of *Cryptosporidium parvum* using ozone followed by monochloramine in two natural waters. Water Research, 39, 3167–3176.
29. Black EK, Finch GR, Taghi-Kilani R, Belosevic M. 1996. Comparison of assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts viability after chemical disinfection. FEMS Microbiology Letters, 135, 187–189.
30. Bolton PH, Kearns DR. 1978. Spectroscopic properties of ethidium monoazide: a fluorescent photoaffinity label for nucleic acids. Nucleic Acids Research, 5, 4891–4903.
31. 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, Toxoplasmosis Study Group. 2011. Unrecognized ingestion of *Toxoplasma gondii* oocysts leads to congenital toxoplasmosis and causes epidemics in North America. Clinical Infectious Diseases, 53, 1081–1089.
32. Brasseur P, Lemeteil D, Ballet JJ. 1988. Rat model for human cryptosporidiosis. Journal of Clinical Microbiology, 26, 1037–1039.
33. Brescia CC, Griffin SM, Ware MW, Varughese EA, Egorov AI, Villegas EN. 2009. *Cryptosporidium* propidium monoazide-PCR, a molecular biology-based technique for genotyping of viable *Cryptosporidium* oocysts. Applied and Environmental Microbiology, 75, 6856–6863.

34. Bukhari Z, Marshall MM, Korich DG, Fricker CR, Smith HV, Rosen J, Clancy JL. 2000. Comparison of *Cryptosporidium parvum* viability and infectivity assays following ozone treatment of oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2972–2980.
35. Buraud M, Forget E, Favennec L, Bizet J, Gobert JG, Deluol AM. 1991. Sexual stage development of cryptosporidia in the Caco-2 cell line. *Infection and Immunity*, 59, 4610–4613.
36. 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3488–3493.
37. Campbell AT, Wallis P. 2002. The effect of UV irradiation on human-derived *Giardia lamblia* cysts. *Water Research*, 36, 963–969.
38. Certad G, Ngouanesavanh T, Guyot K, Gantois N, Chassat T, Mouray A, Fleurisse L, Pinon A, Cailliez JC, Dei-Cas E, Creusy C. 2007. *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma. *Infectious Agents and Cancer*, 2007, 2–22.
39. Chaidez C, Soto M, Gortares P, Mena K. 2005. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in irrigation water and its impact on the fresh produce industry. *International Journal of Environmental Health Research*, 15, 339–345.
40. Chappell CL, Okhuysen PC, Langer-Curry R, Widmer G, Akiyoshi DE, Tanriverdi S, Tzipori S. 2006. *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75, 851–857.
41. Chochillon C, Favennec L, Gobert JG, Savel J. 1990. *Giardia intestinalis*: étude des modalités de l'infestation du souriceau avant le sevrage. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales*, 184, 150–157.
42. Collins MV, Flick GJ, Smith SA, Fayer R, Croonenberghs R, O'Keefe S, Lindsay DS. 2005. The effect of high-pressure processing on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from experimentally exposed eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52, 500–504.
43. Collins MV, Flick GJ, Smith SA, Fayer R, Rubendall E, Lindsay DS. 2005. The effects of e-beam irradiation and microwave energy on eastern oysters (*Crassostrea virginica*) experimentally infected with *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52, 484–488.
44. Connelly JT, Nugen SR, Borejsza-Wysocki W, Durst RA, Montagna RA, Baeumner AJ. 2008. Human pathogenic *Cryptosporidium* species bioanalytical detection method with single oocyst detection capability. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 487–495.
45. Costa AO, Thomaz-Soccol V, Clara Paulino R, Alcântara de Castro E. 2009. Effect of vinegar on the viability of *Giardia duodenalis* cysts. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 510–512.
46. Craik SA, Weldon D, Finch GR, Bolton JR, Belosevic M. 2001. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using medium- and low-pressure ultraviolet radiation. *Water Research*, 35, 1387–1398.
47. Dalton C, Goater AD, Pethig R, Smith HV. 2001. Viability of *Giardia intestinalis* cysts and viability and sporulation state of *Cyclospora cayetanensis* oocysts determined by electrorotation. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 586–590.
48. Deere D, Vesey G, Ashbolt N, Davies KA, Williams KL, Veal D. 1998. Evaluation of fluorochromes for flow cytometric detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts labelled by fluorescent *in situ* hybridization. *Letters in Applied Microbiology*, 27, 352–356.
49. Delaunay A, Gargala G, Li X, Favennec L, Ballet JJ. 2000. Quantitative flow cytometric evaluation of maximal *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in a neonate mouse model. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4315–4317.
50. DeSilva MB, Schafer S, Kendall Scott M, Robinson B, Hills A, Buser GL, Salis K, Gargano J, Yoder J, Hill V, Buser GL, Salis K, Gargano J, Yoder J, Hill V, Xiao L, Roellig D, Hedberg K. 2016. Communitywide cryptosporidiosis outbreak associated with a surface water-supplied municipal water system-Baker City, Oregon, 2013. *Epidemiology and Infection*, 144, 274–284.
51. Di Giovanni GD, Lechevallier MW. 2005. Quantitative-PCR assessment of *Cryptosporidium parvum* cell culture infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1495–1500.
52. Dibao-Dina A, Follet J, Ibrahim M, Vlandas A, Senez V. 2015. Electrical impedance sensor for quantitative monitoring of infection processes on HCT-8 cells by the waterborne parasite *Cryptosporidium*. *Biosensors and Bioelectronics*, 66: 69–76.
53. Dubey JP. 1998. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *Journal of Parasitology*, 84, 862–865.
54. Dubey JP, Ferreira LR, Martins J, McLeod R. 2012. Oral oocyst-induced mouse model of toxoplasmosis: Effect of infection with *Toxoplasma gondii* strains of different genotypes, dose, and mouse strains (transgenic, out-bred, in-bred) on pathogenesis and mortality. *Parasitology*, 139, 1–13.
55. Dubey JP, Jenkins MC, Thayer DW, Kwok OCH, Shen SK. 1996. Killing of *Toxoplasma gondii* oocysts by irradiation and protective immunity induced by vaccination with irradiated oocysts. *Journal of Parasitology*, 82, 724–727.
56. Dubey JP. 2009. *Toxoplasmosis of animals and humans*. CRC Press, Inc., Boca Raton.
57. Dubey JP. 2010. *Toxoplasmosis of animals and humans*, second ed. CRC Press, Boca Raton. (FL, USA).
58. Dumètre A, Dardé ML. 2003. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 651–661.
59. Dumètre A, Le Bras C, Baffet M, Menecœur P, Dubey J-P., Derouin F, Duguet JP, Joyeux M, Moulin L. 2008. Effects of ozone and ultraviolet radiation treatments on the infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. *Veterinary Parasitology*, 153, 209–213.
60. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* 2017, 15:5077.
61. Efstratiou A, Ongerth JE, Karanis P. 2017. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks – An update 2011–2016. *Water Research*, 144, 14–22.
62. El Zawawy LA, El-Said D, Ali SM, Fathy FM. 2010. Disinfection efficacy of sodium dichloroisocyanurate (NADCC) against common food-borne intestinal protozoa. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 40:165–168.
63. Esmerini PO, Gennari SM, Pena HFJ. 2010. Analysis of marine bivalve shellfish from the fish market in Santos city, São Paulo state, Brazil, for *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*, 170, 8–13.

64. Ethelberg S, Lisby M, Vestergaard LS, Enemark HL, Olsen KE, Stensvold CR, Nielsen HV, Porsbo LJ, Plesner AM, Mølbak K. 2009. A foodborne outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection. *Epidemiology & Infection*, 137, 348–356.
65. FAO/OMS. 1999. Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment. Codex Alimentarius Commission, CAC/GL 30-1999.
66. Fayer R, Leek RG. 1984. The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on *in vitro* excystation of *Cryptosporidium*. *Journal of Protozoology*, 31, 567–569.
67. Fayer R, Lewis EJ, Trout JM, Graczyk TK, Jenkins MC, Higgins J, Xiao L, Lal AA. 1999. *Cryptosporidium parvum* in oysters from commercial harvesting sites in the Chesapeake Bay. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 706–710.
68. Fayer R, Trout JM, Jenkins MC. 1998. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *Journal of Parasitology*, 84, 1165–1169.
69. Fayer R, Trout JM, Lewis EJ, Santin M, Zhou L, Lal AA, Xiao L. 2003. Contamination of Atlantic coast commercial shellfish with *Cryptosporidium*. *Parasitology Research*, 89, 141–145.
70. Fayer R, Trout JM, Lewis EJ, Xiao L, Lal AA, Jenkins MC, Graczyk TK. 2002. Temporal variability of *Cryptosporidium* in the Chesapeake Bay. *Parasitology Research*, 88, 998–1003.
71. Fayer R, Graczyk TK, Lewis EJ, Trout JM, Farley CA. 1998. Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1070–1074.
72. Figgatt M, Mergen K, Kimelstein D, Mahoney DM, Newman A, Nicholas D, Ricupero K, Cafiero T, Corry D, Ade J, Kurpiel P, Madison-Antenucci S, Anand M. 2017. Giardiasis outbreak associated with asymptomatic food handlers in New York State, 2015. *Journal of Food Protection*, 12, 837–841.
73. Finch GR, Black EK, Gyürék L, Belosevic M. 1993. Ozone inactivation of *Cryptosporidium parvum* in demand-free phosphate buffer determined by *in vitro* excystation and animal infectivity. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 4203–4210.
74. Finch GR, Black EK, Labatiuk CW, Gyürék L, Belosevic M. 1993. Comparison of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* cyst inactivation by ozone. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3674–3680.
75. Fittipaldi M, Nocker A, Codony F. 2012. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *Journal of Microbiological Methods*, 91, 276–289.
76. Fontaine M, Guillot E. 2003. Study of 18S rRNA and rDNA stability by real-time RT-PCR in heat-inactivated *Cryptosporidium parvum* oocysts. *FEMS Microbiology Letters*, 226, 237–243.
77. Fontán-Sainz M, Gómez-Couso H, Fernández-Ibáñez P, Ares-Mazás E. 2012. Evaluation of the solar water disinfection process (SODIS) against *Cryptosporidium parvum* using a 25-L static solar reactor fitted with a compound parabolic collector (CPC). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86, 223–228.
78. Freire-Santos F, Gómez-Couso H, Ortega-Iñarrea MR, Castro-Hermida JA, Oteiza-López AM, García-Martín O, Ares-Mazás ME. 2002. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from experimentally contaminated oysters (*Ostrea edulis*) and clams (*Tapes decussatus*). *Parasitology Research*, 88, 130–133.
79. Freyre A, Falcón J. 2004. Massive excystation of *Toxoplasma gondii* sporozoites. *Experimental Parasitology*, 107: 72–7.
80. Fuchsli HP, Kötzsch S, Egli T. 2012. *Cryptosporidium* spp. in drinking water. Samples from rural sites in Switzerland. *Swiss Medical Weekly*, 142, w13683.
81. Garcés-Sánchez G, Wilderer PA, Horn H, Munch J-C., Leubner M. 2013. Assessment of the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts with the induction ratio of hsp70 mRNA production in manure. *Journal of Microbiological Methods*, 94, 280–289.
82. Garcia A, Yanko W, Batzer G, Widmer G. 2002. *Giardia* cysts in tertiary-treated wastewater effluents: are they infective? *Water Environment Research*, 74, 541–544.
83. Garvey M, Farrell H, Cormican M, Rowan N. 2010. Investigations of the relationship between use of *in vitro* cell culture-quantitative PCR and a mouse-based bioassay for evaluating critical factors affecting the disinfection performance of pulsed UV light for treating *Cryptosporidium parvum* oocysts in saline. *Journal of Microbiological Methods*, 80, 267–273.
84. Garvey M, Stocca A, Rowan N. 2014. Development of a combined *in vitro* cell culture – quantitative PCR assay for evaluating the disinfection performance of pulsed light for treating the waterborne enteroparasite *Giardia lamblia*. *Experimental Parasitology*, 144, 6–13.
85. Gennaccaro AL, McLaughlin MR, Quintero-Betancourt W, Huffman DE, Rose JB. 2003. Infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in final reclaimed effluent. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4983–4984.
86. Goater AD, Burt JPH, Pethig R. 1997. A combined travelling wave dielectrophoresis and electrorotation device: applied to the concentration and viability determination of *Cryptosporidium*. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 30, L65.
87. Goater AD, Pethig R. 1999. Electrorotation and dielectrophoresis. *Parasitology*, 117, 177–189.
88. 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*). *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1866–1870.
89. Gómez-Couso H, Fontán-Sainz M, Fernández-Ibáñez P, Ares-Mazás E. 2012. Speeding up the solar water disinfection process (SODIS) against *Cryptosporidium parvum* by using 2.5L static solar reactors fitted with compound parabolic concentrators (CPCs). *Acta Tropica*, 124, 235–242.
90. Gómez-Couso H, Freire-Santos F, Martínez-Urtaza J, García-Martín O, Ares-Mazás ME. 2003. Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standards. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 97–105.
91. Gómez-Couso H, Méndez-Hermida F, Castro-Hermida JA, Ares-Mazás E. 2006. Cooking mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by steam does not destroy the infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Food Protection*, 69, 948–950.
92. Graczyk TK, Grimes BH, Knight R, Da Silva AJ, Pieniazek NJ, Veal DA. 2003. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* carried by synanthropic flies by combined fluorescent *in situ* hybridization and a monoclonal antibody. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68, 228–232.
93. Graczyk TK, Lewis EJ, Glass G, Dasilva AJ, Tamang L, Girouard AS, Curriero FC. 2007. Quantitative assessment of viable *Cryptosporidium parvum* load in commercial

- oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Parasitology Research*, 100, 247–253.
94. Griffiths JK, Theodos C, Paris M, Tzipori S. 1998. The gamma interferon gene knockout mouse: a highly sensitive model for evaluation of therapeutic agents against *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 2503–2508.
 95. Guzman-Herrador B, Carlander A, Ethelberg S, Freisleben de Blasio B, Kuusi M, Lund V, Löfdahl M, MacDonald E, Nichols G, Schönning C, Sudre B, Trönnberg L, Vold L, Semenza J C, Nygård K. 2015. Waterborne outbreaks in the Nordic countries, 1998 to 2012. *Euro Surveillance*, 20:pil = 21160.
 96. Habtewold T, Groom Z, Duchateau L, Christophides GK. 2015. Detection of viable *Plasmodium* ookinetes in the midguts of *Anopheles coluzzi* using PMA-qrtPCR. *Parasites & Vectors*, 8, 455.
 97. Hallier-Soulier S, Guillot E. 2003. An immunomagnetic separation-reverse transcription polymerase chain reaction (IMS-RT-PCR) test for sensitive and rapid detection of viable waterborne *Cryptosporidium parvum*. *Environmental Microbiology*, 5, 592–598.
 98. Hanes DE, Worobo RW, Orlandi PA, Burr DH, Miliotis MD, Robl MG, Bier JW, Arrowood MJ, Churey JJ, Jackson GJ. 2002. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in fresh apple cider by UV irradiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4168–4172.
 99. Harp JA, Fayer R, Pesch BA, Jackson GJ. 1996. Effect of pasteurization on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water and milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2866–2868.
 100. Hautus MA, Kortbeek LM, Vetter JC, Laarman JJ. 1988. *In vitro* excystation and subsequent axenic growth of *Giardia lamblia*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82, 858–861.
 101. Healey MC, Yang S, Du C, Liao SF. 1997. Bovine fallopian tube epithelial cells, adult C57BL/6 mice, and non-neonatal pigs as models for cryptosporidiosis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44, 64S–65S.
 102. Hijawi NS, Meloni BP, Ng'anzo M, Ryan UM, Olson ME, Cox PT, Monis PT, Thompson RCA. 2004. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *International Journal for Parasitology*, 34, 769–777.
 103. Hikosaka K, Satoh M, Koyama Y, Nakai Y. 2005. Quantification of the infectivity of *Cryptosporidium parvum* by monitoring the oocyst discharge from SCID mice. *Veterinary Parasitology*, 134, 173–176.
 104. Hohweyer J, Cazeaux C, Travaillé E, Languet E, Dumètre A, Aubert D, Terryn C, Dubey JP, Azas N, Houssin M, Favennec L, Villena I, La Carbona S. 2016. Simultaneous detection of the protozoan parasites *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* and *Giardia* in food matrices and their persistence on basil leaves. *Food Microbiology*, 57, 36–44.
 105. Hong S, Kim K, Yoon S, Park WY, Sim S, Yu JR. 2014. Detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental soil and vegetables. *Journal of Korean Medical Science*, 29, 1367–1371.
 106. Hønsvall BK, Robertson LJ. 2017. From research lab to standard environmental analysis tool: will NASBA make the leap? *Water Research*, 109, 389–397.
 107. Hønsvall BK, Robertson LJ. 2017. Real-time nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) assay targeting MIC1 for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts. *Experimental Parasitology*, 172, 61–67.
 108. Hou L, Li X, Dunbar L, Moeller R, Palermo B, Atwil ER. 2004. Neonatal-mouse infectivity of intact *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated after optimized *in vitro* excystation. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 642–646.
 109. Huffman DE, Gennaccaro AL, Berg TL, Batzer G, Widmer G. 2006. Detection of infectious parasites in reclaimed water. *Water Environment Research*, 79, 2297–2302.
 110. Isaac-Renton J, Bowie WR, King A, Irwin GS, Ong CS, Fung CP, Shokeir MO, Dubey JP. 1998. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2278–2280.
 111. Isaac-Renton J, Moorehead W, Ross A. 1996. Longitudinal studies of *Giardia* contamination in two community drinking water supplies: cyst levels, parasite viability, and health impact. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 47–54.
 112. ISO 18744:2016. Microbiology of the food chain – Detection and enumeration of *Cryptosporidium* and *Giardia* in fresh leafy green vegetables and berry fruits.
 113. Iturriaga R, Zhang S, Sonek GJ, Stibbs H. 2001. Detection of respiratory enzyme activity in *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts using redox dyes and immunofluorescence techniques. *Journal of Microbiological Methods*, 46, 19–28.
 114. Jenkins M, Trout J, Abrahamsen MS, Lancto CA, Higgins J, Fayer R. 2000. Estimating viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) directed at mRNA encoding *amyloglucosidase*. *Journal of Microbiological Methods*, 43, 97–106.
 115. Jenkins M, Trout J, Higgins J, Dorsch M, Veal D, Fayer R. 2003. Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Parasitology Research*, 89, 1–5.
 116. Jenkins MB, Anguish LJ, Bowman DD, Walker MJ, Ghiorse WC. 1997. Assessment of a dye permeability assay for determination of inactivation rates of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3844–3850.
 117. Johnson AM, Di Giovanni GD, Rochelle PA. 2012. Comparison of assays for sensitive and reproducible detection of cell culture-infectious *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 156–162.
 118. Johnson AM, Linden K, Ciociola KM, De Leon R, Widmer G, Rochelle PA. 2005. UV inactivation of *Cryptosporidium hominis* as measured in cell culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2800–2802.
 119. Johnson LL. 1992. SCID mouse models of acute and relapsing chronic *Toxoplasma gondii* infections. *Infection and Immunity*, 60, 3719–3724.
 120. Jones JL, Dubey JP. 2010. Waterborne toxoplasmosis – Recent developments. *Experimental Parasitology*, 124, 10–25.
 121. Kato S, Jenkins MB, Fogarty EA, Bowman DD. 2002. Effects of freeze-thaw events on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in soil. *Journal of Parasitology*, 88, 718–722.
 122. Keegan AR, Fanok S, Monis PT, Saint CP. 2003. Cell culture-taqman PCR assay for evaluation of *Cryptosporidium parvum* disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2505–2511.
 123. King BJ, Hoefel D, Daminato DP, Fanok S, Monis PT. 2008. Solar UV reduces *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in environmental waters. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1311–1323.
 124. King BJ, Keegan AR, Phillips R, Fanok S, Monis PT. 2012. Dissection of the hierarchy and synergism of the bile derived signal on *Cryptosporidium parvum* excystation and infectivity. *Parasitology*, 139, 1533–1546.

125. King BJ, Keegan AR, Robinson BS, Monis PT. 2011. *Cryptosporidium* cell culture infectivity assay design. *Parasitology*, 138, 671–681.
126. Kniel KE, Lindsay DS, Sumner SS, Hackney CR, Pierson MD, Dubey JP. 2002. Examination of attachment and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts on raspberries and blueberries. *Journal of Parasitology*, 88, 790–793.
127. Kniel KE, Sumner SS, Lindsay DS, Hackney CR, Pierson MD, Zajac AM, Golden DA, Fayer R. 2003. Effect of organic acids and hydrogen peroxide on *Cryptosporidium parvum* viability in fruit juices. *Journal of Food Protection*, 66, 1650–1657.
128. Korich DG, Marshall MM, Smith HV, O'Grady J, Bukhari Z, Fricker CR, Rosen JP, Clancy JL. 2000. Inter-laboratory comparison of the CD-I neonatal mouse logistic dose-response model for *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47, 294–298.
129. Korich DG, Mead JR, Madore MS, Sinclair NA, Sterling CR. 1990. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1423–1428.
130. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, Wu Y, Sow SO, Sur D, Breiman RF, Faruque AS, Zaidi AKM, Saha D, Alonso PL, Tamboura B, Sanogo D, Onwuchekwa U, Manna B, Ramamurthy T, Kanungo S, Ochieng JB, Omoro R, Oundo JO, Hossain A, Das SK, Ahmed S, Qureshi S, Quadri F, Adegbola RA, Antonio M, Hossain MJ, Akinsola A, Mandomando I, Nhampossa T, Acácio S, Biswas K, O'Reilly CE, Mintz ED, Berkeley LY, Muhsen K, Sommerfelt H, Robins-Browne RM, Levine MM. 2013. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*, 382, 209–222.
131. Le Goff L, Hubert B, Favennec L, Villena I, Ballet JJ, Agoulon A, Orange N, Gargala G. 2015. Pilot-scale pulsed UV light irradiation of experimentally infected raspberries suppresses *Cryptosporidium parvum* infectivity in immunocompetent suckling mice. *Journal of Food Protection*, 78, 2247–2252.
132. Lebbad M, Mattsson JG, Christensson B, Ljungström B, Backhans A, Andersson JO, Svärd SG. 2010. From mouse to moose: multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. *Veterinary Parasitology*, 168, 231–239.
133. LeChevallier MW, Di Giovanni GD, Clancy JL, Bukhari Z, Bukhari S, Rosan JS, Sobrinho J, Frey MM. 2003. Comparison of method 1623 and cell culture-PCR for detection of *Cryptosporidium* spp in source waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 971–979.
134. Lee GC, Nam SH, Chae JC, Lee CH. 2009. *Giardia duodenalis*: improved detection of viable cysts by reverse transcription-PCR of *heat shock-inducible hsp70* gene. *Experimental Parasitology*, 123, 377–380.
135. Lee S-U., Joung M, Ahn M-H., Huh S, Song H, Park W-Y., Yu J-R. 2008. CP2 gene as a useful viability marker for *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology Research*, 102, 381–387.
136. Lélou M, Villena I, Dardé ML, Aubert D, Geers R, Dupuis E, Marnef F, Poulle ML, Gotteland C, Dumètre A, Gilot-Fromont E. 2012. Quantitative estimation of the viability of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 5127–5132.
137. Lemée V, Zaharia I, Nevez G, Rabodonirina M, Brasseur P, Ballet JJ, Favennec L. 2000. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, 819–821.
138. Lemos V, Graczyk TK, Alves M, Lobo ML, Sousa MC, Antunes F, Matos O. 2005. Identification and determination of the viability of *Giardia lamblia* cysts and *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts in human fecal and water supply samples by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and monoclonal antibodies. *Parasitology Research*, 98, 48–53.
139. Li D, Craik SA, Smith DW, Belosevic M. 2007. Comparison of levels of inactivation of two isolates of *Giardia lamblia* cysts by UV light. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 2218–2223.
140. Li D, Craik SA, Smith DW, Belosevic M. 2009. Infectivity of *Giardia lamblia* cysts obtained from wastewater treated with ultraviolet light. *Water Research*, 43, 3137–3146.
141. Li H, Gyürék LL, Finch GR, Smith DW, Belosevic M. 2001. Effect of temperature on ozone inactivation of *Cryptosporidium parvum* in oxidant demand-free phosphate buffer. *Journal of Environmental Engineering*, 127, 456–467.
142. Li X, Brasseur P, Agnamey P, Ballet JJ, Clemenceau C. 2004. Time and temperature effects on the viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in chlorinated tap water. *Archives of Environmental Health*, 59, 462–466.
143. Li X, Guyot K, Dei-Cas E, Mallard JP, Ballet JJ, Brasseur P. 2006. *Cryptosporidium* oocysts in mussels (*Mytilus edulis*) from Normandy (France). *International Journal of Food Microbiology*, 108, 321–325.
144. Liang Z, Keeley A. 2012. Comparison of propidium monoazide-quantitative PCR and reverse transcription quantitative PCR for viability detection of fresh *Cryptosporidium* oocysts following disinfection and after long-term storage in water samples. *Water Research*, 46, 5941–5953.
145. Lindsay DS, Collins MV, Jordan CN, Flick GJ, Dubey JP. 2005. Effects of high pressure processing on infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts for mice. *Journal of Parasitology*, 91, 699–701.
146. Lindsay DS, Holliman D, Flick GJ, Goodwin DG, Mitchell SM, Dubey JP. 2008. Effects of high pressure processing on *Toxoplasma gondii* oocysts on raspberries. *Journal of Parasitology*, 94, 757–758.
147. Lonigro A, Pollice A, Spinelli R, Berrilli F, Di Cave D, D'Orazi C, Cavallo P, Brandonisio O. 2006. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in membrane-filtered municipal wastewater used for irrigation. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 7916–7918.
148. Lorenzo-Lorenzo MJ, Ares-Mazas ME, Villacorta-Martinez de Maturana I, Duran-Oreiro D. 1993. Effect of ultraviolet disinfection of drinking water on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of Parasitology*, 79, 67–70.
149. Ma J, Feng Y, Hu Y, Villegas EN, Xiao L. 2016. Human infective potential of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bienersi* in urban wastewater treatment plant effluents. *Journal of Water and Health*, 14, 411–423.
150. Macarisin D, Santín M, Bauchan G, Fayer R. 2010. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts after storage of experimentally contaminated apples. *Journal of Food Protection*, 73, 1824–1829.
151. Marchioro AA, Tiyo BT, Colli CM, de Souza CZ, Garcia JL, Gomes ML, Falavigna-Guilherme AL. 2016. First detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the fresh leaf of vegetables in South America. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 16, 624–626.

152. Matsubayashi M, Ando H, Kimata I, Nakagawa H, Furuya M, Tani H, Sasai K. 2010. Morphological changes and viability of *Cryptosporidium parvum* sporozoites after excystation in cell-free culture media. *Parasitology*, 137, 1861–1866.
153. McGrath JS, Quist J, Seddon JRT, Lai SCS, Lemay SG, Bridle HL. 2016. Deformability assessment of waterborne protozoa using a microfluidic-enabled force microscopy Probe. *PLoS One* 11, e0150438.
154. McGuigan KG, Méndez-Hermida F, Castro-Hermida JA, Ares-Mazás E, Kehoe SC, Boyle M, Sichel C, Fernández-Ibáñez P, Meyer BP, Ramalingham S, Meyer EA. 2006. Batch solar disinfection inactivates oocysts of *Cryptosporidium parvum* and cysts of *Giardia muris* in drinking water. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 453–463.
155. McKerr C, Adak GK, Nichols G, Gorton R, Chalmers RM, Kafatos G, Cosford P, Charlett A, Reacher M, Pollock KG, Alexander CL, Morton S. 2015. An outbreak of *Cryptosporidium parvum* across England & Scotland associated with consumption of fresh pre-cut salad leaves, May 2012. *PLoS One*, 10, e0125955.
156. Mead JR, Ilksoy N, You X, Belenkaya Y, Arrowood MJ, Fallon MT, Schinazi RF. 1994. Infection dynamics and clinical features of cryptosporidiosis in SCID mice. *Infection and Immunity*, 62, 1691–1695.
157. Melicherová J, Mazourová V, Valigurová A. 2016. *In vitro* excystation of *Cryptosporidium muris* oocysts and viability of released sporozoites in different incubation media. *Parasitology Research*, 115, 1113–1121.
158. Méndez-Hermida F, Castro-Hermida JA, Ares-Mazás E, Kehoe SC, McGuigan KG. 2005. Effect of batch-process solar disinfection on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1653–1654.
159. Miller CN, Jossé L, Brown I, Blakeman B, Povey J, Yiangou L, Price M, Cinatl J Jr, Xue WF, Michaelis M, Tsaousis AD. 2017. A cell culture platform for *Cryptosporidium* that enables long-term cultivation and new tools for the systematic investigation of its biology. doi: 10.1016/j.ijpara.2017.10.001
160. Moore AG, Vesey G, Champion A, Scandizzo P, Deere D, Veal D, Williams KL. 1998. Viable *Cryptosporidium parvum* oocysts exposed to chlorine or other oxidising conditions may lack identifying epitopes. *International Journal of Parasitology*, 28, 1205–1212.
161. Moreno Y, Moreno-Mesonero L, Amorós I, Pérez R, Morillo JA, Alonso JL. 2018. Multiple identification of most important waterborne protozoa in surface water used for irrigation purposes by 18S rRNA amplicon-based metagenomics. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221, 102–111.
162. Mtapuri-Zinyowera S, Midzi N, Muchaneta-Kubara CE, Simbini T, Mduluzza T. 2009. Impact of solar radiation in disinfecting drinking water contaminated with *Giardia duodenalis* and *Entamoeba histolytica/dispar* at a point-of-use water treatment. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 847–852.
163. Nam S, Lee G. 2010. A new duplex reverse transcription PCR for simultaneous detection of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia duodenalis* cysts. *Biomedical and Environmental Sciences*, 23, 146–150.
164. Nebe-von-Caron G, Stephens PJ, Hewitt CJ, Powell JR, Badley RA. 2000. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods*, 42, 97–114.
165. Neumann NF, Györek LL, Gammie L, Finch GR, Belosevic M. 2000. Comparison of animal infectivity and nucleic acid staining for assessment of *Cryptosporidium parvum* viability in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 406–412.
166. Nichols RA, Paton CA, Smith HV. 2004. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts after prolonged exposure to still natural mineral waters. *Journal of Food Protection*, 67, 517–523.
167. Nichols RAB, Connelly L, Sullivan CB, Smith HV. 2010. Identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in Scottish raw and drinking waters during a one-year monitoring period. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 5977–5986.
168. Nocker A, Cheung C-Y., Camper AK. 2006. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*, 67, 310–320.
169. Novak SM, Sterling CR. 1991. Susceptibility dynamics in neonatal BALB/c mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Protozoology*, 38, 103S–104S.
170. Okhuysen PC, Chappell CL, Crabb JH, Sterling CR, DuPont HL. 1999. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *Journal of Infectious Diseases*, 180, 1275–1281.
171. Opsteegh M, et al. 2016. Relationship between seroprevalence in the main livestock species and presence of *Toxoplasma gondii* in meat (GP/EFSA/BIOHAZ/2013/01): an extensive literature review. Final report. EFSA supporting publication 2016:EN-996, 294 pp.
172. Oyane I, Furuta M, Stavarache CE, Hashiba K, Mukai S, Nakanishi JM, Kimata I, Maeda Y. 2005. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* by ultrasonic irradiation. *Environmental Science & Technology*, 39, 7294–7298.
173. Paziewska-Harris A, Schoone G, Schallig HDFH. 2016. An easy ‘one tube’ method to estimate viability of *Cryptosporidium* oocysts using real-time qPCR. *Parasitology Research*, 115, 2873–2877.
174. Peng MM, Xiao L, Freeman AR, Arrowood MJ, Escalante AA, Weltman AC, Ong CSL, MacKenzie WR, Lal AA, Beard CB. 1997. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerging Infectious Diseases*, 3, 567–573.
175. Pönkä A, Kotilainen H, Rimhanen-Finne R, Hokkanen P, Hänninen ML, Kaarna A, Meri T, Kuusi M. 2009. A foodborne outbreak due to *Cryptosporidium parvum* in Helsinki, November 2008. *Eurosurveillance*, 14, pii: 19269.
176. Quilez J, Sanchez-Acedo C, Avendaño C, del Cacho E, Lopez-Bernad F. 2005. Efficacy of two peroxygen-based disinfectants for inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2479–2483.
177. Rasmussen KR, Healey MC. 1992. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in immunosuppressed adult mice. *Infection and Immunity*, 60, 1648–1652.
178. Reduker DW, Speer CA. 1985. Factors influencing excystation in *Cryptosporidium* oocysts from cattle. *Journal of Parasitology*, 71, 112–115.
179. Rehg JE, Hancock ML, Woodmansee DB. 1987. Characterization of cyclophosphamide-rat model of cryptosporidiosis. *Infection and Immunity*, 55, 2669–2674.
180. Rendtorff RC. 1979. The experimental transmission of *Giardia lamblia* among volunteer subjects. *Waterborne transmission of Giardiasis Proceeding of a Symposium, Cincinnati, USA*.
181. Rice E, Schaefer EW. 1981. Improved *in vitro* excystation procedure for *Giardia lamblia*. *Journal of Clinical Microbiology*, 14: 709–710.

182. Robert-Gangneux F, Dardé ML. 2012. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 25:264–96.
183. Robertson LJ, Campbell AT, Smith HV. 1992. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3494–3500.
184. Robertson LJ, Campbell AT, Smith HV. 1993. *In vitro* excystation of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology*, 106: 13–9.
185. Robertson LJ, Gjerde BK. 2007. *Cryptosporidium* oocysts: challenging adversaries? *Trends in Parasitology*, 23, 344–347.
186. Rochelle PA, Fallar D, Marshall MM, Montelone BA, Upton SJ, Woods K. 2004. Irreversible UV inactivation of *Cryptosporidium* spp. despite the presence of UV repair genes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51, 553–562.
187. Rochelle PA, Marshall MM, Mead JR, Johnson AM, Korish DG, Rosen JS, De Leon R. 2002. Comparison of *in vitro* cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3809–3817.
188. Rossi P, Pozio E, Besse MG, Gomez Morales MA, La Rosa G. 1990. Experimental cryptosporidiosis in hamsters. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 356–357.
189. Rotman B, Papermaster BW. 1966. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 55, 134–141.
190. Schets FM, Engels GB, During M, De Roda Husman AM. 2005. Detection of infectious *Cryptosporidium* oocysts by cell culture immunofluorescence assay: applicability to environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6793–6798.
191. Schets FM, van den Berg HHJL, Engels GB, Lodder WJ, de Roda Husman AM. 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* in commercial and non-commercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from the Oosterschelde, the Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 189–194.
192. Schupp DG, Erlandsen SL. 1987. A new method to determine *Giardia* cyst viability: correlation of fluorescein diacetate and propidium iodide staining with animal infectivity. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 704–707.
193. Shahiduzzaman M, Dyachenko V, Keidel J, Schmäschke R, Dauschies A. 2010. Combination of cell culture and quantitative PCR (cc-qPCR) to assess disinfectants efficacy on *Cryptosporidium* oocysts under standardized conditions. *Veterinary Parasitology*, 167, 43–49.
194. Sherwood D, Angus KW, Snodgrass DR, Tzipori S. 1982. Experimental cryptosporidiosis in laboratory mice. *Infection and Immunity*, 38, 471–475.
195. Shin GA, Linden KG, Arrowood MJ, Sobsey MD. 2001. Low-pressure UV inactivation and DNA repair potential of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3029–3032.
196. Shin GA, Linden KG, Faubert G. 2009. Inactivation of *Giardia lamblia* cysts by polychromatic UV. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 790–792 (2009).
197. Slifko TR, Friedman D, Rose JB, Jakubowski W. 1997. An *in vitro* method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3669–3675.
198. Slifko TR, Huffman DE, Dussert B, Owens JH, Jakubowski W, Haas CN, Rose JB. 2002. Comparison of tissue culture and animal models for assessment of *Cryptosporidium parvum* infection. *Experimental Parasitology*, 101, 97–106.
199. Smith AL, Smith HV. 1989. A comparison of fluorescein diacetate and propidium iodide staining and *in vitro* excystation for determining *Giardia intestinalis* cyst viability. *Parasitology*, 99, 329–331.
200. Smith JJ, Gunasekera TS, Barardi CRM, Veal D, Vesey G. 2004. Determination of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability by fluorescence *in situ* hybridization using a ribosomal RNA-directed probe. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 409–417.
201. Smith JL. 1993. Documented Outbreaks of Toxoplasmosis: Transmission of *Toxoplasma gondii* to Human. *Journal of Food Protection*, 56, 630–639.
202. Strober W. 2015. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, 111: A3.B.1-3.
203. Sundermann CA, Estridge BH. 2009. Inactivation of *Giardia lamblia* cysts by cobalt-60 irradiation. *Journal of Parasitology*, 96, 425–428.
204. Teunis PF, Chappell CL, Okhuysen PC. 2002. *Cryptosporidium* dose response studies: variation between isolates. *Risk Analysis*, 22, 175–183.
205. Thompson RCA, Olson ME, Zhu G, Enomoto S, Abrahamsen MS, Hijawi NS. 2005. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology*, 59, 77–158.
206. Thompson RCA. 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and *Giardiasis*. *Veterinary Parasitology*, 126, 15–35.
207. Thurston-Enriquez JA, Watt P, Dowd SE, Enriquez R, Pepper IL, Gerba CP. 2002. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. *Journal of Food Protection*, 65, 378–382.
208. Tomonaga T, Rai SK, Uga S. 2016. Differentiation between viable and dead *Cryptosporidium* oocysts using fluorochrome staining. *Kobe Journal of Medical Sciences*, 61:E138–E144.
209. Travaillé E, La Carbona S, Gargala G, Aubert D, Guyot K, Dumètre A, Villena I, Houssin M. 2016. Development of a qRT-PCR method to assess the viability of *Giardia intestinalis* cysts, *Cryptosporidium* spp. and *Toxoplasma gondii* oocysts. *Food Control*, 59, 359–365.
210. Tsushima Y, Karanis P, Kamada T, Xuan X, Makala LH, Tohya Y, Akashi H, Nagasawa H. 2003. Viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts detected in river water in Hokkaido, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65, 585–589.
211. Tysnes KR, Robertson LJ. 2016. Establishment of canine-derived *Giardia duodenalis* isolates in culture. *Journal of Parasitology*, 102:342–8.
212. Tzipori S, Rand W, Theodos C. 1995. Evaluation of a two-phase scid mouse model preconditioned with anti-interferon-gamma monoclonal antibody for drug testing against *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Infectious Diseases*, 172, 1160–1164.
213. Upton SJ, Tilley M, Brillhart DB. 1995. Effects of select medium supplements on *in vitro* development of *Cryptosporidium parvum* in HCT-8 cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 371–375.
214. Upton SJ, Tilley M, Brillhart DB. 1994. Comparative development of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa) in 11 continuous host cell lines. *FEMS Microbiology Letters*, 118, 233–236.
215. Utaaker KS, Skjerve E, Robertson LJ. 2017. Keeping it cool: Survival of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts on lettuce leaves. *International Journal of Food Microbiology*, 255, 51–57.
216. Varughese EA, Bennett-Stamper CL, Wymer LJ, Yadav JS. 2014. A new *in vitro* model using small intestinal

- epithelial cells to enhance infection of *Cryptosporidium parvum*. Journal of Microbiological Methods, 106, 47–54.
217. Vesey G, Ashbolt N, Fricker EJ, Deere D, Williams KL, Veal DA, Dorsch M. 1998. The use of a ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe for fluorescent labelling of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts. Journal of Applied Microbiology, 85, 429–440.
218. Villegas EN, Augustine SAJ, Villegas LF, Ware MW, See MJ, Lindquist HDA, Schaefer III FW, Dubey JP. 2010. Using quantitative reverse transcriptase PCR and cell culture plaque assays to determine resistance of *Toxoplasma gondii* oocysts to chemical sanitizers. Journal of Microbiological Methods, 81, 219–225.
219. Villena I, Aubert D, Gomis P, Ferte H, Ingland J-C., Denis-Bisiaux H, Dondon J-M., Pisano E, Ortis N, Pinon J-M. 2004. Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. Applied and Environmental Microbiology, 70, 4035–4039.
220. Wainwright KE, Lagunas-Solar M, Miller MA, Barr BC, Gardner IA, Pina C, Melli AC, Packham AE, Zeng N, Truong T, Conrad PA. 2007. Physical inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. Applied and Environmental Microbiology, 73, 5663–5666.
221. Wainwright KE, Lagunas-Solar M, Miller MA, Barr BC, Melli AC, Packham AE, Zeng N, Truong T, Conrad PA. 2010. Radiofrequency-induced thermal inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. Zoonoses Public Health, 57, 74–81.
222. Wainwright KE, Miller MA, Barr BC, Gardner IA, Melli AC, Essert T, Packham AE, Truong T, Lagunas-Solar M, Conrad PA. 2007. Chemical inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. Journal of Parasitology, 93, 925–931.
223. 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. Applied and Environmental Microbiology, 76, 5140–5147.
224. Widmer G, Akiyoshi D, Buckholt MA, Feng X, Rich SM, Deary KM, Bowman CA, Xu P, Wang Y, Wang X, Buck GA, Tzipori S. 2000. Animal propagation and genomic survey of a genotype 1 isolate of *Cryptosporidium parvum*. Molecular and Biochemical Parasitology, 108:187–197.
225. Widmer G, Corey EA, Stein B, Griffiths JK, Tzipori S. 2000. Host cell apoptosis impairs *Cryptosporidium parvum* development *in vitro*. Journal of Parasitology, 86:922–928.
226. Widmer G, Orbacz EA, Tzipori S. 1999. β -Tubulin mRNA as a marker of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. Applied and Environmental Microbiology, 65, 1584–1588.
227. Xunde LI, Brasseur P. 2000. A NMRI suckling mouse model for the evaluation of infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, 18, 94–96.
228. Yang S, Benson SK, Du C, Healey MC. 2000. Infection of immunosuppressed C57BL/6N adult mice with a single oocyst of *Cryptosporidium parvum*. Journal of Parasitology, 86, 884–887.
229. Yielding LW, Yielding KL, Donoghue JE. 1984. Ethidium binding to deoxyribonucleic acid: spectrophotometric analysis of analogs with amino, azido, and hydrogen substituents. Biopolymers, 23, 83–110.
230. You X, Mead JR. 1988. Characterization of experimental *Cryptosporidium parvum* infection in IFN-gamma knockout mice. Parasitology, 117, 525–531.
231. Zeng D, Chen Z, Jiang Y, Xue F, Li B. 2016. Advances and Challenges in Viability Detection of Foodborne Pathogens. Frontiers in Microbiology, 7, 1833.
232. Zhao Z, Wang R, Zhao W, Qi M, Zhao J, Zhang L, Li J, Liu A. 2015. Genotyping and subtyping of *Giardia* and *Cryptosporidium* isolates from commensal rodents in China. Parasitology, 142, 800–806.

Cite this article as: Rousseau A, La Carbona S, Dumètre A, Robertson LJ, Gargala G, Escotte-Binet S, Favennec L, Villena I, Gérard C, Aubert D. 2018. Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne stages (cysts/oocysts) of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii*: a review of methods. Parasite Vol, 170114



An international open-access, peer-reviewed, online journal publishing high quality papers on all aspects of human and animal parasitology

Reviews, articles and short notes may be submitted. Fields include, but are not limited to: general, medical and veterinary parasitology; morphology, including ultrastructure; parasite systematics, including entomology, acarology, helminthology and protistology, and molecular analyses; molecular biology and biochemistry; immunology of parasitic diseases; host-parasite relationships; ecology and life history of parasites; epidemiology; therapeutics; new diagnostic tools.

All papers in Parasite are published in English. Manuscripts should have a broad interest and must not have been published or submitted elsewhere. No limit is imposed on the length of manuscripts.

Parasite (open-access) continues **Parasite** (print and online editions, 1994-2012) and **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée** (1923-1993) and is the official journal of the Société Française de Parasitologie.

Editor-in-Chief:
Jean-Lou Justine, Paris

Submit your manuscript at
<https://parasite.edmgr.com/>

5. Stratégies développées dans la thèse

Pour des raisons de praticabilité en laboratoire et de rapidité de réponse, nous nous sommes concentrés tout d'abord sur des méthodes moléculaires de mesure de la. L'objectif visé était d'avoir une méthode commune aux trois parasites (*T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis*), applicable en matrice simple (matrice eau) et en matrice complexe, *Mytilus edulis* (moule bleue) et *Dreissena polymorpha* (moule zébrée), deux mollusques qui représentent un intérêt sur les plans sanitaire et/ou environnemental.

Tout d'abord, la qPCR couplée à l'utilisation du PMA (propidium monoazide) a été évaluée. La stratégie adoptée a consisté à évaluer dans un premier temps, cette technique en matrice simple pour *T. gondii*, cela n'ayant jamais été réalisé pour ce parasite (Partie 1.A.1.1, Rousseau *et al.*, 2019), puis pour *C. parvum* and *G. duodenalis*, dans l'optique de proposer un protocole commun aux trois parasites. Nos résultats nous ont cependant conduits à ne pas poursuivre avec cette méthode sur matrice complexe.

En parallèle, une approche alternative reposant sur la multiplication sur tapis cellulaire couplée à une détection en qPCR a été évaluée pour déterminer la viabilité des kystes de *G. duodenalis* en matrice eau. Finalement, nous avons adapté la RT-qPCR, disponible au laboratoire, pour étudier la viabilité des trois parasites en matrices mollusques.




Le danger pour le consommateur est uniquement lié à l'infectiosité des parasites. L'évaluation de l'infectiosité des parasites est classiquement réalisée par des essais *in vivo*. Cependant, ces essais nécessitent une animalerie suffisamment grande pour accueillir différentes espèces animales (souris et gerbilles) selon les modèles d'infection et soulèvent des problèmes éthiques. Afin de proposer une méthode permettant de mesurer directement l'infectiosité des parasites, et adaptée à l'évaluation de l'efficacité des procédés dans les industries agro-alimentaire ainsi qu'à l'évaluation de l'exposition dans l'environnement, nous avons développé, la Culture Cellulaire couplée à la qPCR (CC-qPCR) comme méthode alternative aux bioessais pour les oocystes de *T. gondii* et *C. parvum* en matrice eau mais aussi mollusque (*M. edulis* et *D. polymorpha*). Le développement sur les oocystes de *T. gondii* dans les matrices eau et mollusque fait l'objet d'un article à soumettre dans Applied Environmental Microbiology.





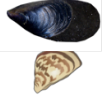



Les méthodes testées et développées au cours de la thèse sur chacune des matrices (eau et mollusques) pour les trois parasites en viabilité et en infectiosité sont détaillées dans le **Tableau VI**.

L'ensemble des méthodes précédemment décrites a été appliqué pour étudier la capacité de survie des deux protozoaires (*T. gondii* et *C. parvum*) au cours de la bioaccumulation dans des conditions contrôlées de laboratoire, par *Mytilus edulis* et *Dreissena polymorpha*, ainsi que lors de la dépuration (Partie 3).

Les résultats obtenus au cours des trois années de thèse sont présentés en trois parties : (1) le développement de méthodes moléculaires pour étudier la viabilité des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum* et kystes de *G. duodenalis* en matrice eau et mollusque, (2) le développement d'une méthode alternative aux bioessais pour étudier l'infectiosité des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum* en matrice eau et mollusque et (3) l'évaluation de la survie des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum* au cours de la bioaccumulation et la dépuration des moules. Au sein des parties 1 et 2, les articles mentionnés ci-dessus sont inclus.

Tableau VI : Synthèse de toutes les méthodes évaluées sur chacune des matrices en viabilité et en infectiosité.

 *T. gondii*  *C. parvum*  *G. duodenalis*

	VIABILITE			INFECTIOSITE	
	PMA-qPCR	RT-qPCR	CC-qPCR 	CC-qPCR 	Bioessais
	<p>Vérification intégration PMA</p> <p>Optimisations protocoles:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Concentration PMA • Température incubation • Temps d'incubation • Taille amplicon qPCR • Gène monocopie/multicopie • PMA/PMAxx 	<p>Travaillé <i>et al.</i>, 2016</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Optimisation dékystement • Comparaison culture axénique/HCT-8 • Viabilité d'oocystes viables/inactivés par la chaleur • Détermination de LOD 	<ul style="list-style-type: none"> • Détermination du stade parasitaire à mettre en culture • Etude du temps contact cellules/parasite et de culture, • Détermination de LOD • Comparaison infection Vero/HCT-8 • Stabilité des sporocystes 0, 1 et 5 mois à 4°C 	<p> • Dilution → semi quantitatif</p>
		<ul style="list-style-type: none"> • Optimisation extraction ARN • Effet du Gradient de Percoll 30% • Optimisation purification parasites/pré-extraction ARN <p>Application protocole développé pour <i>T. gondii</i></p> <p>Détermination des LOD</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Protocole Rouen • Détermination de LOD • Vérification obtention sporocystes en TissueLyser • Ajout d'un traitement à l'hypochlorite de sodium +/- Gradient Percoll 30% • Suivi cinétique 62h, 72h et J5 • Détermination des LOD • Protocole Rouen + Gradient Percoll 30% 	<p> • Dilution → semi quantitatif</p> <p> • Dilution → semi quantitatif</p> <p> • Dilution → semi quantitatif</p>

**PARTIE 1 : METHODES MOLECULAIRES POUR
ETUDIER LA VIABILITE DES OOCYSTES DE *T.
GONDII* ET *C. PARVUM* ET DES KYSTES DE *G.
DUODENALIS***

Comme nous l'avons indiqué dans la revue (Rousseau *et al.*, 2018), l'unique méthode moléculaire disponible pour étudier la viabilité des trois protozoaires est la RT-qPCR. Cependant, le principal inconvénient de cette méthode est la possibilité de persistance de l'ARNm dans les cellules mortes (Sung *et al.*, 2005 ; Xiao *et al.*, 2012 ; Habtewold *et al.*, 2015) et en fonction du traitement appliqué aux oocystes/kystes, la RT-qPCR n'est pas toujours corrélée avec les bioessais (Travaillé *et al.*, 2016). Ceci peut donc conduire à des surestimations du nombre de parasite viables et potentiellement infectieux pour l'Homme (Rousseau *et al.*, 2018).

L'objectif de cette première partie du travail de thèse était donc :

1) d'évaluer d'autres méthodes moléculaires de mesure de la viabilité des parasites sur une matrice simple, l'eau (**Partie 1.A**).

Les méthodes qui ont été testées sont la PMA-qPCR pour les trois parasites et la multiplication *in vitro* couplée à la qPCR pour les kystes de *G. duodenalis*. Concernant la PMA-qPCR, l'idée initiale étant d'avoir un protocole commun pour étudier simultanément la viabilité des trois protozoaires et dans la mesure où aucune méthode PMA-qPCR n'était décrite pour *T. gondii*, nous avons d'abord développé la PMA-qPCR et caractériser la méthode pour les oocystes de *T. gondii* (Rousseau *et al.*, 2019), puis appliqué la même démarche expérimentale sur les oocystes de *C. parvum* et les kystes de *G. duodenalis*.

2) de proposer une méthode moléculaire permettant d'étudier la viabilité des trois protozoaires en matrices complexes : les moules *Dreissena polymorpha* et *Mytilus edulis* (**Partie 1.B**). Etant donné que la PMA-qPCR ne s'est pas avérée pertinente en matrice simple, la méthode de RT-qPCR précédemment développée (Travaillé *et al.*, 2016) a été adaptée pour une application sur moule.

PARTIE 1.A. : MATRICE EAU

1.A.1 Évaluation du monoazoture de propidium couplé à la qPCR pour détecter les oocystes/kystes viables

Pour éviter les inconvénients liés à l'utilisation des ARNm comme marqueurs de viabilité, une stratégie prometteuse reposant sur l'utilisation d'un agent intercalant de l'ADN tel que le monoazoture de propidium couplée à la qPCR (PMA-qPCR) a été décrite pour de nombreuses bactéries, des virus mais aussi pour les oocystes de *Cryptosporidium* spp. et les kystes de *G. duodenalis* dans des échantillons d'eau. Lors du traitement, le PMA pénètre uniquement dans les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire et après photoactivation, se fixe de façon covalente à l'ADN, bloquant ainsi l'amplification (Fittipaldi *et al.*, 2012). La PCR n'a donc lieu que dans les cellules considérées comme viables. Une telle méthodologie n'a pas encore été évaluée pour les oocystes de *T. gondii*.

1.A.1.1. PMA-qPCR pour mesurer la viabilité de *T. gondii*

Etant donné qu'aucune étude n'a décrit l'application de la PMA-qPCR sur les oocystes de *T. gondii*, l'objectif de ce travail a donc été d'évaluer le potentiel d'une telle approche pour déterminer leur viabilité.

Pour pouvoir utiliser le PMA en qPCR, il a d'abord été nécessaire de vérifier que des oocystes de *T. gondii* inactivés étaient bien perméables au PMA et que ce marqueur de viabilité avait bien la capacité à atteindre l'ADN présent dans les sporozoïtes. Dans cette étude, l'inactivation des oocystes a été réalisée par traitement thermique (5 min à 99°C). Par microscopie, nous avons démontré que le PMA pouvait pénétrer dans les oocystes et atteindre l'intérieur des sporozoïtes. De plus, les oocystes tués par la chaleur se sont avérés plus perméables au PMA que les oocystes non traités (=viables), avec respectivement 91,1% et 22,9% d'oocystes marqués au PMA mis en évidence par cytométrie en flux. Pour définir les conditions optimales pour détecter spécifiquement les oocystes viables par PMA-qPCR, deux paramètres ont été étudiés : la concentration de PMA (50 à 150 µM) et la température d'incubation (température ambiante, 37°C, 45°C). Ni l'augmentation de la concentration en PMA, ni l'augmentation de la température n'a permis d'abolir le signal qPCR dans les oocystes inactivés, ni d'améliorer la discrimination entre les oocystes non traités et chauffés. Les effets de la longueur de l'amplicon, du nombre de copies de la cible et du type de marqueur (PMA ou PMAxx) sur la détection d'oocystes viables spécifiquement ont également

été évalués. Un amplicon de 123 pb de la cible correspondant à une séquence nucléique répétée de 529 pb (Repeat-Element, RE) a conduit à la plus grande réduction du signal de PCR dans les oocystes tués par la chaleur avec le PMA et le PMAxx (100 µM, température ambiante). Cette condition a également permis de distinguer des oocystes tués par la chaleur d'oocystes viables. Cependant, le niveau de réduction de viabilité induit par le traitement à température élevée reste faible et un signal PCR est toujours détecté dans les oocystes tués par la chaleur. Ces résultats ne sont pas en accord avec l'absence de signal observés en RT-qPCR dans le cas de notre étude, et la perte d'infectiosité *in vivo* précédemment décrite dans la littérature.

La PMA-qPCR développée permet de détecter des oocystes viables de *T. gondii* et de mesurer la réduction de viabilité induite suite à l'inactivation par la chaleur. Mais le niveau de réduction mesuré est faible et des oocystes inactivés et donc « considérés comme non viables » sont encore détectés. Cette technique ne semble donc pas adaptée à une large application visant à évaluer l'efficacité des procédés industriels et l'exposition des humains vis-à-vis de *T. gondii*. L'ensemble des résultats a fait l'objet d'un article publié dans Parasitology Research.



Evaluation of propidium monoazide–based qPCR to detect viable oocysts of *Toxoplasma gondii*

Angélique Rousseau^{1,2,3} · Isabelle Villena² · Aurélien Dumètre⁴ · Sandie Escotte-Binet² · Loïc Favennec³ · Jitender P. Dubey⁵ · Dominique Aubert² · Stéphanie La Carbona¹

Received: 21 September 2018 / Accepted: 17 January 2019 / Published online: 7 February 2019
© The Author(s) 2019

Abstract

Information on the viability of *Toxoplasma gondii* oocysts is crucial to establish the public health significance of this environmental transmission stage that can contaminate water and foods. Interest for molecular-based methods to assess viability is growing and the aim of our study was to assess, for the first time, a propidium monoazide (PMA)–qPCR approach to determine the viability of *T. gondii* oocysts. Untreated and heat-killed (99 °C, 5 min) oocysts were incubated with PMA, a photoreactive DNA binding dye, and analyzed by confocal microscopy and flow cytometry to characterize oocysts' dye permeability. Different PMA concentrations (50 to 150 μM), incubation temperatures (22, 37, and 45 °C), amplicon length, selected targeted gene, and dyes (PMA, PMAxxTM) were evaluated to define optimal conditions to discriminate specifically viable oocysts by PMA–qPCR. In theory, PMA binding to DNA would inhibit PCR amplification in dead but not in viable oocysts. Incubation at 22 °C with 100 μM PMA coupled to qPCR targeting a 123-bp sequence of the 529-bp repeat element allowed the distinction between viable and heated oocysts. However, the reduction of viability following heating of oocysts at high temperature was slight and, contrarily to reverse transcriptase-qPCR, the qPCR signal was not totally suppressed in heated suspensions. Therefore, PMA–qPCR is able to assess the impact of heating on *T. gondii* oocysts' viability but underestimates the efficacy of this treatment. The relevance of this technique to evaluate the efficacy of other inactivation processes and assess exposure of humans to this pathogen requires further investigations.

Keywords *Toxoplasma gondii* · Oocysts · Viability · PMA/PMAxxTM · qPCR · Heat inactivation

Section Editor: Berit Bangoura

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00436-019-06220-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Stéphanie La Carbona
s.lacarbona@actalia.eu

¹ ACTALIA, Food Safety Department, 310 Rue Popielujko, 50000 Saint-Lô, France

² EA 7510, ESCAPE, UFR Médecine, Université de Reims Champagne Ardenne, 51 Rue Cognacq Jay, 51096 Reims, France

³ EA 7510, ESCAPE, UFR Médecine et Pharmacie, Université de Rouen, 22 Bd Gambetta, 76183 Rouen Cedex, France

⁴ UMR IRD 257 VITROME, IHU-Méditerranée Infection, Aix Marseille University, 19-21 Bd Jean Moulin, 13005 Marseille, France

⁵ Agricultural Research Service, Beltsville Agricultural Research Center, Animal Parasitic Diseases Laboratory, United States Department Agriculture, Building 1001, Beltsville, MD 20705 2350, USA

Introduction

Toxoplasma gondii is a protozoan parasite that can infect humans either following ingesting meat containing cysts of the parasite or water and foods contaminated by oocysts. Irrespective of the transmission route, *T. gondii* infections are usually asymptomatic in immunocompetent individuals, resulting in the formation of latent cysts in tissues and organs throughout the body (Robert-Gangneux and Dardé 2012). The parasite can sometimes lead to severe ocular, cerebral, or multivisceral complications, especially in congenitally infected infants and in immunocompromised individuals. *T. gondii* oocysts were responsible for 2% of parasitic protozoan waterborne outbreaks reported between January 2004 and December 2010 (Baldursson and Karanis 2011). For the foodborne route, fruits and vegetables consumed raw, unwashed, or minimally processed are of greatest relevance (Kapperud et al. 1996; Baril et al. 1999) and contaminated irrigation waters represent the main vector of contamination

(Moreno et al. 2018). Shellfishes are also at risk due to their production in potentially contaminated waters (Tei et al. 2016; Ghozzi et al. 2017).

Contrarily to other waterborne pathogenic protozoa such as *Cryptosporidium* spp. oocysts or *Giardia duodenalis* cysts, there are no standardized methods available for detection of *T. gondii* oocysts in water and food samples. Current methods are mainly based on PCR (Villena et al. 2004; Karanis et al. 2012; Wells et al. 2015; Marchioro et al. 2016; Cong et al. 2017; Lalle et al. 2018) and microscopy (Al-Megrin 2010; Harito et al. 2017; Caradonna et al. 2017); however, they do not provide information regarding the viability of the detected parasites. Interest for molecular-based methods to assess viability of food and waterborne parasites is growing. Among them, reverse transcriptase-qPCR (RT-qPCR) can detect mRNA, which is only produced by metabolically active parasites hence considered as viable (Cancino-Faure et al. 2016; Rousseau et al. 2018). However, the main drawback of this method is the persistence of mRNA even in dead organisms (Sung et al. 2005; Xiao et al. 2012; Habtewold et al. 2015). RT-qPCR assays have been developed to detect viable *T. gondii* oocysts and measure the efficacy of inactivation treatments. However, depending on the treatment applied to oocysts, RT-qPCR assays do not always correlate with infectivity assays (cell culture, mouse inoculation) and consequently can overestimate the number of viable and potentially infective oocysts (Rousseau et al. 2018).

Another promising strategy to assess cell viability relies on the use of nucleic acid intercalating dyes such as ethidium monoazide (EMA) or propidium monoazide (PMA) in combination with specific PCR amplification (Elizaguivel et al. 2014; Inoue et al. 2015; Lee et al. 2015; Cattani et al. 2016). This method is based on the membrane integrity of cells, as intact cell membranes (i.e., viable cells) are not permeable to these dyes contrarily to compromised cell membranes (i.e., dead cells). EMA is considered more toxic than PMA and has been shown to enter also in intact cells (Fittipaldi et al. 2012). Hence, PMA should lead to better discrimination of viable cells than EMA, although its mechanism of action remains unclear. Once inside membrane-compromised cells, PMA intercalates into nucleic acids and, after photoactivation, binds covalently to DNA, thanks to its azide group. The insoluble and stable PMA/DNA complex then prevents DNA amplification in dead cells. Consequently, the PCR signal is strongly reduced even suppressed in membrane-compromised cells compared to intact cells. This methodology has been widely applied to detect viable bacteria (Yu et al. 2017), viruses (Fongaro et al. 2016), fungi (Vesper et al. 2008) in food and environmental samples, and *Cryptosporidium* spp. oocysts and *G. duodenalis* cysts in water and wastewater effluents (Brescia et al. 2009; Liang and Keeley 2012; Agulló-Barceló et al. 2014; Alonso et al. 2014; Ma et al. 2016; Vande Burgt et al. 2018). However, due to incomplete signal

suppression, the PMA-PCR-based methods can result in false-positive amplification. Successful PMA-PCR assays depend on a number of factors including the selected targeted gene (length, copy number), PMA incubation and photoactivation conditions, and the presence of organic substances such as clay, silt, or microorganisms (Contreras et al. 2011; Liang and Keeley 2012; Nkuipou-Kenfack et al. 2013). Recent studies have demonstrated that PMAxx™, a new and improved version of PMA, leads to better discrimination between intact and inactivated Norovirus compared to other intercalating dyes (Randazzo et al. 2016, 2018).

In this study, we developed a PMA-qPCR assay for assessing, for the first time, *T. gondii* oocysts' viability. Toward that aim, the permeability to PMA of heat-killed versus untreated oocysts was first addressed, and then different experimental conditions were tested to discriminate live/dead oocysts by PMA-qPCR.

Materials and methods

Parasites

T. gondii oocysts of VEG genotype III strain were produced and sporulated as previously described (Dubey 2010). Oocyst stock suspension contained 86.1% of sporulated oocysts and 70% of viable oocysts as determined by RT-qPCR (see below), and was stored in a 2% H₂SO₄ aqueous solution at 4 °C until use. Prior to experiments, oocysts were washed three times in sterile distilled water (dH₂O) to remove sulfuric acid. Then their concentration was calibrated by counting oocysts in dH₂O containing 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), on Kova Slide (Kova® Slide 10) using a phase contrast microscope (Axioskop 40, Zeiss, magnification × 400). Oocysts less than 8 months old were used throughout this study. For comparison between experiments, oocysts of the same age were used. Heat-killed oocysts were obtained following incubation of the parasites in water at 99 °C for 5 min. The absence of viable oocysts following heating was evaluated with RT-qPCR.

PMA/PMAxx™ treatments

Untreated or heat-killed oocysts were incubated with 25 to 150 μM of PMA (Biotium Inc., Hayward, WI, USA) for 30 min in dark at room temperature (mean temperature 22 °C), 37 °C, or 45 °C, with vortexing every 5 min. PMAxx™ was applied at 100 μM for 30 min at 22 °C. For each set of qPCR experiments, untreated and heat-killed oocysts were submitted in parallel to the same incubation conditions but in the absence of PMA/PMAxx™. Then, samples were exposed to a light-emitting diode (LED) source for 15 min using the PhAST Blue photoactivation device (λ =

464–476 nm, 60 W; PhAST Blue PhotoActivation System for Tubes, GenIUL, Barcelona, Spain). After exposure, oocysts were washed three times with dH₂O (5000×g, 5 min). The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in dH₂O.

Confocal microscopy

Untreated or heat-killed oocysts (10^6) were incubated with 25 μM PMA for 30 min at 22 °C and processed as described above. Pelleted oocysts were resuspended in 50 μl dH₂O and 10 μl was used for confocal microscopy analyses. Oocysts' blue autofluorescence and PMA red fluorescence were observed under the appropriate excitation wavelength/filter sets, using a LSM 710 NLO confocal microscope (Zeiss, Germany) linked to a Chameleon infrared biphoton laser (Coherent, USA) and piloted by ZEN software (Zeiss, Germany).

Flow cytometry

Untreated or heat-killed oocysts (10^5) were stained with 150 μM PMA for 30 min at 22 °C and processed as described above. Pelleted oocysts were resuspended in 200 μl dH₂O. Data acquisition was performed using a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, USA) equipped with 375 and 488 nm excitation lasers and set to acquire forward scatter (FSC), side scatter (SSC), and fluorescence. The oocyst autofluorescence and PMA fluorescence were collected on the fluorescence detector at 427 ± 20 nm and at 670 nm LP, respectively. The flow cytometer was set to acquire between 12,000 and 22,000 oocysts in P1 gate. The gate P1 was defined according to the size and granularity of blue autofluorescent elements (i.e., sporulated and unsporulated oocysts). The bivariate dot plot of PMA intensity versus autofluorescence intensity (UV) was established in gate P1 to select the sporulated oocysts and to estimate the percent of sporulated oocysts that have incorporated PMA (PMA+) or not (PMA−). Data were analyzed with the FlowJo LLC software (Oregon, USA).

DNA extraction and qPCR assays

DNA was extracted from 10^4 oocysts in 55 μl dH₂O using InstaGene™ Matrix kit as previously described (Hohweyer et al. 2016). DNA was amplified by qPCR targeting the 529-bp repeat element (RE; AF487550) or SporoSAG gene (AY492338), producing an amplicon of 81 bp (Toxo-F/Toxo-R) and 71 bp, respectively, as described previously (Palos Ladeiro et al. 2014; Travaillé et al. 2016). For the RE target, two additional forward primers REF2 (5'-TGTGCTTGGAGCCACAGAAG-3') and REF3 (5'-AAGA TGTTCGGCTTGGCT-3') were designed using

Primer3Plus according to their melting temperature (around 60 °C), amplicon length (< 300 pb), GC percent (50–55%), presence of G or C nucleotides at 3' end, no repeat sequence, and specificity using Blast score. These two new primers were combined to Toxo-R reverse primer to increase the amplicon size of the 529-bp RE to 123 bp (R/REF3) and 283 bp (R/REF2). PCR was performed using SimpliAmp™ Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific Inc., Villebon-sur-Yvette, France) in a final volume of 25 μl containing 12.5 μl of iQ™ Supermix (BioRad, Marnes la Coquette, France), 1 μl of BSA (10 mg/ml; SIGMA, France), 1 μl of each primer (20 μM), 0.5 μl of probe (10 μM), 5 μl of DNA template, and 4 μl of DNase–RNase-free water (SPRIME). The cycling parameters included a denaturation step at 95 °C for 3 min followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Each PCR reaction was performed in duplicate. The C_q value corresponds to the cycle number at which the fluorescence exceeds a fixed threshold and allows the quantification of the amount of the target DNA.

Reverse-transcriptase qPCR assays

Extraction of mRNA was performed using 10^4 oocysts in 200 μl dH₂O and mRNA was eluted in 50 μl of Tris–HCl 10 mM (Travaillé et al. 2016). Thirty microliters of purified mRNA was then submitted to DNase treatment using 1 μl of TURBO™ DNase (Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France). Following incubation for 30 min at 37 °C, DNase was inactivated and mRNA was stored at –20 °C until analyses. Reverse transcriptase–qPCR assays targeting the SporoSAG gene were performed using the OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) on 2 μl of mRNA as previously described (Travaillé et al. 2016). The cycling parameters included an initial reverse transcriptase step at 50 °C for 30 min followed by a denaturation step at 95 °C for 15 min and 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min.

Determination of the percentage of viable oocysts and signal reduction values using PMA or PMAxx™–qPCR assays

The calculation of viability percentage was based on the theoretical qPCR amplification equation $N_{Cq} = N_0 \times 2^{Cq}$, with N_0 representing the initial number of oocysts in the PCR mix, N_{Cq} the number of oocysts in the mix at the C_q cycle, and 2 represents the optimal qPCR efficiency. The initial number of viable oocysts was derived from the C_q values obtained with PMA (= C_q + PMA): $N_{0+PMA} = N_{Cq+PMA} / 2^{(Cq+PMA)}$. The initial number of total oocysts (i.e., viable and dead) was derived from the C_q values obtained without PMA (= C_q – PMA): $N_{0-PMA} = N_{Cq-PMA} / 2^{(Cq-PMA)}$. The percentage of viable oocysts in each suspension (untreated and heat-killed) was determined as follows: $N_{0+PMA} / N_{0-PMA} = 2^{(Cq-PMA)}$

$C_{q+PMA} \times 100$. $C_q - PMA - C_q + PMA$ (ΔC_q) corresponded to the signal reduction and was calculated between each C_q value obtained with and without PMA (two independent DNA extractions and two PCR replicates per DNA extraction minimum). Viability percentage was established for each ΔC_q and plotted as the mean, maximum, minimum, first and third quartiles, and median values. The signal reduction data (ΔC_q) were expressed as means with standard deviations.

Determination of the viability percentage in oocyst suspensions using RT-qPCR assays

The number of total oocysts (N_{tot}) was determined using calibration curves that were established as follows. DNA was extracted from tenfold serial dilutions of known quantities of oocysts and amplified (see above). The \log_{10} number of total oocysts per reaction was then plotted against C_q values obtained from each dilution. The number of viable oocysts (N_{viable}) was also derived from calibration curves that were established as follows: mRNA was extracted from tenfold serial dilutions of known quantities of oocysts and submitted to RT-qPCR (see above). The \log_{10} number of viable oocysts per reaction was then plotted against C_q values obtained from each dilution. The viability percentage $N_{viable}/N_{tot} \times 100$ was calculated for each control suspension.

Statistical analysis

According to the Shapiro–Wilk test, the data sets followed a non-normal distribution ($p < 0.05$). The viability percentages and signal reduction values were compared using the non-parametric Kruskal–Wallis test. If the null hypothesis H_0 (“the tested conditions have no effect on the measured value”) was rejected, then post hoc Dunn tests were performed for pairwise multiple comparisons. All statistical tests were performed with the AnaStats plugin for Microsoft® Excel 2010 (<http://www.anastats.fr/outils.php>). Statistical difference was considered as $p < 0.05$.

Results

Permeability of *T. gondii* oocysts to PMA

Microscopic analyses revealed that sporozoites in untreated oocysts did not stain red following PMA incubation (Fig. 1a, panels 1–6) while the majority of heat-killed oocysts showed red staining within the sporocysts and sporozoites (Fig. 1a, panels 7–12). Release of sporocysts from heated oocysts was observed (asterisk, Fig. 1a, panel 12), reflecting the damages that were induced by heating to the oocyst wall. The proportion of sporulated oocysts that were permeable to PMA (PMA positive, PMA+) in untreated and heat-killed

oocysts populations was then assessed by flow cytometry (Fig. 1b). Untreated and heat-killed oocyst suspensions contained 22.9% and 91.1% PMA+ oocysts, respectively (Fig. 1b, panels 3–4). These data demonstrated that PMA was able to penetrate within oocysts and sporozoites, and that heat-killed oocysts were more permeable to PMA than untreated oocysts in the tested conditions.

Optimization of PMA treatment to detect viable oocysts by PMA–qPCR

Untreated and heat-killed oocysts (sporulated and unsporulated) were incubated with different PMA concentrations (50, 100, and 150 μ M) and incubation temperatures (22, 37, and 45 °C) and viable oocysts were detected by qPCR (Table 1). At 22 °C, none of the tested PMA concentrations allow the abolition of the PCR signal in heat-killed oocysts, while heat-killed oocysts were not detected by RT-qPCR (Table 1). The mean viability percentage of untreated oocysts ranged between 27.2% and 48.9% and decreased as the PMA concentration increased ($p < 0.05$; Fig. 2). The mean viability percentages were very similar in heat-killed oocysts (24.9% to 41.2%) ($p > 0.05$ when compared to untreated oocysts at each PMA concentration). This result could be due to the incomplete penetration of PMA in heat-killed oocysts still leading to a qPCR signal. In order to increase oocyst permeability to PMA, higher incubation temperatures (37 and 45 °C) were tested. As observed at 22 °C, PCR amplification was not abolished in heat-killed oocysts following incubation with 100 μ M PMA (Table 1). The viability percentage of heated oocysts was lower at 45 °C compared to 37 °C (respectively 22.0% and 45.6%; $p < 0.05$; Fig. 3), suggesting that the penetration of PMA was favored at 45 °C. However, the viability of untreated oocysts was also significantly affected at 45 °C (26.2% at 45 °C vs. 54.1% at 37 °C; $p < 0.05$; Fig. 3). Overall, untreated and heated oocysts showed the same levels of viability, irrespective of the incubation temperatures with PMA ($p > 0.05$; Fig. 3 and Online Resource 1). The mean viability of untreated and/or heat-killed oocysts also tended to decrease as the PMA concentration increased at both temperatures, as observed at 22 °C ($p < 0.05$; Online Resources 1 and 2). Based on these results, oocysts were incubated with 100 μ M PMA for 30 min at 22 °C in the following experiments.

Effect of the amplicon length on PMA–qPCR signal reduction in heat-killed oocysts

Two new primers were designed to increase the length of the amplicon of the 529-bp repeat element (RE) target, while keeping the TaqMan probe and respecting the conditions suitable for qPCR analyses (see “Materials and methods” section). The two PCR assays were applied on untreated and heat-killed oocysts incubated with 100 μ M PMA for 30 min

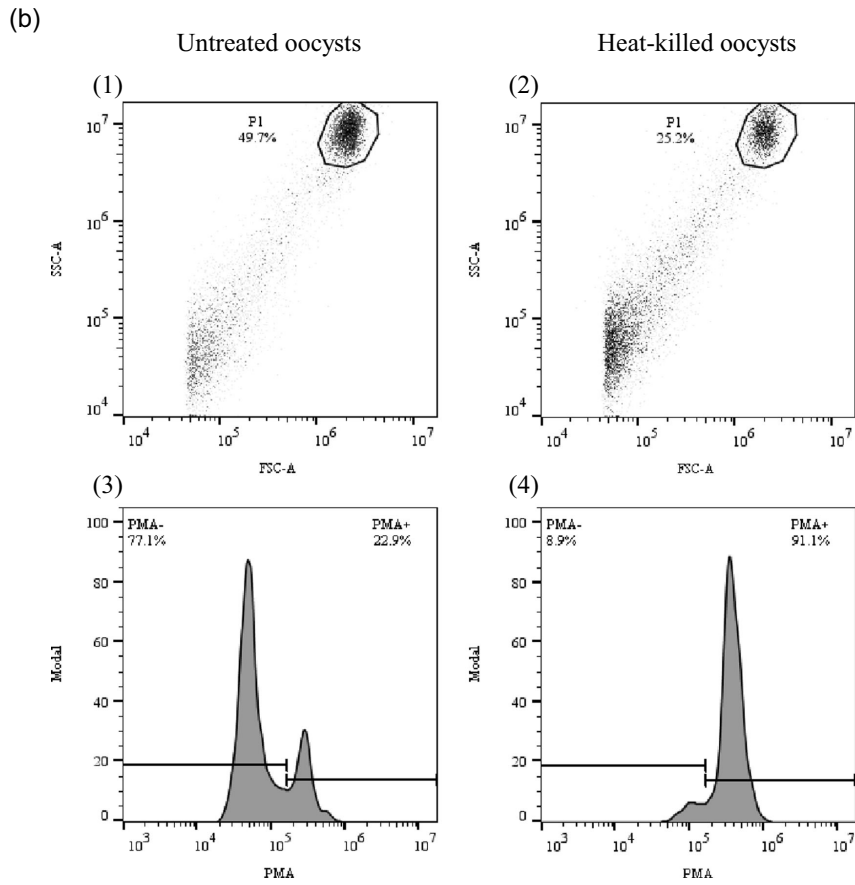
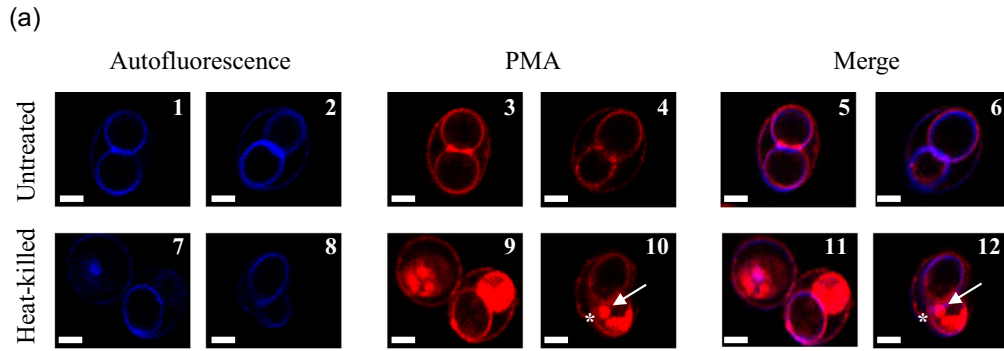


Fig. 1 Permeability of *T. gondii* oocysts to PMA assessed by (a) confocal microscopy and (b) flow cytometry. (a) Panels 1–6, untreated oocysts; panels 7–12, heat-killed oocysts (99 °C, 5 min). Oocysts were observed for their blue autofluorescence (1–2, 7–8), PMA staining (3–4, 9–10), and corresponding merge (5–6, 11–12). Arrow shows a sporozoite inside a sporocyst and asterisk shows the partial release of a sporocyst from the oocyst. Bar = 5 μm. (b) Panels 1–3, untreated oocysts; panels 2–4, heat-killed oocysts. Size (FSC-A) and granularity (SSC-A) dot plots of oocysts (1–2); the gate (P1) was defined to include all blue autofluorescent elements with size and granularity of oocysts (sporulated and unsporulated). Percentage of sporulated oocysts that have incorporated PMA (PMA+) or not (PMA-) (3–4). The x-axis represents the PMA fluorescence intensity. The y-axis indicates the percentage of oocysts (number of oocysts at each fluorescence intensity relative to the total number of oocysts in each population, i.e., PMA+ or PMA-)

at 22 °C. None of them led to a complete PCR signal extinction in heat-killed oocysts (Table 2). The longer amplicons of the RE target (123 and 283 bp) produced larger reductions in the PCR signal (ΔCq) compared to the reference 81 bp amplicon in heat-killed oocysts ($p < 0.05$; Table 2 and Online Resource 3). However, for the 283-bp amplicon, a significant increased ΔCq was also observed in the untreated oocysts compared to the other amplicons ($p < 0.05$; Table 2, Online Resource 3), preventing to measure viability reduction (0.003 \log_{10} ; Table 2) and to discriminate viable from dead oocysts ($p > 0.05$; Online Resource 3). At the opposite, the 123-bp amplicon led to significant differences between untreated and heat-killed oocysts ($p < 0.05$; Online Resource 3). Although discriminative, this assay was able to measure only 0.5 \log_{10} reduction of oocyst viability following heating (Table 2).

Table 1 Cq values obtained by PMA-qPCR in different incubation conditions (temperature and PMA concentrations) and by RT-qPCR, in untreated and heat-killed (99 °C, 5 min) oocysts

	Incubation temperature (°C)	PMA concentration (μM)	Cq ^a Untreated	Cq ^a Heat-killed
PMA-qPCR	22 °C	0	20.65 ± 0.17	22.38 ± 0.21
		50	21.70 ± 0.10	23.69 ± 0.19
		100	22.23 ± 0.34	24.40 ± 0.26
	37 °C	0	22.55 ± 0.19	24.48 ± 0.47
		100	23.26 ± 0.38	22.88 ± 0.28
	45 °C	0	24.19 ± 0.05	24.04 ± 0.12
100		22.73 ± 0.01	25.12 ± 1.13	
RT-qPCR			25.09 ± 0.33	27.40 ± 0.53
			29.36 ± 0.76	ND

^a Results are mean values of two independent experiments, each in duplicates. Standard deviations are indicated

ND not detected

Springer

Effect of the number of targeted copy on PMA-qPCR signal reduction in heat-killed oocysts

The use of the multicopy target 529-bp RE might not favor PCR signal suppression due to copies not modified by PMA. The single-copy gene (SporoSAG) was therefore evaluated to increase the probability that PMA bound the targeted sequence. A PCR signal could still be detected in heat-killed oocysts using the SporoSAG target (Table 2). Signal reduction in heat-killed oocysts was slightly enhanced using the single copy target (-2.27, Table 2) compared to the multicopy 81-bp RE reference amplicon (-1.51; $p < 0.05$; Table 2 and Online Resource 3) but remained significantly lower relative to the RE 123-bp amplicon (-3.36; $p < 0.05$; Table 2 and Online Resource 3). Moreover, the SporoSAG target did not lead to significant difference between untreated and heat-killed oocysts (-0.15 \log_{10} viability reduction; $p > 0.05$; Table 2 and Online Resource 3).

Impact of PMAxx™ on the discrimination between viable and dead oocysts

As observed with PMA, the signal reduction of PMAxx™-qPCR targeting the 123-bp RE sequence was significantly higher in heated oocysts compared to untreated oocysts ($p < 0.05$, Fig. 4). However, unlike PMA, PMAxx™ caused a significant reduction of the PCR signal also in untreated oocysts ($p < 0.05$; Fig. 4). These results suggested that PMAxx™ would be less specific to heat-killed oocysts and/or that control oocysts would be more permeable to PMAxx™ than to PMA. Similar results were obtained for other RE-amplicon length and SporoSAG gene (Online Resource 4). Hence, in the tested conditions, PMAxx™ did not improve the discrimination between viable and dead oocysts compared to PMA.

Discussion

Information on the viability of *T. gondii* oocysts is crucial to establish the public health significance of the environmental transmission of the parasite. To date, only approaches based on infectivity of the parasites in laboratory animals and in vitro cell culture infection assays provide reliable information on oocyst viability and infectivity (Rousseau et al. 2018). However, these methods are not suitable for the assessment of exposure in humans, mainly due to their long time-to-results and ethical concerns for animal testing. In this regard, PMA-based PCR techniques appear promising in terms of implementation, cost, sensitivity, and rapid results (Zeng et al. 2016). In this purpose, our study addressed for the first time the potential of PMA-qPCR assay to discriminate viable versus dead *T. gondii* oocysts.

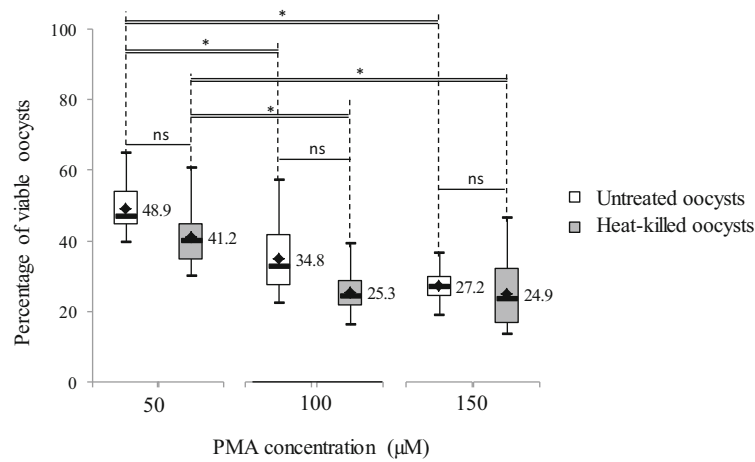


Fig. 2 Effect of PMA concentrations on the quantification of viable *T. gondii* oocysts in untreated and heat-killed suspensions. Untreated (white box) and heat-killed (99 °C, 5 min; gray box) oocysts (sporulated and unsporulated) were submitted to different PMA concentrations (50 to 150 µM) for 30 min in dark at 22 °C. Percentages of viable oocysts for each concentration were determined relative to oocysts without PMA.

Each box represents the interquartile range and the horizontal line represents the median viability percentage ($n = 2$ independent experiments in duplicates). The whiskers end at the largest and smallest viability percentages. Mean values (diamonds) are indicated. Asterisks and double traits show significant differences ($p < 0.05$); "ns" and single trait indicate no significant difference ($p > 0.05$)

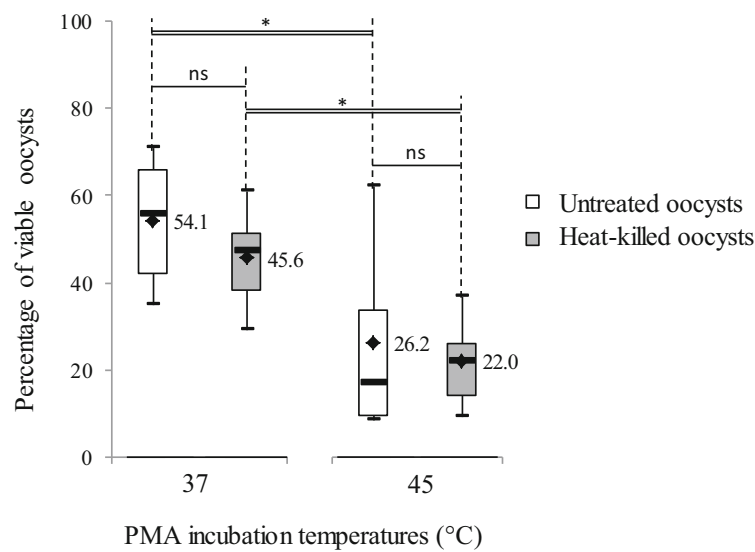


Fig. 3 Effect of PMA incubation temperatures on the quantification of viable *T. gondii* oocysts in untreated and heat-killed suspensions. Untreated (white box) and heat-killed (99 °C, 5 min; gray box) oocysts (sporulated and unsporulated) were submitted to 100 µM PMA for 30 min in dark at 37 or 45 °C. Percentages of viable oocysts for each concentration were determined relative to oocysts without PMA. Each

box represents the interquartile range and the horizontal line the median viability percentage ($n = 2$ independent experiments in duplicates). The whiskers end at the largest and smallest viability percentages. Mean values (diamonds) are indicated. Asterisks and double traits show significant differences ($p < 0.05$); "ns" and single trait indicate no significant difference ($p > 0.05$)

Table 2 Effect of amplicon length and of selected target gene on PMA–qPCR signal reduction (ΔCq) in untreated and heat-killed (99 °C, 5 min) oocysts

		Multicopy 529-bp RE sequence			Monocopy SporoSAG gene
		81 bp	123 bp	283 bp	71 bp
ΔCq^a	Untreated	-1.90 ± 0.62	-1.69 ± 0.66	-2.62 ± 0.95	-1.78 ± 1.06
	Heat-killed	-1.51 ± 0.37	-3.36 ± 0.85	-2.63 ± 1.05	-2.27 ± 0.55
Log_{10} viability reduction ^b		0.12	-0.5	0.003	-0.15

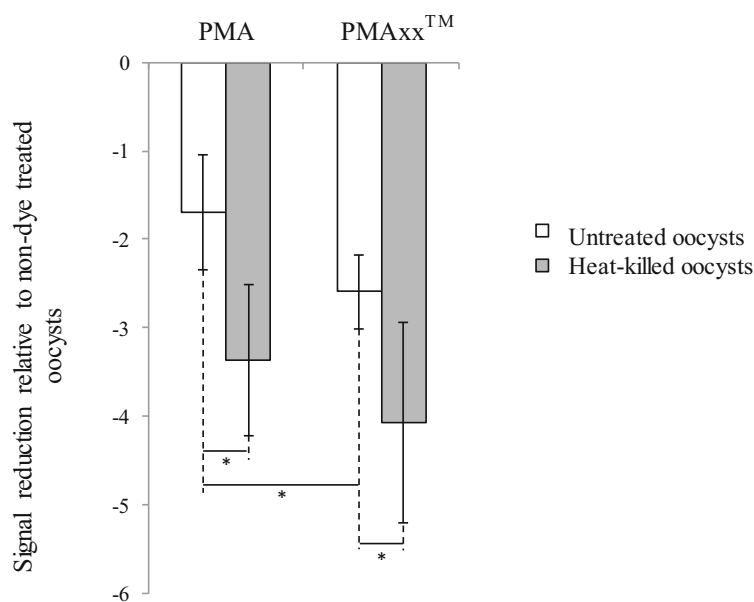
^a $\Delta Cq = Cq - \text{PMA} - Cq + \text{PMA}$ (100 μM , room temperature); mean values and standard deviations of three independent experiments, each in duplicates, are indicated

^b Viability reduction = $2^{-\Delta\Delta Cq}$; $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq \text{ heat-killed} - \Delta Cq \text{ untreated}$

Oocysts of *T. gondii* are considered to be almost impermeable to water-soluble molecules due to the molecular organization of the bilayered oocyst and sporocyst walls that surround the sporozoites (Ferguson et al. 1975; Speer et al. 1998; Dumètre et al. 2013). Consistent with this, most of the untreated oocysts excluded PMA while oocysts heated at 99 °C for 5 min were more permeable to PMA as assessed by confocal microscopy and flow cytometry. This suggests that such heating conditions could alter the integrity of the oocyst and sporocyst walls and sporozoite membrane thus favoring PMA inclusion into DNA. The effect of heating on the oocyst wall structure remains poorly documented in *T. gondii*. In contrast to our observations, Dumètre et al. (2013) reported that heating oocysts at 80 °C for 10 min can reduce infiltration of an IgM

monoclonal antibody specific to the inner layer of the oocysts wall, suggesting that, in these experimental conditions, heating did not affect microscopically the integrity of the oocyst walls. However, these results cannot be directly compared with our data as oocyst suspensions differed in age (< 3 m.o. vs. 8 m.o.) and storage conditions (dH₂O vs. sulfuric acid solution), and PMA is a much smaller molecule (440 Da) than IgM (970 kDa). Heating oocysts at 99 °C for 5 min could also induce more severe damages to oocysts than at 80 °C for 10 min, leading to PMA inclusion. Preliminary experiments showed that freeze/thaw cycling and heating allowed the incorporation of PMA into sporozoites while sonication treatment did not (data not shown). These results suggest that PMA staining could give information on the overall permeability of the

Fig. 4 Comparison of PMA and PMAxxTM qPCR assays in untreated and heat-killed *T. gondii* oocysts. Untreated (white bar) and heat-killed (99 °C, 5 min; gray bar) oocysts (sporulated and unsporulated) were submitted to 100 μM of PMA or PMAxxTM for 30 min in dark at 22 °C. The 123-bp RE sequence was amplified by qPCR. Signal reduction values were obtained by subtracting the Cq values of dye-treated oocysts from oocysts without dye. Means and standard deviations of three independent experiments in duplicates are indicated. Asterisks show significant differences ($p < 0.05$)



sporocyst and oocyst walls and be helpful to screen disinfecting agents acting on the oocyst wall structure and permeability. On the other hand, considering that some untreated viable oocysts can incorporate PMA, this dye would probably be not appropriate to assess the killing effect of molecules.

PMA treatment was then coupled with qPCR assays for viable/dead oocyst discrimination. The untreated oocyst suspensions showed between 27.2% and 48.9% of viable oocysts depending on PMA concentration. These percentages appeared to be lower than those determined by RT-qPCR assays (70%). However, viability percentages determined by these different methods could not be compared, as the recovery rates and stability of extracted DNA and mRNA could be different. The low level of viability measured in the untreated oocyst suspension by PMA-qPCR may reflect the existence of membrane-compromised oocysts as already described for bacteria (Fittipaldi et al. 2012). In our study, oocysts were purified from cat feces by sucrose flotation. This process could lead to the purification of wall compromised and even dead oocysts as reported for sucrose-purified *Cryptosporidium parvum* oocysts (Kar et al. 2011). Flow cytometry analyses support these findings showing 22.9% of PMA-positive oocysts in the untreated suspension.

The proportion of viable oocysts in untreated suspension decreased as PMA concentration increased up to 150 μ M. These results could be due to a cytotoxic effect of PMA in viable oocysts as described for bacteria such as *Listeria monocytogenes* and *Legionella pneumophila* (Fittipaldi et al. 2012). Such cytotoxicity was not observed in *C. parvum* oocysts submitted to 150 μ M PMA (Brescia et al. 2009). However, in their study, oocyst viability was determined by measuring the band intensity of PCR products on agarose gel which is a less sensitive method than qPCR performed in our study.

In the heat-killed oocyst suspension, PCR signal was still detected and the percentage of viability was not significantly different from the untreated oocysts. One can hypothesize that some oocysts still remained viable in the heated suspension. Based on mouse bioassays, *T. gondii* oocysts are no longer infective following heating above 60 °C (Ito et al. 1975; Travaillé et al. 2016; Ware et al. 2010). However, using RT-qPCR assays, it has been shown that non-infective oocysts may still be viable (Travaillé et al. 2016). In this study, inactivation following heating 5 min at 99 °C has been assessed by RT-qPCR and no signal was measured by RT-qPCR in heated oocysts indicating that no viable oocysts were present and that oocysts were efficiently killed, as already described (Travaillé et al. 2016). Such discrepancy between PMA-qPCR and RT-qPCR assays was already reported in *C. parvum* oocysts following exposure to ammonia (Liang and Keeley 2012). Altogether, our data indicate that oocysts were fully inactivated by heating for 5 min at 99 °C but that PMA-qPCR assay did not allow the observation of such inactivation.

Flow cytometry analyses revealed that 8.9% of heat-killed *T. gondii* oocysts remained impermeable to PMA. This result can suggest that heating does not lead to efficient oocyst wall permeabilization and PMA penetration, producing similar viability percentages in the control and heated oocyst suspensions. To improve PMA inclusion, oocysts were incubated with PMA at 37 and 45 °C with the aim of increasing wall permeability as described for the wall of bacteria and spores (Rawsthorne et al. 2009; Nkuipou-Kenfack et al. 2013). A lower viability percentage was indeed measured in heat-killed oocysts following PMA incubation at 45 °C, suggesting that PMA penetration was favored at this temperature. However, the viability percentage was also lowered in untreated oocysts, while no effect on viability was measured by RT-qPCR analyses (data not shown). This suggests that untreated oocysts were likely more permeable to PMA at 45 °C. Alternatively, the PMA pre-incubation step might impact on the efficacy of DNA extraction and/or DNA integrity, rather than on the oocysts' viability. Taken together, none of the pre-incubation conditions we tested allow an optimal discrimination of viable and heat-killed oocysts.

The length of the nucleic acid target has been shown to play a crucial role in the suppression of PMA-PCR signal (Contreras et al. 2011). qPCR signal was abolished for heated *G. duodenalis* cysts with a 605-bp but not 77-bp amplicon of the *tpi* gene (Alonso et al. 2014)). In the same way, Agullo-Barcello and collaborators (2014) also described a larger signal reduction using PMA-qPCR assays targeting a 834-bp versus 108-bp sequence of the 18S gene of *C. parvum* oocysts. In our study, new primers were designed to increase the amplicon length of the 529-bp RE target from 81 to 283 bp, while remaining suitable for TaqMan qPCR assays (Rodríguez-Lázaro and Hernández 2013). The 123-bp amplicon showed the larger signal reduction in heat-killed oocysts and allowed viable/dead oocyst discrimination contrarily to other amplicon lengths. However, as reported in *C. parvum* (Alonso et al. 2014), an increase in amplicon length was correlated with the decrease of PCR efficacy (85% for the 283-bp amplicon compared to 92% for the reference).

The 529-bp RE has been shown to be repeated 200 to 300 times in the genome of *T. gondii*. RE-based qPCR assays have been correlated with higher sensitivity for parasite detection in clinical (Homan et al. 2000; Edvinsson et al. 2006), food (Hohweyer et al. 2016), and water (Yang et al. 2009) samples. However, as suggested by Contreras and collaborators (2011), a high number of copies could limit the efficacy of the PMA assay because PMA could not bind covalently to some copies. To overcome this drawback, the single-copy SporoSAG was tested using already published TaqMan qPCR system (Travaillé et al. 2016); however, it failed to completely abolish PCR signal in heat-killed oocyst suspension and no significant difference could be measured between untreated and heated oocysts using this PCR target.

The new dye PMAxx™ is considered to be more effective than PMA at eliminating DNA amplification from dead cells. Moreover, it has been shown to be the best photoactivatable dye to detect signal reduction in thermally inactivated enteric viruses (Randazzo et al. 2016, 2018). Our results showed that, irrespective of the amplicon length and nucleic acid target, PMAxx™ PCR signals were still detected in heat-killed oocyst suspensions. With the exception of the SporoSAG gene, the PCR signal reductions measured in heated oocysts incubated with PMA and PMAxx™ were not significantly different. It should be noted that PMAxx™ was applied in distilled water that could limit its performances. Indeed, recent studies showed that the efficacy of PMAxx™ assay was improved by using PBS or Biotium Enhancer buffers instead of water (Randazzo et al. 2016, 2018). Like PMA, PMAxx™ provided discrimination between untreated and heat-killed oocysts only with the 123-bp RE amplicon. However, PMA–qPCR assay showed the highest level of viability reduction ($0.5 \log_{10}$) following heating of oocysts. This level remains however very low compared to the 3–4 \log_{10} viability reduction levels which are typically required for treatments intended to kill microorganisms (Nkuipou-Kenfack et al. 2013). Altogether, our results suggest that, in the tested conditions, PMA–qPCR underestimates the efficacy of heating in killing *T. gondii* oocysts.

The efficacy of PMA-based assay can be directly linked to the applied inactivation treatments and their effects on the cell integrity and membrane permeabilization that can correlate or not with the loss of viability (Cangelosi and Meschke 2014). Consistent with this, PMA–qPCR assays were able to show a decline in the viability of *C. parvum* oocysts exposed to hydrogen peroxide but not to ammonia, or following long-term storage (Liang and Keeley 2012). Preliminary results for *T. gondii* oocysts exposed to detergents showed a larger PMA–qPCR signal reduction than following heating treatment while still being infective (data not shown). Hence, the efficacy of PMA–qPCR assays for *T. gondii* oocysts submitted to other inactivation treatments have to be evaluated.

In conclusion, in the conditions tested in this study, PMA–qPCR is able to assess the reduction of *T. gondii* oocyst viability following heating. However, PCR signals can still be detected in heat-killed oocysts leading to an underestimation of the inactivation efficacy of heating. In this regard, further works are required to evaluate the potential of this technique following other inactivation treatments than heating and the relevance of PMA–qPCR assays to characterize inactivation efficacy of industrial processes. Considering that animal assays are not realistic for such assessments, the scientific community is challenged to develop a laboratory-accessible method for discriminating viable/infective from non-infective *T. gondii* oocysts.

Acknowledgements This work was supported by the UMT ACTIA PROTORISK and the Universities of Reims Champagne-Ardenne and Rouen Normandie, in the frame of a PhD with a CIFRE agreement. A.D. is supported by the Institut Hospitalo-Universitaire (IHU), the National Research Agency (grant 10-IAHU-03), the Région Provence Alpes Côte d’Azur, and European funding FEDER PRIMI. The authors thank MOBICYTE, URCACyt, and PICT platforms, University Reims Champagne-Ardenne. We thank Mrs. Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for checking spelling and grammar.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

- Agulló-Barceló M, Moss JA, Green J, Gillespie S, Codony F, Lucena F, Nocker A (2014) Quantification of relative proportions of intact cells in microbiological samples using the example of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Lett Appl Microbiol* 58:70–78
- Al-Megrin WAI (2010) Intestinal parasites infection among immunocompromised patients in Riyadh, Saudi Arabia. *Pak J Biol Sci PJBs* 13: 390–394
- Alonso JL, Amorós I, Guy RA (2014) Quantification of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in wastewater using propidium monoazide quantitative real-time PCR. *Parasitol Res* 113:2671–2678
- Baldursson S, Karanis P (2011) Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks—an update 2004–2010. *Water Res* 45:6603–6614
- Baril L, Ancelle T, Goulet V, Thulliez P, Tirard-Fleury V, Carme B (1999) Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case–control study in France. *Scand J Infect Dis* 31:305–309
- Brescia CC, Griffin SM, Ware MW, Varughese EA, Egorov AI, Villegas EN (2009) *Cryptosporidium* propidium monoazide-PCR, a molecular biology-based technique for genotyping of viable *Cryptosporidium* oocysts. *Appl Environ Microbiol* 75:6856–6863
- Cancino-Faure B, Fisa R, Alcover MM et al (2016) Detection and quantification of viable and nonviable *Trypanosoma cruzi* parasites by a propidium monoazide real-time polymerase chain reaction assay. *Am J Trop Med Hyg* 94:1282–1289. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0693>
- Cangelosi GA, Meschke JS (2014) Dead or alive: molecular assessment of microbial viability. *Appl Environ Microbiol* 80:5884–5891. <https://doi.org/10.1128/AEM.01763-14>
- Caradonna T, Marangi M, Del Chierico F et al (2017) Detection and prevalence of protozoan parasites in ready-to-eat packaged salads on sale in Italy. *Food Microbiol* 67:67–75. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.006>
- Cattani F, Barth VC, Nasário JSR et al (2016) Detection and quantification of viable *Bacillus cereus* group species in milk by propidium

- monoazide quantitative real-time PCR. *J Dairy Sci* 99:2617–2624. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10019>
- Cong W, Zhang N-Z, Hou J-L, Wang XC, Ma JG, Zhu XQ, Chen GJ (2017) First detection and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in market-sold oysters in China. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* 54:276–278. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.07.014>
- Contreras PJ, Urrutia H, Sossa K, Nocker A (2011) Effect of PCR amplicon length on suppressing signals from membrane-compromised cells by propidium monoazide treatment. *J Microbiol Methods* 87:89–95. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.07.016>
- Dubey JP (2010) *Toxoplasmosis of animals and humans*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, Florida
- Dumètre A, Dubey JP, Ferguson DJP et al (2013) Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:11535–11540
- Edvinsson B, Lappalainen M, Evengård B, ESCMID Study Group for Toxoplasmosis (2006) Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 12:131–136
- Elizaquível P, Aznar R, Sánchez G (2014) Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. *J Appl Microbiol* 116:1–13. <https://doi.org/10.1111/jam.12365>
- Ferguson DJ, Hutchison WM, Siim JC (1975) The ultrastructural development of the macrogamete and formation of the oocyst wall of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol Microbiol Scand [B]* 83:491–505
- Fittipaldi M, Nocker A, Codony F (2012) Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *J Microbiol Methods* 91:276–289. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.08.007>
- Fongaro G, Hernández M, García-González MC, Barardi CRM, Rodríguez-Lázaro D (2016) Propidium monoazide coupled with PCR predicts infectivity of enteric viruses in swine manure and biofertilized soil. *Food Environ Virol* 8:79–85. <https://doi.org/10.1007/s12560-015-9225-1>
- Ghozzi K, Marangi M, Papini R, Lahmar I, Challouf R, Houas N, Ben Dhiab R, Normanno G, Babba H, Giangaspero A (2017) First report of Tunisian coastal water contamination by protozoan parasites using mollusk bivalves as biological indicators. *Mar Pollut Bull* 117:197–202. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.057>
- Habtewold T, Groom Z, Duchateau L, Christophides GK (2015) Detection of viable plasmodium ookinetes in the midguts of *Anopheles coluzzi* using PMA-qrtPCR. *Parasit Vectors* 8:455. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1087-8>
- Harito JB, Campbell AT, Tysnes KR, Dubey JP, Robertson LJ (2017) Lectin-magnetic separation (LMS) for isolation of *Toxoplasma gondii* oocysts from concentrated water samples prior to detection by microscopy or qPCR. *Water Res* 114:228–236. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.02.044>
- Hohweyer J, Cazeaux C, Travaillé E, Languet E, Dumètre A, Aubert D, Terry C, Dubey JP, Azas N, Houssin M, Loïc F, Villena I, la Carbona S (2016) Simultaneous detection of the protozoan parasites *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* and *Giardia* in food matrices and their persistence on basil leaves. *Food Microbiol* 57:36–44. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.01.002>
- Homan WL, Vercammen M, De Brackeleer J, Verschueren H (2000) Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol* 30:69–75
- Inoue H, Takama T, Yoshizaki M, Agata K (2015) Detection of *Legionella* species in environmental water by the quantitative PCR method in combination with ethidium monoazide treatment. *Biocontrol Sci* 20:71–74. <https://doi.org/10.4265/bio.20.71>
- Ito S, Tsunoda K, Taki T, Nishikawa H, Matsui T (1975) Destructive effect of heating against *Toxoplasma* oocysts. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 15:128–130
- Kapperud G, Jenum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK, Eskild A, Eng J (1996) Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Results of a prospective case-control study in Norway. *Am J Epidemiol* 144:405–412
- Kar S, Gawłowska S, Dausgchies A, Bangoura B (2011) Quantitative comparison of different purification and detection methods for *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Vet Parasitol* 177:366–370. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.005>
- Karanis P, Aldeyari HM, Mirhashemi ME, Khalil KM (2012) The impact of the waterborne transmission of *Toxoplasma gondii* and analysis efforts for water detection: an overview and update. *Environ Sci Pollut Res Int* 20(1):86–99
- Lalle M, Possenti A, Dubey JP, Pozio E (2018) Loop-mediated isothermal amplification-lateral-flow dipstick (LAMP-LFD) to detect *Toxoplasma gondii* oocyst in ready-to-eat salad. *Food Microbiol* 70:137–142. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.10.001>
- Lee E-S, Lee M-H, Kim B-S (2015) Evaluation of propidium monoazide-quantitative PCR to detect viable *Mycobacterium fortuitum* after chlorine, ozone, and ultraviolet disinfection. *Int J Food Microbiol* 210:143–148. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.019>
- Liang Z, Keeley A (2012) Comparison of propidium monoazide-quantitative PCR and reverse transcription quantitative PCR for viability detection of fresh *Cryptosporidium* oocysts following disinfection and after long-term storage in water samples. *Water Res* 46:5941–5953
- Ma J, Feng Y, Hu Y, Villegas EN, Xiao L (2016) Human infective potential of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bienersi* in urban wastewater treatment plant effluents. *J Water Health* 14:411–423. <https://doi.org/10.2166/wh.2016.192>
- Marchioro AA, Tiyo BT, Colli CM, de Souza CZ, Garcia JL, Gomes ML, Falavigna-Guilherme AL (2016) First detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the fresh leaf of vegetables in South America. *Vector Borne Zoonotic Dis Larchmt* 16:624–626. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1937>
- Moreno Y, Moreno-Mesonero L, Amorós I, Pérez R, Morillo JA, Alonso JL (2018) Multiple identification of most important waterborne protozoa in surface water used for irrigation purposes by 18S rRNA amplicon-based metagenomics. *Int J Hyg Environ Health* 221:102–111. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.10.008>
- Nkuipou-Kenfack E, Engel H, Fakh S, Nocker A (2013) Improving efficiency of viability-PCR for selective detection of live cells. *J Microbiol Methods* 93:20–24. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.01.018>
- 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
- Randazzo W, López-Gálvez F, Allende A, Aznar R, Sánchez G (2016) Evaluation of viability PCR performance for assessing norovirus infectivity in fresh-cut vegetables and irrigation water. *Int J Food Microbiol* 229:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.010>
- Randazzo W, Piqueras J, Rodríguez-Díaz J, Aznar R, Sánchez G (2018) Improving efficiency of viability-qPCR for selective detection of infectious HAV in food and water samples. *J Appl Microbiol* 124:958–964. <https://doi.org/10.1111/jam.13519>
- Rawsthorne H, Dock CN, Jaykus LA (2009) PCR-based method using propidium monoazide to distinguish viable from nonviable *Bacillus subtilis* spores. *Appl Environ Microbiol* 75:2936–2939. <https://doi.org/10.1128/AEM.02524-08>

- Robert-Gangneux F, Dardé M-L (2012) Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev* 25:264–296. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>
- Rodríguez-Lázaro D, Hernández M (2013) Introduction to the real-time polymerase chain reaction. In: Rodríguez-Lázaro D (ed) *Real-time PCR in food science: current technology and application*. Caister Academic Press, Norfolk, pp 3–19
- Rousseau A, La Carbona S, Dumétre A et al (2018) Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne stages (cysts/oocysts) of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii*: a review of methods. *Parasite Paris Fr* 25:14. <https://doi.org/10.1051/parasite/2018009>
- Speer CA, Clark S, Dubey JP (1998) Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 84: 505–512
- Sung K, Hiatt KL, Stern NJ (2005) Heat-treated *Campylobacter* spp. and mRNA stability as determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Foodborne Pathog Dis* 2:130–137. <https://doi.org/10.1089/fpd.2005.2.130>
- Tei FF, Kowalyk S, Reid JA, Presta M, Yesudas R, Mayer DC (2016) Assessment and molecular characterization of human intestinal parasites in bivalves from Orchard Beach, NY, USA. *Int J Environ Res Public Health* 13:381. <https://doi.org/10.3390/ijerph13040381>
- Travaillé E, La Carbona S, Aubert D et al (2016) Development of qRT-PCR method to assess viability of *Giardia intestinalis* cysts, and *Cryptosporidium* spp. and *Toxoplasma gondii* oocysts. *Food Control* 59:359–365
- Vande Burgt NH, Auer A, Zintl A (2018) Comparison of in vitro viability methods for *Cryptosporidium* oocysts. *Exp Parasitol* 187:30–36. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.03.002>
- Vesper S, McKinstry C, Hartmann C, Neace M, Yoder S, Vesper A (2008) Quantifying fungal viability in air and water samples using quantitative PCR after treatment with propidium monoazide (PMA). *J Microbiol Methods* 72:180–184. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.11.017>
- Villena I, Aubert D, Gomis P, Ferte H, Ingland JC, Denis-Bisiaux H, Dondon JM, Pisano E, Ortis N, Pinon JM (2004) Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. *Appl Environ Microbiol* 70:4035–4039
- 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
- Wells B, Shaw H, Innocent G, Guido S, Hotchkiss E, Parigi M, Opsteegh M, Green J, Gillespie S, Innes EA, Katzer F (2015) Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in water samples from Scotland and a comparison between the 529 bp real-time PCR and ITS1 nested PCR. *Water Res* 87:175–181. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.015>
- Xiao L, Zhang L, Wang HH (2012) Critical issues in detecting viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time reverse transcriptase PCR. *J Food Prot* 75:512–517. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-346>
- Yang W, Lindquist HDA, Cama V, Schaefer FW, Villegas E, Fayer R, Lewis EJ, Feng Y, Xiao L (2009) Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water sample concentrates by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 75:3477–3483
- Yu S, Yan L, Wu X, Li F, Wang D, Xu H (2017) Multiplex PCR coupled with propidium monoazide for the detection of viable *Cronobacter sakazakii*, *Bacillus cereus*, and *Salmonella* spp. in milk and milk products. *J Dairy Sci* 100:7874–7882. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13110>
- Zeng D, Chen Z, Jiang Y, Xue F, Li B (2016) Advances and challenges in viability detection of foodborne pathogens. *Front Microbiol* 7:1833. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01833>

1 **Online Resource 1**

2 **Evaluation of propidium monoazide-based qPCR to detect viable oocysts of *Toxoplasma gondii***

3 **Parasitology Research**

4 Angélique Rousseau, Isabelle Villena, Aurélien Dumètre, Sandie Escotte-Binet, Loïc Favennec, Jitender P.

5 Dubey, Dominique Aubert, Stéphanie La Carbona *

6 **Corresponding author***: Stéphanie La Carbona, s.lacarbona@actalia.eu, Phone : (33) 2 33 06 71 71

7 ACTALIA, 310 Rue Popielujko, 50 000 Saint-Lô, FRANCE

8

9 Statistical analyses of viability percentages in untreated and heat-killed (99°C, 5 min) oocyst
10 suspensions determined by PMA-qPCR (data obtained with AnaStats).

	PMA incubation temperature			
	37°C		45°C	
Number of groups	6 ^a		6 ^a	
Number of data ^b	96		72	
Kruskal-Wallis statistic (H)	66.8		32.9	
Alpha	0.05		0.05	
Is the test significant?	Yes		Yes	
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank difference ^c	Significative?	Mean rank difference ^c	Significative?
Untreated 50 vs. 100	7.16	No	15.44	No
Untreated 50 vs. 150	43.50	Yes	25.75	No
Untreated 100 vs. 150	36.34	Yes	10.31	No
Heat-killed 50 vs. 100	23.63	No	16.47	No
Heat-killed 50 vs. 150	64.00	Yes	38.13	No
Heat-killed 100 vs. 150	40.38	Yes	21.66	Yes
Untreated 50 vs. Heat-killed 50	6.22	No	5.19	No
Untreated 100 vs. Heat-killed 100	10.25	No	4.16	No
Untreated 150 vs. Heat-killed 150	14.28	No	7.19	No

11 ^a Untreated vs. Heat-killed (sporulated and unsporulated); 50 vs. 100 vs. 150 µM PMA

12 ^b Percentage viability values

13 ^c Absolute value

14

15

1 **Online Resource 2**

2 **Evaluation of propidium monoazide-based qPCR to detect viable oocysts of *Toxoplasma gondii***

3 **Parasitology Research**

4 Angélique Rousseau, Isabelle Villena, Aurélien Dumètre, Sandie Escotte-Binet, Loïc Favennec, Jitender P.

5 Dubey, Dominique Aubert, Stéphanie La Carbona *

6 **Corresponding author***: Stéphanie La Carbona, s.lacarbona@actalia.eu, Phone: (33) 2 33 06 71 71

7 ACTALIA, 310 Rue Popielujko, 50 000 Saint-Lô, FRANCE

8

9 Mean viability percentages of untreated and heat-killed (99°C, 5 min) oocyst suspensions (sporulated
10 and unsporulated) measured by PMA-qPCR targeting the 81 bp-RE sequence.

	PMA incubation temperature								
	RT			37°C			45°C		
	PMA concentration (µM)			PMA concentration (µM)			PMA concentration (µM)		
	50	100	150	50	100	150	50	100	150
Untreated ^a	48.9%	34.8%	27.2%	61.8%	54.1%	27.2%	25.1%	26.2%	14.0%
Heat-killed ^a	41.2%	25.3%	24.9%	68.9%	45.6%	14.9%	33.2%	22.0%	12.3%

11 ^a Viability % = $2^{\Delta Cq} \times 100$, with $\Delta Cq = Cq\text{-PMA} - Cq\text{+PMA}$. Mean values of a minimum of two

12 independent experiments, each in duplicates.

13

1 **Online Resource 3**

2 **Evaluation of propidium monoazide-based qPCR to detect viable oocysts of *Toxoplasma gondii***

3 **Parasitology Research**

4 Angélique Rousseau, Isabelle Villena, Aurélien Dumètre, Sandie Escotte-Binet, Loïc Favennec, Jitender P.

5 Dubey, Dominique Aubert, Stéphanie La Carbona *

6 **Corresponding author***: Stéphanie La Carbona, s.lacarbona@actalia.eu, Phone: (33) 2 33 06 71 71

7 ACTALIA, 310 Rue Popielujko, 50 000 Saint-Lô, FRANCE

8

9 Statistical analyses of signal reductions obtained in untreated and heat-killed (99°C, 5 min) oocyst
 10 suspensions by PMA-qPCR with different amplicon length of the multicopy 529 pb-RE and with the
 11 monocopy SporoSAG gene (data obtained with AnaStats).

Number of groups	8 ^a	
Number of data ^b	288	
Kruskal-Wallis statistic (H)	94.5	
Alpha	0.05	
Is the test significatif?	Yes	
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank difference ^c	Significatif?
Untreated 80 bp-RE vs. 123 bp-RE	22.42	No
Untreated 80 bp-RE vs.283 bp-RE	60.22	Yes
Untreated 123 bp-RE vs.283 bp-RE	82.64	Yes
Untreated 80 bp-RE vs. SporoSAG	4.64	No
Untreated 123 bp-RE vs. SporoSAG	17.78	No
Untreated 283 bp-RE vs. SporoSAG	64.86	Yes
Heat-killed 80 bp-RE vs.123 bp-RE	152.78	Yes
Heat-killed 80 bp-RE vs. 283 bp-RE	97.47	Yes
Heat-killed 123 bp-RE vs. 283 bp-RE	55.31	No
Heat-killed 80 bp-RE vs. SporoSAG	77.14	Yes
Heat-killed 123 bp-RE vs. SporoSAG	75.64	Yes
Heat-killed 283 bp-RE vs. SporoSAG	20.33	No
Untreated 80 bp-RE vs. heat-killed 80 bp-RE	39.36	No
Untreated 123 bp-RE vs. heat-killed 123 bp-RE	135.83	Yes
Untreated 283 bp-RE vs. heat-killed 283 bp-RE	2.11	No
Untreated SporoSAG vs. heat-killed SporoSAG	42.42	No

12 ^a Untreated vs. Heat-killed (sporulated and unsporulated); 80 vs. 123 vs. 283 bp-RE vs. SporoSAG

13 ^b Signal reduction values, $\Delta Cq = Cq\text{-PMA-Cq} + \text{PMA}$ (100 μM at RT)

14 ^c Absolute value

15 RE, Repeat-Element

1 **Online Resource 4**

2 **Evaluation of propidium monoazide-based qPCR to detect viable oocysts of *Toxoplasma gondii***

3 **Parasitology Research**

4 Angélique Rousseau, Isabelle Villena, Aurélien Dumètre, Sandie Escotte-Binet, Loïc Favennec, Jitender P.

5 Dubey, Dominique Aubert, Stéphanie La Carbona *

6 **Corresponding author***: Stéphanie La Carbona, s.lacarbona@actalia.eu, Phone: (33) 2 33 06 71 71

7 ACTALIA, 310 Rue Popielujko, 50 000 Saint-Lô, FRANCE

8

9 Effect of amplicon length and of the copy number of the target sequence on PMAxxTM-qPCR signal

10 reduction (ΔCq) in untreated and heat-killed (99°C, 5 min) oocysts (sporulated and unsporulated).

		Multicopy 529 bp-RE sequence			Monocopy SporoSAG gene
		81 bp	123 bp	283 bp	71 bp
ΔCq^a	Untreated	-2.29 ± 0.45	-2.59 ± 0.42	-3.54 ± 0.84	-3.32 ± 0.75
	Heat-killed	-1.89 ± 0.82	-4.08 ± 1.13	-2.04 ± 0.93	-3.87 ± 1.52
\log_{10} Viability reduction ^b		0.12	-0.45	0.45	-0.17

11 ^a $\Delta Cq = Cq\text{-PMAxx}^{\text{TM}} - Cq\text{+PMAxx}^{\text{TM}}$ (100 $\mu\text{mol l}^{-1}$, room temperature); mean values of three

12 independent experiments, each in duplicates.

13 ^b Viability reduction = $2^{\Delta\Delta Cq}$; $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq \text{ Heat-killed} - \Delta Cq \text{ Untreated}$.

14

1.A.1.2. PMA-qPCR pour évaluer la viabilité des oocystes de *C. parvum* et des kystes de *G. duodenalis*.

Matériels et méthodes

a) Oocystes et kystes : non traités et inactivés

Des oocystes de *C. parvum* (isolat Iowa) et les kystes de *G. duodenalis* (isolat H3, assemblage B) viables, provenant respectivement de selles de veaux et de gerbilles expérimentalement infectés, fournis par Waterborne™ Inc (Nouvelle-Orléans, Etats-Unis ; ref. *C. parvum* #P102C ; ref *G. duodenalis* #P101). Les suspensions de parasites sont stockées à 4°C en PBS 1X en présence d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine, gentamycine), amphotéricine B et 0,01% de Tween 20 sur des durées n'excédant pas un mois (*G. duodenalis*) ou 3-4 mois (*C. parvum*) afin de garantir leur viabilité. Chaque suspension parasitaire reçue par le laboratoire est numérotée sur lame Kova (Kova® Slide 10) en PBS 1X par microscopie en contraste de phase avec un grossissement 400 (Axioskop 40, ZEISS SAS, Allemagne).

Les pourcentages de viabilité de chaque suspension d'oocystes de *C. parvum* et de kystes de *G. duodenalis* sont déterminés par RT-qPCR (cf. Partie 1.A.1.2. Section c) et sont estimés à 96% pour *C. parvum* et à 87% pour *G. duodenalis*

Des oocystes de *C. parvum* et des kystes de *G. duodenalis* traités par le froid (-20°C à -15°C pendant une nuit) et la chaleur (+70°C, 15 min) sont fournis par Waterborne™ Inc (Nouvelle-Orléans, Etats-Unis; ref. *C. parvum* #P102C; ref *G. duodenalis* #P101). Des parasites ont aussi été inactivés au laboratoire (+70°C, 15 min). L'absence de viabilité de chaque suspension parasitaire inactivée est contrôlée par RT-qPCR (cf. Partie 1.A.1.2. Section c).

b) Marquage PMA, extraction d'ADN et qPCR

Les procédures décrites pour les oocystes de *T. gondii* (Rousseau *et al.*, 2019 ; cf. Partie 1.A.1.1.) ont été appliquées. Brièvement : 10 000 oocystes/kystes non traités et inactivés par la chaleur ou le froid ont été incubés avec 50, 100 ou 150 µM de PMA (Biotium Inc, Hayward, WI, USA) à température ambiante, 37°C ou 45°C pendant 30 min à l'obscurité, en vortexant toutes les 5 min. Pour chaque série d'expériences, des oocystes non traités et tués à la chaleur ont subi les mêmes conditions d'incubation sans PMA. Les échantillons ont ensuite été photoactivés par exposition aux LEDs pendant 15 min (Système PhAST Blue ; GenIUL, Barcelona, Spain), puis lavés trois fois avec de l'eau milliQ (5 000 g, 5 min). Le

culot d'oocystes/kystes a enfin été remis en suspension dans 55 μL de d'eau milliQ et l'ADN a été extrait en utilisant le kit InstaGeneTM Matrix selon les recommandations du fabricant.

La qPCR a été réalisée à l'aide du thermocycleur Quant studio® 3 Real-Time PCR System (ThermoFisher, Scientific Inc, Villebon-sur-Yvette, France). Pour *G. duodenalis* la réaction de qPCR est effectuée dans un volume final de 25 μL contenant 12,5 μL de iQTM Supermix (Bio Rad, Marnes la Coquette, France), 1 μL de BSA 10 mg / mL (SIGMA, France), 1 μL de chaque amorce 20 μM , 0,5 μL de sonde 10 μM , 5 μL de matrice d'ADN et 4 μL d'eau DNase-RNase (5PRIME). Pour *C. parvum*, 0,25 μL de sonde 10 μM et 4,25 μL d'eau DNase-RNase (5PRIME) sont utilisés. Les caractéristiques des amorces et sondes sont présentées dans le **Tableau VII**.

Tableau VII : Cibles de qPCR pour *C. parvum* et *G. duodenalis*.

Organisme	Région ciblée	Séquences des amorces	Séquence des sondes	Taille amplicon	Références
<i>G. duodenalis</i>	16S-like	G-127R: 5'-TTG CCA GCG GTG TCC G- 3'	GP-105T: TXR 5' CCC GCG GCG GTC CCT GCT AG 3' BHQ2	63 pb	Verweij <i>et al.</i> , 2003
	RNA (M54878.1)	G-80F: 5'-GAC GGC TCA GGA CAA CGG TT- 3'			
<i>C. parvum</i>	AF188110	CRYPTO-F: 5' CGC TTC TCT AGC CTT TTC ATG A 3'	CRYPTO-P: FAM 5'CCA ATC ACA GAA TCA TCA GAA TCG ACT GGT ATC 3' BQH1	138 pb	Laxer <i>et al.</i> , 1991 Fontaine et Guillot, 2002
		CRYPTO-R: 5' CTT CAC GTG TGT TTG CCA AT 3'			

Les paramètres du cycle qPCR comprennent une étape de dénaturation à + 95 ° C pendant 3 min, suivie de 40 cycles à + 95 ° C pendant 15 secondes et de + 65 ° C pendant 1 minute. Les valeurs de Cq correspondent au cycle de quantification.

c) Extraction d'ARNm et RT-qPCR

L'extraction d'ARNm est réalisée à partir de 10⁴ oocystes de *G. duodenalis* et *C. parvum* resuspendus dans 200 μL d'eau et les ARNm sont élués dans 50 μL de Tris-HCL 10 mM (Travaillé *et al.*, 2016) puis traités à la Dnase comme précédemment décrit (Rousseau *et al.*, 2019, Partie 1.A.1.1).

La RT-qPCR est réalisée sur 2 μL d'ARNm traités à la DNase comme publiée précédemment (Travaillé *et al.*, 2016 ; Rousseau *et al.*, 2019 ; Partie 1.A.1.1). Les caractéristiques des amorces et sondes sont présentées dans le **Tableau VIII**.

Tableau VIII : Cibles de RT-qPCR pour *C. parvum* et *G. duodenalis*.

Organisme	Région ciblée	Séquences des amorces	Séquence des sondes	Taille amplicon	Références
<i>G. duodenalis</i>	β giardine	β giardine-F 5'-CCT CAA GAG CCT GAA CGA-3' β giardine-R 5'-AGC TGG TCG TAC ATC TTC TT-3'	β giardine P: 5'FAM-AGA CGG GCA TTG CCA CGG AGA A-3' BHQ1	75 pb	Travaillé <i>et al.</i> , 2016
<i>C. parvum</i>	HSP70	HSP70-F 5'-GGA TGC AGG TGC AAT TGC T-3' HSP70-R 5'-CTC TCG CCA GTT CCT TTC TTA TCA-3'	HSP70-P : 5'CY5-ATG TAA TGA GAA TCA TTA ACG AGC CAA CTG CAG CT-3' BHQ2	97 pb	Travaillé <i>et al.</i> , 2016

d) Analyses statistiques

Les pourcentages de viabilité et les valeurs de réduction du signal ont été comparés en utilisant le test non paramétrique de Kruskal Wallis. Si l'hypothèse nulle H0 (les conditions testées n'ont pas d'effet sur la valeur mesurée) est rejetée, le test post hoc de Wilcoxon-Mann-Whitney est appliqué pour deux échantillons indépendants. Tous les tests statistiques ont été effectués à l'aide de StatXact7. La différence était considérée significative lorsque la p-value < 0,05.

Résultats

Une approche similaire à celle publiée pour les oocystes de *T. gondii* (Rousseau *et al.*, 2019, Partie 1.A.1.1) a été mise en œuvre pour les oocystes de *C. parvum* et les kystes de *G. duodenalis*. Plusieurs paramètres ont été étudiés : la concentration en PMA (50, 100 et 150 µM) et la température d'incubation (température ambiante, 37°C et 45°C). D'après les valeurs de C_q obtenues en qPCR après incubation avec PMA (**Tableau IX**), les pourcentages de viabilité ont été calculés ($2^{(C_{q-PMA} - C_{q+PMA})} \times 100$) dans chacune des conditions et chacune des suspensions comme décrit pour *T. gondii* (Rousseau *et al.*, 2019, Partie 1.A.1.1).

Quelle que soit la concentration de PMA à température ambiante, aucune condition d'inactivation ne permet d'abolir totalement le signal en qPCR des oocystes/kystes inactivés par le froid ou par la chaleur, alors qu'aucun parasite viable n'a été détecté par RT-qPCR (**Tableau IX**). La viabilité moyenne des kystes de *G. duodenalis* non traités varie de 27,2% à 97,5% et diminue plus la concentration de PMA augmente (**Figure 8**, p-value < 0,05). Ces premiers résultats soulignent un potentiel effet toxique du PMA à forte concentration sur les kystes de *Giardia*. La viabilité des kystes de *Giardia* inactivés par la chaleur est significativement plus faible à 100 µM de PMA (2,6%, p-value < 0,05) par rapport à 50 et 150 µM de PMA (respectivement 15,2% et 16,0%). Pour les kystes de *Giardia* inactivés par le froid, la viabilité moyenne varie entre 12,7 et 20%. La différence du pourcentage de viabilité entre les kystes non traités et inactivés par la chaleur est plus importante que lors de l'inactivation par le froid à 100 et 150 µM de PMA (p-value < 0,05). Ainsi, en fonction du traitement d'inactivation, la réduction de la viabilité des kystes de *G. duodenalis* mesurée en PMA-qPCR est variable. Pour les oocystes de *C. parvum* non traités, la viabilité moyenne détectée est très faible (2,4% à 7,2%) et diminue encore significativement avec l'augmentation de la concentration de PMA (**Figure 8** ; p-value < 0,05). Aucune différence entre les oocystes non traités et inactivés (par le froid ou la chaleur) ne peut être mise en évidence dans ces conditions (**Figure 8**, p-value > 0,05). Par conséquent, l'effet des différents traitements d'inactivation sur les oocystes de *C. parvum* ne peut être évalué après incubation du PMA à température ambiante.

Tableau IX: Valeurs de Cq obtenues par PMA-qPCR et RT-qPCR pour des oocystes de *C. parvum* et des kystes de *G. duodenalis* viables et inactivés par le froid (une nuit entre -20 et -15°C) ou la chaleur (15 min, 70°C).

Les résultats à différentes concentrations de PMA (0 à 150 µM) et températures d'incubation (température ambiante (RT), 37 et 45°C) sont présentés. La moyenne des Cq et les écart-types sont indiqués. (a) : 2/4 réplicats positifs ; (b) : 1/4 réplicats positifs.

		Incubation T°C	PMA qPCR												RT-qPCR
			RT				37°C				45°C				
			[PMA] (µM)	0	50	100	150	0	50	100	150	0	50	100	
<i>G. duodenalis</i>	Non traités	Cq moyen	22,18	21,86	22,67	24,26	22,52	21,97	22,17	23,19	22,37	23,55	23,04	23,38	32,10
		Ecart-type	0,06	0,45	0,42	0,91	0,65	0,14	0,46	1,33	0,15	0,56	0,11	0,30	0,51
	15 min 70°C	Cq moyen	22,61	25,82	29,22	25,27	22,49	26,47	25,89	25,59	22,94	26,43	26,07	28,42	N/A
		Ecart-type	0,30	1,42	2,61	0,06	0,09	0,76	0,05	0,70	0,92	0,85	0,68	0,87	N/A
	une nuit -20 à -15°C	Cq moyen	21,21	23,54	24,32	24,19	23,17	25,85	24,80	25,45	23,94	28,08	27,21	28,82	N/A
		Ecart-type	0,02	0,11	1,16	0,15	0,04	1,44	0,94	0,17	0,19	1,29	0,97	0,18	N/A
<i>C. parvum</i>	Non traités	Cq moyen	27,68	31,54	33,13	33,12	32,12	31,97	32,89	32,89	28,63	30,76	31,73	33,07	31,91
		Ecart-type	0,29	0,40	0,48	0,88	0,13	0,54	1,33	1,33	0,43	0,49	0,57	0,47	0,03
	15 min 70°C	Cq moyen	30,94	35,50	36,07	35,23	31,08	35,39	38,11	38,89	30,16	38,58 (a)	38,39 (b)	N/A	N/A
		Ecart-type	0,47	0,90	1,86	1,58	0,49	0,71	1,89	0,52	0,25	2,06	N/A	N/A	N/A
	une nuit -20 à -15°C	Cq moyen	28,57	33,14	34,33	35,06	29,01	34,19	34,68	35,37	29,39	35,76	37,67	37,08	N/A
		Ecart-type	0,03	0,28	0,24	1,87	0,20	0,78	1,14	0,67	0,21	0,38	1,25	0,92	N/A

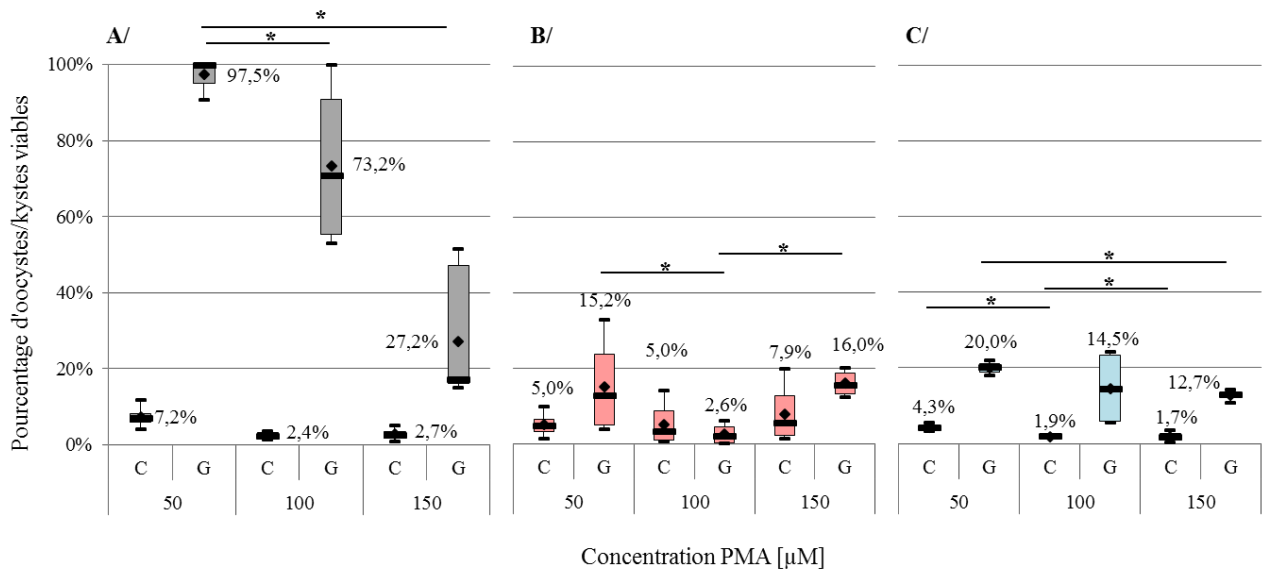


Figure 8 : Effet des concentrations de PMA appliquées à température ambiante sur des suspensions d'oocystes de *C. parvum* (C) et de kystes de *G. duodenalis* (G) viables et inactivées par la chaleur ou le froid.

A. oocystes (C)/kystes (G) non traités (=viables) ; **B.** oocystes (C)/kystes (G) inactivés par la chaleur (15 min 75°C) ; **C.** oocystes (C)/kystes (G) inactivés par le froid (une nuit entre -20 et -15°C). Chacune des suspensions d'oocystes/kystes a été soumise ou non à différentes concentrations de PMA (50 à 150 µM) pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante. Les pourcentages d'oocystes viables pour chaque concentration ont été calculés par rapport aux oocystes incubés sans PMA. La valeur du 1er quartile (25% des échantillons) correspond au trait inférieur de la boîte et le 3^{ème} quartile (75% des échantillons), au trait supérieur de la boîte. La valeur du 2^{ème} quartile (50% des échantillons), correspondant au pourcentage de viabilité médian, est représentée par un trait horizontal à l'intérieur de la boîte. Les moustaches représentées de part et d'autre de la boîte correspondent au plus grand et plus petit pourcentage de viabilité. Les valeurs moyennes sont représentées par des losanges. Les astérisques montrent des différences significatives (p-value <0,05).

Afin de vérifier si la persistance d'un signal en PMA-qPCR dans les parasites inactivés était due à un défaut de pénétration du PMA dans les oocystes et kystes, des températures d'incubation plus élevées (37 et 45°C) ont été testées pour accroître la perméabilité au PMA. Une réduction totale du signal de qPCR est observée uniquement pour les oocystes de *C. parvum* inactivés par la chaleur à 45°C à 150 µM de PMA (**Tableau IX**). C'est la seule condition qui permet de corréler les résultats de viabilité mesurés en PMA-qPCR et RT-qPCR.

Les pourcentages de viabilité ont été calculés à 37°C et 45°C pour des suspensions d'oocystes/kystes non traitées et inactivées par le froid ou la chaleur pour *G. duodenalis* et *C. parvum* à 50 µM de PMA (**Figure 9**). Cette concentration a été retenue car : (i) elle permettait d'obtenir le pourcentage de viabilité le plus élevé dans les suspensions d'oocystes/kystes non traités ; (ii) pour *C. parvum*, cette concentration est la seule qui a permis d'obtenir un pourcentage de viabilité significativement différent ($p < 0,05$) entre la suspension non traitée (7,2%) et les suspensions inactivées par le froid (4,3%) ou la chaleur (5,0%) ; (iii) pour *Giardia*, l'estimation de la viabilité de la suspension non traitée en PMA-qPCR (97%) était la plus proche de celle obtenue en RT-qPCR (87%) ; enfin (iv) cette concentration permet d'appliquer un protocole unique sur *Giardia* et *Cryptosporidium*.

La viabilité des kystes de *G. duodenalis* inactivés par le froid est plus faible à 45°C (8% de viabilité) qu'à 37°C (22% de viabilité) (**Figure 9**, p -value $< 0,05$). L'incorporation du PMA semble donc être favorisée à 45°C mais la viabilité des kystes non traités est fortement altérée à cette température (98% à 37°C et 37% à 45°C, **Figure 9**, p -value $< 0,05$). En revanche, le phénomène inverse est observé pour les kystes de *Giardia* inactivés par la chaleur avec 7% de viabilité à 37°C et 29 % à 45°C (p -value $< 0,05$). Au vu de l'ensemble des résultats pour *G. duodenalis*, le protocole de PMA-qPCR retenu pour les kystes est le suivant : 50 µM de PMA pendant 30 minutes à 37°C.

Concernant les oocystes de *C. parvum* non traités, le pourcentage de viabilité (6%) reste très faible à 37°C (**Figure 9**), comme à température ambiante. Aucune différence entre la condition non traitée et l'inactivation par le froid ou la chaleur ne peut être observée (**Figure 9**, p -value $> 0,05$). Cependant à 45°C, le pourcentage de viabilité augmente dans la suspension non traitée (15%) mais reste tout de même très largement en dessous des 96% de viabilité estimée en RT-qPCR. Le pourcentage de viabilité diminue pour les oocystes inactivés par la chaleur (0%) et le froid (1,4%), mettant en évidence une différence

significative entre les suspensions non traitées et traitées, bien que faible (**Figure 9**, p-value < 0,05). Ainsi, le protocole de PMA-qPCR pour les oocystes de *C. parvum* retenu est le suivant : 50 μ M de PMA pendant 30 minutes à 45°C.

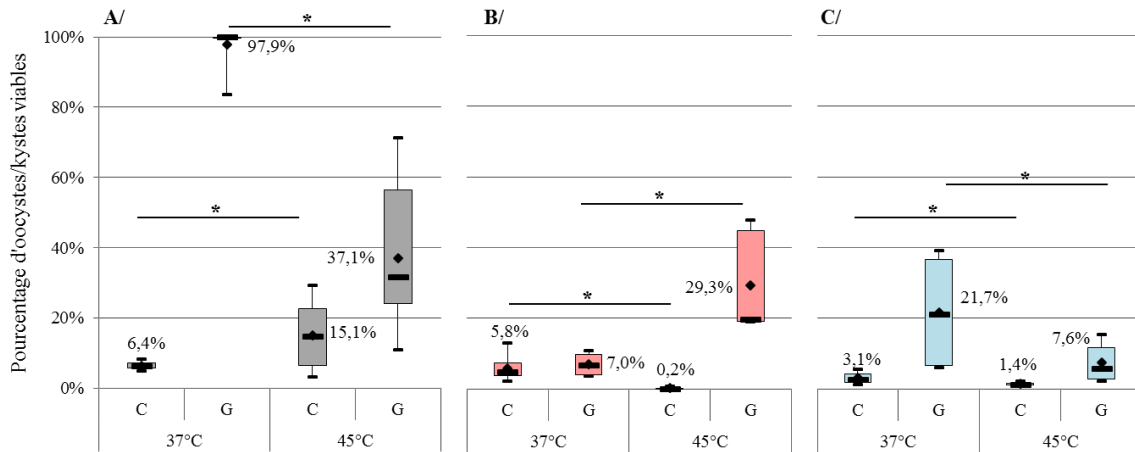


Figure 9 : Effet des températures d'incubation du PMA sur des suspensions d'oocystes de *C. parvum* et de kystes de *G. duodenalis* viables et inactivées par la chaleur ou le froid.

A. oocystes/kystes non traités (=viables) ; **B.** oocystes/kystes inactivés par la chaleur (15 min 75°C); **C.** oocystes/kystes inactivés par le froid (une nuit entre -20 et -15°C). Les kystes de *G. duodenalis* et les oocystes de *C. parvum* (non traités et inactivés par le froid ou la chaleur) ont été soumis ou non à 50 μ M de PMA pendant 30 minutes à l'obscurité à 37°C ou 45°C. Les pourcentages d'oocystes/kystes viables pour chaque concentration ont été calculés par rapport aux oocystes/kystes incubés sans PMA. La valeur du 1^{er} quartile (25% des échantillons) correspond au trait inférieur de la boîte et le 3^{ème} quartile (75% des échantillons), au trait supérieur de la boîte. La valeur du 2^{ème} quartile (50% des échantillons), correspondant au pourcentage de viabilité médian, est représentée par un trait horizontal à l'intérieur de la boîte. Les moustaches représentées de part et d'autre de la boîte correspondent au plus grand et plus petit pourcentage de viabilité. Les valeurs moyennes sont représentées par des losanges. Les astérisques montrent des différences significatives (p-value < 0,05).

1.A.1.3. La PMA-qPCR pour mesurer la viabilité des oocystes et kystes : Conclusions/discussion

Notre principal objectif était d'obtenir une méthode permettant de détecter la viabilité des trois protozoaires *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis* de façon simultanée. Une approche basée sur la PMA-qPCR a été évaluée sur les oocystes de *T. gondii* dans un premier temps (Rousseau *et al.*, 2019) puis sur les oocystes de *C. parvum* et les kystes de *G. duodenalis*. A la différence de *T. gondii*, la PMA-qPCR avait déjà été décrite dans la littérature pour étudier la viabilité des oocystes de *C. parvum* et des kystes de *G. duodenalis* (Alonso *et al.*, 2014 ; Agulló-Barcelló *et al.*, 2014 ; Liang et Keeley, 2011 ; Brescia *et al.*, 2009) mais pour *C. parvum*, aucun consensus n'a pu être établi.

L'une des stratégies pour améliorer la discrimination entre les parasites viables et inactivés par la chaleur est l'application de concentrations plus élevées de PMA (Fittipaldi *et al.*, 2012). Ainsi, des oocystes/kystes viables et inactivés par le froid ou la chaleur ont tout d'abord été incubés avec différentes concentrations de PMA (50 à 150 μM) pendant 30 minutes à température ambiante. Excepté *Giardia*, le pourcentage de viabilité mesuré déterminé en PMA-qPCR pour des oocystes de *C. parvum* et *T. gondii* non traités s'est avéré beaucoup plus faible que celui mesuré en RT-qPCR. Bien que la comparaison ne soit pas pertinente en raison de la différence de stabilité des acides nucléiques (ADN ou ARN) et du rendement d'extraction des deux méthodes, ces résultats suggèrent que l'oocyste et le kyste ont des comportements différents vis-à-vis du PMA. En outre, il a été démontré que la méthode de purification mise en œuvre pour les oocystes (flotation par gradient de saccharose) augmentait le pourcentage d'oocystes de *C. parvum* dégénérés (Kar *et al.*, 2011). Ces derniers seraient alors plus perméables au PMA affectant ainsi le signal en PMA-qPCR mais pas en RT-qPCR. La viabilité des oocystes et des kystes chute pour une concentration élevée en PMA (150 μM), suggérant un effet cytotoxique du PMA sur les trois parasites. Pourtant, aucun effet toxique du PMA à de forte concentration (100, 150 et 200 μM) n'a été décrit chez les protozoaires *Cryptosporidium* (Brescia *et al.*, 2009) ou *Acanthamoeba castellanii* (Fittipaldi *et al.*, 2011). Cependant, l'utilisation d'une sonde Taqman dans nos essais peut révéler des variations de la viabilité plus fines que des méthodes de détection basées sur la détection sur gel d'agarose ou en SYBR green.

A température ambiante, un signal en qPCR est toujours détecté pour des oocystes/kystes inactivés par le froid ou la chaleur, alors qu'aucun signal n'est obtenu en RT-

qPCR, indiquant que les parasites sont non viables. Cette discordance entre ces deux méthodes a déjà été décrite pour des oocystes de *C. parvum* inactivés par de l'ammonium et le stockage à 4°C (Liang et Keeley, 2012).

En fonction du traitement d'inactivation appliqué aux kystes de *G. duodenalis* (chaleur ou froid), le pourcentage de viabilité mesuré par PMA-qPCR (100 et 150 µM) varie alors qu'aucune différence n'est observée en RT-qPCR (aucun signal quel que soit le traitement). Selon le traitement, cette méthode pourrait donc permettre de mettre en évidence des réductions de viabilité plus finement que d'autres. Ceci peut présenter un intérêt pour la qualification précise de barèmes thermiques par exemple. Cependant, le fait que la réponse en PMA-qPCR varie selon le traitement subi par les cellules peut également traduire une différence de perméabilité au PMA, comme cela a été suggéré pour des oocystes de *C. parvum* soumis à de l'H₂O₂ et de l'ammonium (Liang et Keeley, 2012). Ces résultats indiquent qu'une stratégie basée sur la perméabilité des cellules pour mesurer la viabilité des kystes et des oocystes n'est sans doute pas applicable de manière systématique pour étudier l'efficacité d'inactivation de différents procédés sur les parasites.

Des essais complémentaires à ces travaux devraient donc être menés pour évaluer d'autres traitements d'inactivation chimiques (acides, oxydants...) ou physiques (ultrasons, cycles de congélations/décongélations...) ayant un impact sur la paroi des oocystes et kystes afin de permettre l'incorporation du PMA. L'utilisation d'une molécule facilitant l'incorporation du PMA pourrait aussi être testée.

Afin d'augmenter la perméabilité des parois des oocystes/kystes au PMA et d'améliorer la discrimination entre des parasites viables et non viables, nous avons augmenté la température d'incubation du PMA (Nkuipou-Kenfack *et al.*, 2013 ; Rawsthorne *et al.*, 2009). Bien que non systématique, une réduction totale du signal de qPCR a pu être observée pour les oocystes de *C. parvum* inactivés par la chaleur à 45°C 150 µM de PMA. En revanche pour les autres conditions testées, un signal est toujours détecté en PMA-qPCR contrairement à la RT-qPCR. L'incubation à 45°C avec 50 µM de PMA a tout de même permis de mesurer le pourcentage de viabilité le plus élevé dans la suspension non traitée de *C. parvum* et, par conséquent, a conduit à une meilleure discrimination entre les oocystes viables et les oocystes inactivés par la chaleur et le froid. Ce résultat très surprenant, pourrait s'expliquer par une extraction d'ADN facilitée suite à l'exposition à 45°C qui contribuerait à un meilleur rendement d'extraction. Le même protocole, appliqué cependant à température ambiante, a

été utilisé avec succès également par Agulló-Barcelló *et al.* (2014). Contrairement aux oocystes de *C. parvum*, la température de 45°C a un impact négatif sur la viabilité des kystes de *G. duodenalis* et les oocystes de *T. gondii* et/ou augmente leur perméabilité au PMA.

Ainsi, le protocole de PMA-qPCR retenu dans notre étude pour évaluer la viabilité des oocystes de *C. parvum* et des kystes de *G. duodenalis* diverge de ceux précédemment décrits dans la littérature (Brescia *et al.*, 2009 ; Liang et Keeley, 2011 ; Alonso *et al.*, 2014 ; Agulló-Barcelló *et al.*, 2014). Pour *C. parvum*, une incubation à 45°C avec 50 µM PMA pendant 30 minutes semble la plus efficace pour distinguer des oocystes viables d'oocystes inactivés, quel que soit le traitement d'inactivation appliqué. Cependant, le faible niveau de viabilité mesuré dans la suspension d'oocystes non traités ne permet pas de conclure quant à un éventuel effet du traitement d'inactivation, ni sur la pertinence de la technique. Pour les kystes de *G. duodenalis*, l'incubation avec 50 µM de PMA pendant 30 minutes à température ambiante et 37°C apparaît efficace pour mettre en évidence l'inactivation des kystes par la chaleur et le froid. Ce protocole est différent de celui retenu par Alonso *et al.* (2014) qui consistait en une incubation à température ambiante de 5 min avec 150 µM de PMA. Cependant, un temps d'incubation plus long peut favoriser la pénétration du PMA dans les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire puis son s'intégration dans leur ADN (Fittipaldi *et al.*, 2012). Ainsi, une incubation de 30 min a été rapportée pour *Acanthamoeba castellanii* (Fittipaldi *et al.*, 2011). Etant donné la faible concentration de PMA retenu dans notre protocole, nous avons donc opté pour un temps d'incubation plus long (30 min). D'autre part, l'utilisation de LED permet de s'affranchir de l'excès de chaleur généré par les lampes halogènes, ce qui pourrait rendre les membranes cellulaires permissives à la pénétration du PMA en leur infligeant des dommages (Wang *et al.*, 2009).

La longueur du gène cible amplifié est aussi un paramètre déterminant dans la suppression du signal dans les cellules non viables. Plus la taille de l'amplicon est grande, plus la probabilité que l'ADN polymérase rencontre une molécule de PMA fixée de façon covalente sur l'ADN est grande (Contreras *et al.*, 2011). Dans le cas de *T. gondii*, l'augmentation de la taille du fragment amplifié de 83 à 123 pb a en effet permis d'améliorer significativement la réduction de signal des les oocystes inactivés par la chaleur, mais n'a pas conduit à l'abolition du signal. Pour *G. duodenalis* et *C. parvum*, des fragments de 63 et 138 pb ont été amplifiés dans notre étude, et aucune extinction de signal n'a pu être observée en PMA-qPCR (excepté à 45°C pour *C. parvum*). Or, des études antérieures ont mis en évidence que le signal PMA-qPCR était éliminé pour des kystes de *G. duodenalis* inactivés par la

chaleur avec un amplicon de 605 pb mais pas de 77 pb ciblant le gène *tpi* (Alonso *et al.*, 2014), et pour les oocystes de *C. parvum*, qu'une réduction de signal plus importante était obtenue en amplifiant une séquence de 834 pb du gène 18S, contre 108 pb (Agulló-Barcelló, 2014). Ainsi, pour *Giardia* et *Cryptosporidium*, il conviendrait d'évaluer la PMA-qPCR dans les conditions définies ci-dessus (température et concentration) en ciblant des régions nucléiques plus longues. Cependant, afin d'être compatible avec des essais en qPCR, des fragments < 300 pb devront être ciblés.

D'après l'ensemble des optimisations de la PMA-qPCR mené sur les trois parasites en matrice eau, les conditions de marquage au PMA retenue sont différentes : 100 µM de PMA pendant 30 min à température ambiante pour *T. gondii*, 50 µM de PMA pendant 30 min à 37°C pour *C. parvum* et 45°C pour *G. duodenalis*. Un protocole commun aux trois parasites pour mettre en évidence leur viabilité par PMA-qPCR n'a donc pas pu être validé. Cependant, considérant que les trois parasites ont une taille, une structure mais aussi une paroi de composition différente, le développement d'un protocole unique s'avérait ambitieux. L'application de la PMA-qPCR sur matrice complexe a été décrite pour détecter la viabilité de la bactérie *Campylobacter* dans des carcasses de poulet (Josefsen *et al.*, 2010), *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* à partir de légumes coupés frais (Elizaquivel *et al.*, 2012) ou de la viande hachée (Yang *et al.*, 2013). Cependant, Elizaquivel et ses collaborateurs (2012) ont noté qu'en présence d'une forte concentration de *L. monocytogenes*, le traitement par PMA n'est pas approprié dans les légumes frais coupés. Par ailleurs, selon Liang et Keeley (2012), des eaux trop chargées pourraient réduire la pénétration de la lumière à travers l'échantillon et empêcher la fixation du PMA de façon covalente à l'ADN.

En conclusion, suite à ces travaux, l'approche PMA-qPCR n'est pas considérée comme une stratégie pertinente pour déterminer la viabilité des parasites en matrice eau et n'a donc pas été évaluée sur matrice complexe alimentaire.

1.A.2 Evaluation de la multiplication *in vitro* couplée à la qPCR pour étudier la viabilité des kystes de *G. duodenalis*

Giardia est un parasite extracellulaire qui présente l'avantage de pouvoir se multiplier sous forme trophozoïtes, après dékystement des kystes. Si la multiplication *in vitro* des trophozoïtes ne peut caractériser l'infectiosité puisqu'elle ne permet pas d'observer d'infection, elle renseigne cependant sur la viabilité du parasite. Cette approche, couplée à une détection moléculaire des trophozoïtes par qPCR, a donc été explorée pour étudier la viabilité des kystes de *G. duodenalis*, dans une matrice simple dans un premier temps.

Matériels et méthodes

a) Kystes de *G. duodenalis* : non traités et inactivés

Les kystes de *G. duodenalis* (isolat H3, assemblage B) non traités ou inactivés par la chaleur (+70°C, 15 min) fournis par Waterborne™ Inc (Nouvelle-Orléans, Etats-Unis ; ref *G. duodenalis* #P101) ont été utilisés (cf. partie 1.A.1.2. Section a).

b) Entretien des lignées cellulaires

La lignée cellulaire HCT-8 (cellules d'adénocarcinome de la valvule iléo-cæcale de l'intestin humain, ATCC No. CCL-244: American Type Culture Collection, Rockville, MD) a été utilisée pour étudier la viabilité des kystes de *G. duodenalis*. Les cellules adhérentes sont maintenues en milieu de culture IMDM contenant du glutaMAX™ (ThermoFisher, USA) supplémenté par 5% (v/v) de sérum de veau foetal inactivé à 56°C pendant 30 minutes (Eurobio, France), 100 µg/ml de streptomycine (Gibco®) et 100 U/mL de pénicilline (Gibco®) dans des boîtes de culture cellulaire (T75 cm² ; VWR, Canada) dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ à 37 ° C. A partir de 80% de confluence (après 24h à 37°C), les cellules sont lavées avec du PBS 1X puis trypsinées pour décoller les cellules de la boîte de culture.

c) Obtention de trophozoïtes et infection des cellules

Avant l'inoculation des parasites, environ 2.10⁵ cellules ont étéensemencées dans du milieu de culture en plaque 96 puits.

Dix mille kystes de *G. duodenalis* sont incubés en milieu acide dans 200 µL HCl pH 2 (Bimingham et Meyer, 1979) ou HBSS pH 2,7 (Garvey *et al.*, 2010; 2014) pendant 1h à 37°C pour induire le dékystement et la formation de trophozoïtes. Après centrifugation (5 min à 5 000g), le culot de trophozoïtes est resuspendu dans du milieu de culture puisensemencé sur

des cellules HCT-8 (confluence 80%) ou en absence de cellules (culture axénique). Un témoin de culture cellulaire (cellule HCT-8 sans parasite) est réalisé. La culture cellulaire est arrêtée directement après la mise en culture (T0) et après l'incubation pendant 48h à 37°C (T48h). La limite de détection de la méthode a été estimée grâce à une série de dilutions de kystes viables allant de 1 à 10 000.

d) Extraction d'ADN de trophozoïtes et qPCR

L'extraction d'ADN des trophozoïtes est réalisée en utilisant le kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Le surnageant est récupéré des puits, centrifugé 5 min à 5 000g puis le culot est remis en suspension dans 180 µL du tampon ATL et 20 µL de protéinase K. La suspension est transférée dans un tube Eppendorf de 1,5 mL et l'échantillon est traité selon les recommandations du fabricant.

L'ADN de *Giardia* est détecté par qPCR selon le protocole décrit précédemment (cf. partie 1.A.1.2. section b).

Une diminution de Cq entre T0 et le temps d'arrêt de la culture met en évidence une multiplication parasitaire qui traduit la viabilité des kystes de *G. duodenalis*. La différence de signal en qPCR est calculée ($\Delta Cq = Cq_{T0} - Cq_{\text{arrêt de culture}}$).

e) Analyses statistiques

Les valeurs de Cq et de ΔCq ont été comparés en utilisant le test non paramétrique de Kruskal Wallis. Si l'hypothèse nulle H0 (les conditions testées n'ont pas d'effet sur la valeur mesurée) est rejetée, le test post hoc de Wilcoxon-Mann-Whitney est appliqué pour deux échantillons indépendants. Tous les tests statistiques ont été effectués à l'aide de StatXact7. La différence était considérée significative lorsque la p-value < 0,05.

Résultats

Deux protocoles de dékystement des kystes en trophozoïtes en milieu acide ont été testés (HCl à pH 2 ou HBSS à pH 2,7). Les résultats sont présentés en **Figure 10**.

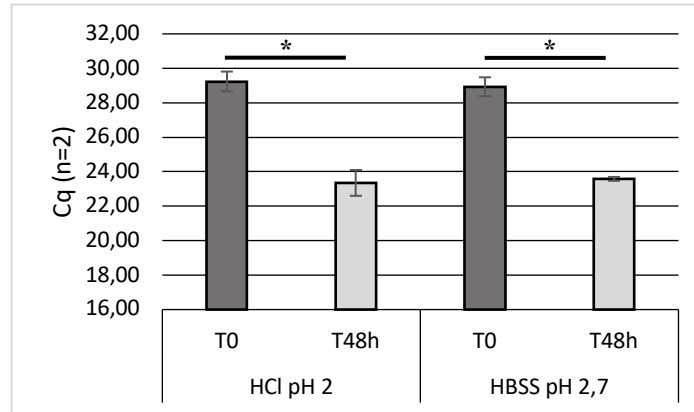


Figure 10 : Impact du protocole de dékystement sur la multiplication *in vitro* des trophozoïtes de *G. duodenalis* mesurée par qPCR.

Les kystes de *G. duodenalis* (10 000) ont été soumis à un traitement de dékystement en HCl pH 2 ou HBSS pH 2,7 pendant 1h à 37°C. Après centrifugation, le culot de trophozoïtes obtenu est resuspendu en milieu de culture puis déposé sur un tapis de cellules HCT-8 (confluence 80%) incubé à 37°C. L'ADN est extrait à partir du surnageant de culture, immédiatement après la mise en culture des trophozoïtes (T0) et après culture pendant 48 h (T48h). Chaque extrait d'ADN est testé en duplicat en qPCR pour détecter *Giardia* à T0 et T48h. Les astérisques montrent des différences significatives de Cq (p-value < 0,05).

Entre T0 et T48h, le signal de qPCR diminue ($\Delta Cq = 5,8$ p-value < 0,05) de manière comparable, quel que soit le traitement de dékystement utilisé (p-value < 0,05). Ces résultats montrent la capacité des trophozoïtes de *G. duodenalis* à se multiplier dans le surnageant en présence de cellules HCT-8 et donc la viabilité de ces derniers.

Giardia étant un parasite extracellulaire, on peut s'interroger sur la nécessité d'utiliser des cellules HCT-8 pour permettre la multiplication des trophozoïtes de *Giardia*. Nous avons donc comparé la multiplication des trophozoïtes avec cellules HCT-8 ou sans (culture axénique : milieu de culture seul). Les résultats sont présentés en **Figure 11**.

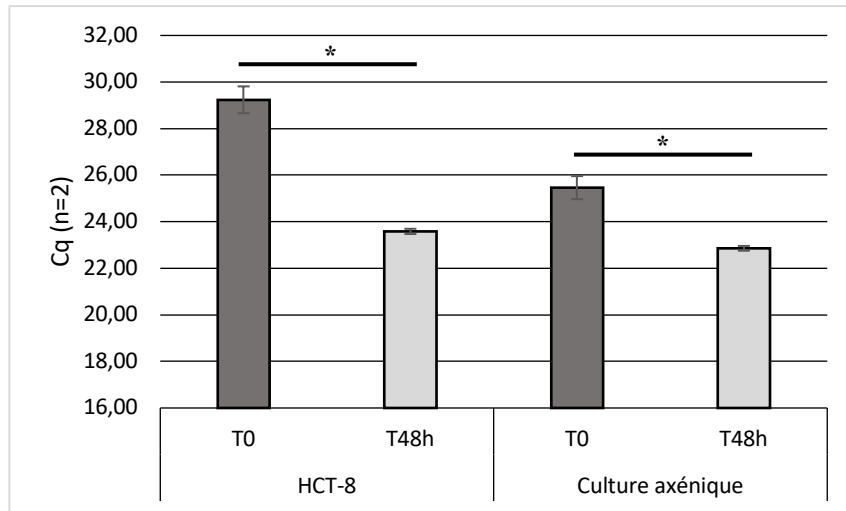


Figure 11 : Multiplication *in vitro* de trophozoïtes de *G. duodenalis* en présence ou absence de cellules HCT-8 (n=2).

Les kystes de *G. duodenalis* (10 000) ont été dékystés en HBSS pH 2,7 pendant 1h à 37°C. Après centrifugation, le culot de trophozoïtes obtenu est resuspendu en milieu de culture directement incubé à 37°C (culture axénique) ou déposé sur un tapis de cellules HCT-8 (confluence 80%) incubé à 37°C. L'ADN est extrait du surnageant immédiatement après la mise en culture des trophozoïtes (T0) et après culture pendant 48h (T48h) avec ou sans cellules HCT-8. Chaque extrait d'ADN est testé en duplicat en qPCR pour détecter *Giardia* à T0 et T48h. Les astérisques montrent des différences significatives de Cq (p-value < 0,05).

Entre T0 et T48h, le signal de qPCR diminue de façon significative en absence et en présence de cellules HCT-8 (p-value < 0,05). Ces résultats montrent que les trophozoïtes de *G. duodenalis* sont capables de se multiplier en culture axénique et sont donc viables. Cependant, la différence de signal entre T0 et T48h est plus importante en présence des cellules HCT-8 ($\Delta Cq = 5,7$) par rapport à la culture axénique ($\Delta Cq = 2,6$) indiquant que les cellules favorisent la multiplication des trophozoïtes. Le protocole retenu pour la suite des essais pour étudier la viabilité des kystes de *G. duodenalis* est donc le dékystement en HBSS pH 2,7 (1h à 37°C) suivi d'une multiplication des trophozoïtes en présence des cellules HCT-8 pendant 48h à 37°C.

Nous avons ensuite vérifié que seul un parasite vivant était capable de se multiplier en culture et induire une réduction de signal en qPCR significative après 48h de culture. Des

kystes vivants ont été inactivés par la chaleur (15 min à 75°C). Les résultats sont présentés en **Figure 12**.

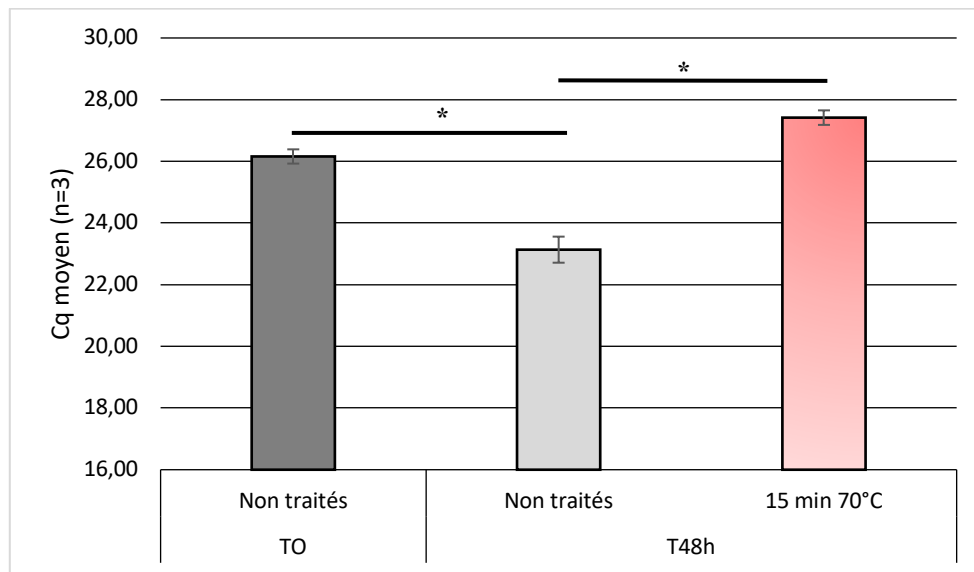


Figure 12 : Etude de la viabilité de kystes de *G. duodenalis* non traités et inactivés par la chaleur (15 min 75°C) par multiplication *in vitro* couplée à la qPCR (n=3).

Les kystes de *G. duodenalis* (10 000) non traités (gris) ou traités par la chaleur pendant 15 min à 70°C (rouge) ont été dékystés en HBSS pH 2,7 pendant 1h à 37°C. Après centrifugation, le culot de trophozoïtes obtenu est resuspendu en milieu de culture puis déposé sur un tapis de cellules HCT-8 (confluence 80%) incubé à 37°C. L'ADN est extrait du surnageant immédiatement après la mise en culture des trophozoïtes (T0) et après culture pendant 48h (T48h). Chaque extrait d'ADN est testé en duplicat en qPCR pour détecter *Giardia* à T0 et T48h. Les astérisques montrent des différences significatives de Cq (p-value < 0,05).

Lorsque l'on compare le Cq obtenu à T0 par rapport à celui obtenu à T48h pour les kystes non traités, la différence de signal en qPCR est significativement diminuée ($\Delta Cq = 3,0$; p-value < 0,05). Les kystes non traités sont donc viables. En revanche, le signal en qPCR est stable pour les kystes inactivés par la chaleur (T48h) par rapport à la condition contrôle (T0) (p-value > 0,05). Les kystes inactivés par la chaleur ne sont plus viables. Il est intéressant de noter que le nombre de trophozoïtes à T0 est variable d'une expérience à l'autre pour une même quantité de kystes initiale (comparer **Figure 11**, HCT-8 et **Figure 12**). Le

rendement de dékystement apparaît donc peu reproductible. Cependant, ceci ne semble pas affecter le résultat final, puisqu'après 48h à 37°C, les Cq équivalents sont identiques suggérant qu'on a atteint un plateau de multiplication (**Figures 11 et 12**).

Afin d'estimer la limite de détection de la méthode, une gamme de dilution en série allant de 1 à 10 000 kystes de *G. duodenalis* a été réalisée. Chaque quantité parasitaire a été testée en triplicat (**Tableau X**).

Tableau X : Evaluation de la limite de détection du protocole de multiplication *in vitro* couplée à la qPCR à partir de kystes de *G. duodenalis* en matrice eau (n=3).

Des kystes de *G. duodenalis* (1 à 10 000) sont dékystés en HBSS pH 2,7 pendant 1h à 37°C. Les trophozoïtes sont ensuite mis en culture sur un tapis de cellules HCT-8 pendant 48h à 37°C. L'ADN est extrait du surnageant à T0 et T48h, et testé en duplicat en qPCR pour détecter *Giardia*.

	Quantité de kystes	Cq moyen ± écart-type
T0	10 000	26,70 ± 0,71
T48h	10 000	23,32 ± 0,46
	1 000	27,19 ± 0,24
	100	30,53 ± 0,43
	50	31,81 ± 0,70
	10	32,65 ± 0,89
	5	36,43 ± 0,82
	1	38,02 ± 0,54

Pour 10 000 kystes de *G. duodenalis*, le signal de qPCR diminue significativement entre T0 et T48h de culture cellulaire ($\Delta Cq = 3,4$), mettant en évidence la viabilité des kystes de *G. duodenalis*. Les résultats montrent que la technique basée sur la multiplication *in vitro* de trophozoïtes couplée à la qPCR permet de détecter moins d'un kyste viable de *G. duodenalis* dans la matrice eau. La technique semble également quantitative ($R^2 = 0,98$). Cette approche permet donc de déterminer la viabilité des kystes et leur quantification.

La multiplication *in vitro* couplée à la qPCR pour étudier la viabilité des kystes de *G. duodenalis* : Conclusions/Discussion

Bien que l'on s'intéresse de plus en plus à l'utilisation de la culture cellulaire comme méthode alternative aux bioessais pour étudier la pathogénicité et l'infectiosité des oocystes de *C. parvum* ou *T. gondii* dans l'eau (Hijjawi, 2010 ; Villegas *et al.*, 2010), seules deux études ont décrit cette approche à partir de kystes de *G. duodenalis* associée à la PCR ou la RT-PCR (Alum *et al.*, 2012 ; Garvey *et al.*, 2014). Cependant, comme *Giardia* n'est pas un parasite intracellulaire, les cellules ne sont pas infectées par le parasite. Ainsi, l'utilisation de ces techniques pour évaluer le potentiel infectieux est discutable (Rousseau *et al.*, 2018). En revanche, ces approches permettent d'estimer la multiplication des trophozoïtes et donc d'évaluer la viabilité des kystes de *G. duodenalis*.

Afin d'induire le dékystement et la libération des trophozoïtes à partir de kystes de *G. duodenalis*, deux traitements en milieu acide (HCl pH 2 et HBSS pH 2,7) ont été décrits (Bingham et Meyer, 1979 ; Garvey *et al.*, 2014), basés sur l'imitation des conditions rencontrées *in vivo* par le parasite chez un hôte sensible. Dans notre étude, quel que soit le traitement de dékystement, le signal de qPCR diminue entre T0 et T48h, montrant la capacité des trophozoïtes de *G. duodenalis* à se multiplier dans le surnageant en présence de cellules HCT-8 et donc la viabilité des kystes au départ. Le nombre de trophozoïtes obtenus à T0 apparaît cependant variable. Ceci peut traduire une variabilité du nombre de kystes viables dans la suspension de départ ou encore un rendement de dékystement non optimal et donc peu reproductible. Cependant, une incubation de 48h semble permettre de s'affranchir de cette variabilité, ce qui présente tout son intérêt dans un contexte environnemental ou alimentaire dans lequel on ne connaît pas l'état des parasites. Un travail complémentaire est malgré tout nécessaire pour déterminer le rendement du dékystement des kystes (étape limitante du protocole) et si besoin pour l'optimiser. Une diminution de signal n'est pas observée après inactivation des kystes par la chaleur démontrant que cette approche permet de mettre en évidence spécifiquement des kystes viables.

Nous avons par ailleurs montré que la culture axénique (sans cellules), décrite par plusieurs auteurs (Vargas-Villarreal *et al.*, 2014 ; Gasser *et al.*, 1987), permet d'évaluer la viabilité des kystes de *Giardia*. Cependant, la différence de signal entre T0 et T48h est plus importante en présence des cellules HCT-8 ($\Delta Cq = 5,7$) par rapport à la culture axénique ($\Delta Cq = 2,6$). Ces résultats sont en accord avec des travaux antérieurs qui ont démontré que les

trophozoïtes ont besoin d'un attachement aux surfaces épithéliales pour se multiplier et qu'une variation de la quantité de cellules hôtes disponibles pour *Giardia* avait un impact sur sa prolifération (Garvey *et al.*, 2014). Alternativement, les cellules pourraient sécréter des molécules qui favoriseraient la multiplication des trophozoïtes. Pour vérifier cette hypothèse, il pourrait être envisagé de mettre les trophozoïtes en présence de différents surnageants de culture cellulaire (par exemple : HCT-8, Véro) ou utiliser des inserts de culture cellulaire, Transwell® (VWR) permettant d'éviter tout contact entre les cellules mises en culture et les trophozoïtes.

Nous avons montré que la limite de détection de notre protocole de multiplication *in vitro* couplée à la qPCR est égale à un kyste de *G. duodenalis*. Cette limite de détection est inférieure à celle obtenue par Alum et ses collaborateurs (2012) avec *G. muris*, ainsi qu'à celle atteinte en RT-qPCR pour détecter des kystes de *G. duodenalis* viables en matrice simple (50 kystes ; Travaillé *et al.*, 2016). De plus, cette technique permet de quantifier les parasites viables. Ainsi, cette approche s'avère pertinente pour évaluer la viabilité des kystes de *Giardia* en matrice eau dans un contexte de biosurveillance et pour étudier l'efficacité des procédés industriels de décontamination (Garvey *et al.*, 2014). Cependant, considérant que la mesure de la viabilité est rarement corrélée à l'infectiosité (Rousseau *et al.*, 2018), il conviendra de compléter ces travaux par la comparaison de la technique de multiplication *in vitro* à de essais *in vivo* (modèle gerbille).

Ainsi, cette approche semble prometteuse pour une application en matrice mollusque, mais nécessite encore d'évaluer de manière plus approfondie les paramètres de dékystement et de culture *in vitro*.

PARTIE 1.B. : MATRICE MOLLUSQUE

ETUDE DE LA VIABILITE DES OOCYSTES DE *T. GONDII* ET *C. PARVUM* ET DES KYSTES DE *G. DUODENALIS* PAR RT-qPCR

L'approche PMA-qPCR n'a pas été considérée comme pertinente pour déterminer la viabilité des parasites en matrice simple. Le choix s'est donc porté sur la Reverse-Transcriptase-qPCR, développée en matrice simple lors d'un précédent programme ANR (Protofood ANR-09-ALIA-009 ; Travaillé *et al.*, 2016) et disponible au laboratoire, comme méthode moléculaire pour évaluer la viabilité des trois parasites dans une matrice complexe.

Les mollusques, et plus particulièrement les moules *M. edulis* (moule marine comestible) et *D. polymorpha* (moule continentale) ont été sélectionnées comme matrice complexe car : i) la consommation de *M. edulis* peut représenter un risque de contamination pour l'homme ; ii) les deux mollusques, *via* leur capacité de filtration des parasites, présentent un potentiel intéressant comme outil de surveillance de la qualité des eaux ; iii) ces organismes se constituent d'organes aux propriétés structurales et biochimiques différentes, peuvent être riches en acides gras (*M. edulis*), et retenir de nombreuses microparticules variées par leurs activités de filtration (sédiments, minéraux, bactéries, microalgues...), pouvant rendre difficile le traitement de l'échantillon

Matériels et méthodes

a) Les parasites utilisés

Les caractéristiques des différentes suspensions de parasites viables sont identiques à celles décrites précédemment (Partie 1.A.1.2. Section a ; Rousseau *et al.*, 2019).

b) Mollusques utilisés

Les moules continentales *Dreissena polymorpha* ou dreissènes ($2,2 \pm 0,3$ cm) ont été collectées à environ 5 m de profondeur au Lac-du-Der-Chantecoq ($48^{\circ} 36'07,7$ "N, $4^{\circ} 44'37,0$ " E) en novembre. Les moules marines *Mytilus edulis* ou moules bleues (4 et 5 cm de longueur de coquille) ont été collectées sur la côte rocheuse intertidale d'Yport (Seine-Maritime, France). Les dreissènes et les moules bleues ont été conservées à -20°C jusqu'à utilisation. Avant chaque expérimentation, les mollusques entiers congelés ont été découpés au scapel puis pesés.

c) Elution/récupération des oocystes et kystes des matrices mollusques

L'intégralité des tissus d'une dreissène ou d'une moule bleue est broyée et déposée dans un sac stomacher (Bagpage R400, Saint-Nom-la-Bretèche, France) pour être ensuite dopée par 10 000 oocystes/kystes ou par une gamme d'oocystes/kystes allant de 500 à 100 000 pour estimer la limite de détection de la méthode utilisée. Les sacs sont conservés 2h à température ambiante puis 24h à 4°C. Les échantillons sont ensuite mis en suspension dans un volume final de 12,5 mL (pour *D. polymorpha*) et 25 mL (pour *M. edulis*) de trypsine 1X (réf. 27250-018 ; Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) pour permettre la digestion des tissus et faciliter l'éluion des oocystes et des kystes. Dans certains essais, 0,12% d'hypochlorite de sodium a été ajouté à la solution de trypsine 1X. Après une incubation à 37°C pendant 1h30 sous agitation à 90 tr/min, les filtrats ont été recueillis et 20 mL de NaCl à 0,9% ont été ajoutés pour laver le sac stomacher à deux reprises, par centrifugation à 2 500 g pendant 10 minutes à 10°C. Le culot ainsi obtenu a été directement utilisé pour l'extraction d'ARN ou soumis à une étape de purification des parasites par gradient de Percoll afin d'éliminer la matrice. Pour ce faire, le culot est resuspendu dans 1,5 mL de Percoll 30% dilué dans du NaCl à 0,9%. Après 5 minutes à 12 000 g, 1 mL de surnageant est éliminé et 1 mL de NaCl à 0,9% est ajouté pour rompre le gradient de Percoll.

d) Extraction d'ARN total et RT-qPCR.

Pour les oocystes de *C. parvum*, une induction de l'expression pendant 20 min à 45°C du gène *hsp70* est requise avant de procéder à l'extraction d'ARN.

Les culots d'oocystes obtenus tels que décrits ci-dessus (section c) sont resuspendus dans 1 mL de tampon de lyse d'ARN (différent selon le kit d'extraction d'ARN testé), puis transférés dans un tube Lysing Matrix E (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France) contenant des billes de verre (4 mm), de céramique (1,4 mm) et de silice (0,1 mm). Les parasites sont broyés mécaniquement, soit 2 x 40s à la vitesse de 6.0 m/s en Fatsprep ou 30s à 33 Hz en TissueLyser (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Les kits d'extraction d'ARN suivants ont été évalués :

- Kit FastRNA ProTM Soil-Direct (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France):

L'extraction d'ARN est réalisée en suivant les instructions du fabricant. L'ARN est élué dans un volume final de 100 µl d'eau DEPC. Chaque extrait d'ARN obtenu à partir de ce protocole est dilué au demi avant de réaliser la RT-qPCR.

- Kit RNeasy Mini (QIAGEN, Courtaboeuf, France) :

L'extraction d'ARN est réalisée en suivant les instructions du fabricant et l'ARN est élué dans un volume final de 50 µL d'eau RNase-free.

- Protocole TriReagent (MRC-Research, USA) :

Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, 200 µL de chloroforme sont ajoutés et homogénéisés. La suspension est incubée 2 à 15 min à température ambiante puis centrifugée à 12 000g pendant 15 minutes à 4°C. La phase supérieure (aqueuse) est transférée dans un nouveau microtube auquel on ajoute 500 µL d'isopropanol. Après 5 à 10 minutes d'incubation à température ambiante, le tube est centrifugé à 12 000g pendant 8 minutes entre 4°C et 25°C. Le culot d'ARN est lavé dans 1 mL d'éthanol 75%, séché à l'air puis repris par 50 µL d'eau RNase-free.

Trente microlitres d'ARN purifiés ont ensuite été soumis à un traitement par DNase en utilisant 1 µL de TURBOTM DNase (Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France). Après une incubation de 30 minutes à 37 ° C, la DNase est inactivée et les ARN sont conservés à -20 °C jusqu'à analyse.

La RT-qPCR a ensuite été réalisée avec les mêmes cibles et dans les mêmes conditions que précédemment décrites pour les 3 parasites (cf. Partie 1.A.1.2. Section c ; Rousseau *et al.*, 2019). Pour *T. gondii*, les caractéristiques des amorces et de la sonde sont présentées dans le **Tableau XI**.

Tableau XI : Cibles de RT-qPCR pour *T. gondii*.

Organisme	Région ciblée	Séquences des amorces	Séquence des sondes	Taille amplicon	Références
<i>T. gondii</i>	SporoSAG	TOXO-F 5'-CGG ACA AAT GTG GCG TAC AC-3' TOXO-R 5'-GTG ATC TTG CGC CGA ACA C-3'	TOXO-P : 5'-FAM-TTC TCG TCA AAG CGG CAC CAC AGG-3' BHQ1	71 pb	Travaillé <i>et al.</i> , 2016

Sur matrice mollusque, les limites de détection LD₅₀, correspondant à la dernière dose pour laquelle 50% des échantillons positifs sont détectés, ont été définies.

e) Analyses statistiques

Les valeurs de Cq moyen ont été comparées en utilisant le test non paramétrique de Kruskal Wallis. Si l'hypothèse nulle H0 (les conditions testées n'ont pas d'effet sur la valeur mesurée) est rejetée, le test post hoc de Wilcoxon-Mann-Whitney est appliqué pour deux échantillons indépendants. Tous les tests statistiques ont été effectués à l'aide de StatXact7. La différence était considérée significative lorsque la p-value $< 0,05$.

Résultats

Dans un premier temps, le protocole de RT-qPCR a été optimisé à partir de *M. edulis* et *D. polymorpha* dopées par des oocystes de *T. gondii*, puis appliqué sur ces deux matrices mollusques dopées par des oocystes de *C. parvum* et des kystes de *G. duodenalis*.

a) *T. gondii*

Les optimisations ont été menées en parallèle sur les deux bivalves (*M. edulis* et *D. polymorpha*) afin de proposer un protocole commun aux deux matrices mollusques permettant de purifier puis d'extraire l'ARN des oocystes de *T. gondii*. Plusieurs protocoles d'extraction d'ARN ont été testés sur *M. edulis*. Les résultats sont présentés en **Tableau XII**.

Tableau XII : Résultats obtenus lors des essais de protocoles d'extraction d'ARN total d'oocystes de *T. gondii*, à partir de *M. edulis* et *D. polymorpha* (n=2).

Les échantillons sont présentés dans l'ordre où les expériences ont été effectuées. Chaque moule a été dopée avec 10 000 oocystes. Les culots d'oocystes issus de la digestion trypsique de la matrice mollusque sont lavés puis une agitation mécanique en présence de billes (Tube Lysing Matrix E) via le FastPrep Instrument (2x40s – Vitesse 6.0) a permis de pré-extraire l'ARN des parasites. L'extraction d'ARN est menée en utilisant différents protocoles : Kit Rneasy Mini, Kit FastPrep Pro™ Soil- Direct ou le protocole TRI Reagent. Chaque extrait d'ARN est testé en duplicat.

	Echantillons	Masse (g)	Kit extraction ARNm	Purification sur colonne	Dilution ARNm	Cq moyen	Ecart-type	Puits positif en qPCR
<i>M. edulis</i>	1	2,53	Kit RNeasy Mini	-	-	37,491	N/A	1/2
					1/10	N/A	N/A	0/2
	2	2,84	Kit RNeasy Mini	-	-	N/A	N/A	0/2
					1/10	N/A	N/A	0/2
	3	4,48	Kit FastRNA Pro™ Soil-Direct	-	-	39,41	0,13	2/2
					1/4	38,35	1,28	2/2
					1/10	36,86	0,83	2/2
					1/40	37,27	0,49	2/2
4	4,51	Kit FastRNA Pro™ Soil-Direct	-	1/100	38,48	0,16	2/2	
				-	37,26	0,47	2/2	
				1/4	34,76	0,93	2/2	
				1/10	35,10	0,12	2/2	
5	2,95	Kit FastRNA Pro™ Soil-Direct	-	1/40	35,60	0,22	2/2	
				1/100	36,60	2,21	2/2	
6	3,04	Kit FastRNA Pro™ Soil-Direct	-	-	38,58	N/A	1/2	
				1/10	N/A	N/A	0/2	
7	2,50	Kit FastRNA Pro™ Soil-Direct	+	-	36,95	N/A	1/2	
				1/10	36,81	0,36	2/2	
8	2,66	Kit FastRNA Pro™ Soil-Direct	+	-	35,45	1,26	2/2	
				1/10	35,45	0,27	2/2	
<i>D. polymorpha</i>	1	1,46	Protocole TRI reagent®	-	-	33,60	0,64	2/2
					1/10	36,11	1,39	2/2
	2	1,43	Protocole TRI reagent®	-	1/100	38,29	N/A	1/2
					-	31,50	0,56	2/2
	3	1,38	Kit FastRNA Pro™ Soil-Direct	+	1/10	34,00	0,15	2/2
					1/100	37,59	0,30	2/2
	4	1,44	Kit FastRNA Pro™ Soil-Direct	+	-	32,61	0,12	2/2
					1/10	34,85	0,39	2/2
4	1,44	Kit FastRNA Pro™ Soil-Direct	+	1/100	37,46	0,90	2/2	
				-	32,88	1,02	2/2	
4	1,44	Kit FastRNA Pro™ Soil-Direct	+	1/10	35,65	0,48	2/2	
				1/100	37,92	0,78	2/2	

Pour la moule bleue, les résultats montrent qu'en utilisant le kit RNeasy Mini, seul un duplicat sur deux est détectée en RT-qPCR. La colonne du kit utilisée tout au long de ce protocole est très rapidement colmatée par l'échantillon initialement déposé car la matrice est toujours présente. Le kit RNeasy Mini n'est donc pas adapté pour extraire l'ARN de *T. gondii* à partir de cette matrice. Avec le kit FastRNA Pro™ Soil-Direct, la plupart des réplicats sont détectés en RT-qPCR. En revanche, les résultats obtenus sur les dilutions d'ARN indiquent la présence fréquente d'inhibiteurs (échantillons 3, 4, 6, 7 et 8). De plus, les résultats semblent dépendre de la quantité de matrice initialement traitée (échantillons 3, 4 vs. 5, 6). L'ajout d'une étape de purification sur colonne en fin d'extraction d'ARN n'a pas permis d'éliminer les inhibiteurs comme en témoignent les valeurs de Cq obtenues pour les échantillons 7 et 8 non dilués et dilués au 1/10^{ème}. Dans ces conditions, la dilution des extraits d'ARN au 1/10^{ème} est nécessaire, et peut s'avérer limitante en cas de niveau faible de contamination des moules bleues.

Concernant les dreissènes, la totalité des échantillons purs extraits avec le kit Fast FastRNA ProTM Soil-Direct et le protocole TRI Reagent est détectée (échantillons 1 à 4). Une série de dilutions au 1/10^{ème} a été réalisée afin de vérifier si l'extraction à partir de dreissène apporte des inhibiteurs en RT-qPCR comme nous l'avons observé pour les moules bleues. Contrairement à la moule bleue, quel que soit le protocole d'extraction utilisé (avec ou sans purification des ARN), les valeurs de Cq obtenues sur les extraits d'ARN dilués indiquent l'absence d'inhibiteurs de RT-qPCR. La différence observée entre les deux matrices moules après application de la même procédure, à savoir kit Fast FastRNA ProTM Soil-Direct suivi d'une purification (échantillons 7-8 *M. edulis* vs. 3-4 *D. polymorpha*), peut être liée aux caractéristiques physiologiques et/ou physico-chimiques de chacun des mollusques (contenu lipidique, poids...). De plus, une variabilité plus importante est mise en évidence avec le protocole TRI Reagent ($Cq(\text{échantillon 1}) - Cq(\text{échantillon 2}) = 2.1$ pour une même dose d'oocystes). Cette variabilité peut être expliquée par un plus faible nombre de lavages avant la solubilisation de l'ARN et l'absence de purification sur colonne en fin d'extraction.

Parce qu'il est commun aux moules bleues et aux dreissènes, le protocole d'extraction d'ARN total basé sur l'utilisation du kit Fast FastRNA ProTM Soil-Direct avec une étape de purification sur colonne a été retenu. Cependant, il présente des limites : i) détection tardive de *T. gondii* pour un dopage à 10 000 oocystes. En effet, l'ensemble des Cq obtenus est supérieur à 32,61 (obtenu sur dreissène) ; ii) nécessité de diluer les ARN pour la moule bleue. Ainsi, de nouveaux essais incluant une étape de purification par gradient de Percoll ont été menés, afin d'éliminer la matrice avant d'appliquer le protocole d'extraction d'ARN. Les résultats sont présentés en **Figure 13**.

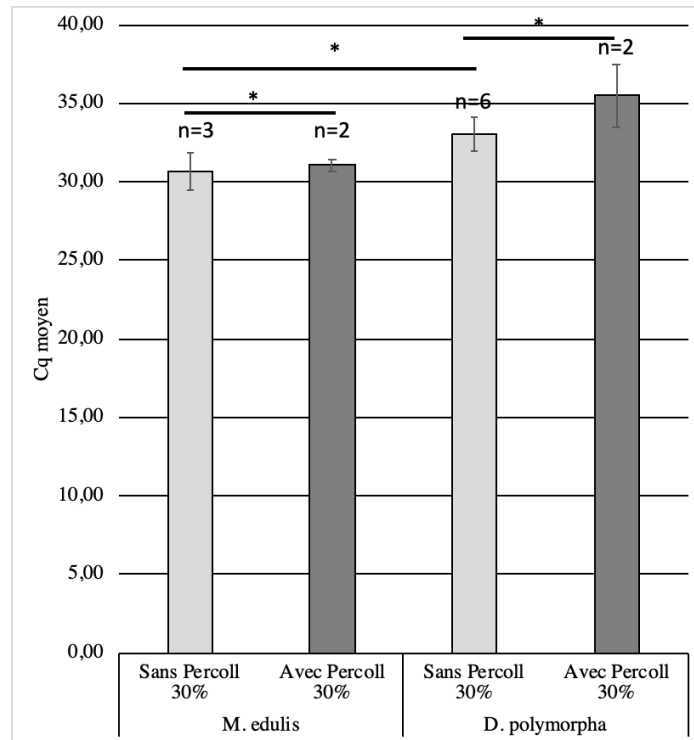


Figure 13 : Effet du gradient de Percoll 30% sur la détection des oocystes de *T. gondii* viables en RT-qPCR à partir de *M. edulis* et *D. polymorpha*.

Les moules ont chacune été dopées avec 10000 oocystes. Les culots issus de la digestion trypsique des mollusques et contenant les oocystes ont été lavés, puis purifiés ou non sur un gradient de Percoll 30%. Une agitation mécanique en présence de billes (Tube Lysing Matrix E) via le FastPrep Instrument (2x40s – Vitesse 6.0) a permis de pré-extraire l'ARN des parasites et l'extraction des ARN est effectuée avec le Kit FastPrep Pro™ Soil-Direct (avec purification). Chaque extrait d'ARN dilué au 1/10^{ème} est testé en duplicat. Les Cq indiqués correspondent aux Cq des échantillons purs extrapolés à partir de la valeur de Cq obtenue au 1/10^è, avec $Cq_{1/10^è} - Cq_{pur} = 3,3$ pour un facteur de dilution égal à 10 et une efficacité de PCR optimale égale à 2 ($\log_2(10)$). Les astérisques montrent des différences significatives (p-value < 0,05).

Au niveau des deux matrices mollusques, les Cq sont plus tardifs lorsque le gradient de Percoll 30% est réalisé, traduisant une perte d'oocystes et/ou d'ARN (p-value < 0,05). La purification par gradient de Percoll n'est donc pas retenue. Pour un dopage avec 10 000 *T. gondii* sans gradient de Percoll, le Cq moyen obtenu à partir de la moule bleue ($30,67 \pm 1,22$) est inférieur à celui obtenu pour la dreissène ($32,99 \pm 1,08$) (p-value < 0,05). Ainsi en fonction de la matrice mollusque utilisée, la détection d'ARN varie pour une même dose d'oocystes de *T. gondii*.

Considérant la variabilité observée sur Dreissènes et moules bleues avec le Kit FastPrep Pro™ Soil-Direct (avec purification) sans gradient de Percoll (comparer **Tableau XII** et **Figure 13**), d'autres modifications ont été menées au niveau des étapes de purification des oocystes et de pré-extraction, dans un premier temps sur dreissène. Les résultats sont présentés dans le **Tableau XIII**.

Tableau XIII : Résultats des modifications des étapes d'éluion des oocystes (10 000) et de pré-extraction d'ARN à partir de la dreissène (n=2).

L'éluion des oocystes a été testée en présence de trypsine avec ou sans ajout d'hypochlorite de sodium à 0,12%. Une agitation mécanique en présence de billes (Tube Lysing Matrix E) *via* le FastPrep Instrument (2x40s – Vitesse 6.0) ou *via* le TissueLyser (30s, 33 Hz) a permis de pré-extraire l'ARN des parasites. Les ARN sont ensuite extraits avec le Kit FastPrep Pro™ Soil-Direct (avec purification) et chaque extrait d'ARN dilué au 1/10^{ème} est testé en duplicat. Les Cq indiqués correspondent aux Cq des échantillons purs extrapolés à partir de la valeur de Cq obtenue au 1/10^è, avec $Cq_{1/10^è} - Cq_{pur} = 3,3$ pour un facteur de dilution égal à 10 et une efficacité de PCR optimale égale à 2 ($\log_2(10)$).

Eluion des oocystes	Pré-extraction ARN	Cq moyen	Ecart-type	Puits positif en RT-qPCR
Trypsine 1X	2x40s FastPrep	32,07	0,73	4/4
	30s TissueLyser	35,42	N/A	1/4
Trypsine 1X Hypochlorite de sodium 0,12%	2x40s FastPrep	35,52	N/A	1/4
	30s TissueLyser	35,60	N/A	1/4

La variabilité du signal de RT-qPCR observée notamment sur la matrice dreissène, peut être liée à la présence dans les extraits de Rnases qui, en fonction de leur concentration, pourraient induire une dégradation plus ou moins importante des ARN. Or, la solution de trypsine issue de pancréas d'animaux est riche en ribonucléases et il a été démontré que l'ajout d'hypochlorite de sodium à 0,12 % pouvait inhiber l'activité de ces ribonucléases (Vrtacnik *et al.*, 2014). Ainsi, une éluion des oocystes en trypsine couplée à l'hypochlorite de sodium a été testée sur la dreissène. Cependant, ces conditions ne permettent pas d'améliorer

la détection des oocystes de *T. gondii* par RT-qPCR puisque seul un réplicat sur quatre est positif (**Tableau XIII**).

La variabilité observée peut également être liée à un problème d'efficacité et/ou de reproductibilité de l'étape de pré-extraction d'ARN. Ainsi, l'impact d'une agitation mécanique en Tissue Lyser sur la détection en RT-qPCR a été évalué. Le Fastprep utilise un mouvement omnidirectionnels qui est peut-être trop drastique pour obtenir de l'ARN alors que le TissueLyser utilise un mouvement uniforme. Le TissueLyser est notamment utilisé pour obtenir des sporocystes à partir d'oocystes de *T. gondii* (**Partie 2.A., Rousseau et al., en préparation**). Cependant, en présence de trypsine seule, seul un réplicat sur quatre est positif lorsque l'agitation mécanique est effectuée en TissueLyser.

En conclusion, aucune des modifications testées n'a permis d'améliorer la variabilité de détection des oocystes viables par RT-qPCR chez la dreissène. Ainsi, le protocole retenu qui permet de détecter un maximum de réplicats reste : i) élution en trypsine 1X ; ii) pré-extraction des ARN par agitation mécanique (2x40s – Vitesse 6.0) en présence de billes de différentes tailles *via* le Fastprep instrument ; iii) extraction d'ARN total avec le kit FastPrep Pro™ Soil-Direct (avec purification). Ce protocole sera testé sur les oocystes de *C. parvum* et les kystes de *G. duodenalis*.

b) *C. parvum* et *G. duodenalis*

Le protocole d'extraction d'ARN et de détection par RT-qPCR proposé pour *T. gondii* a été testé pour mettre en évidence simultanément la présence d'oocystes de *C. parvum* et de *T. gondii*, et des kystes de *G. duodenalis* viables chez *M. edulis* et *D. polymorpha*. Les résultats sont présentés dans le **Tableau XIV**.

Tableau XIV : Détection des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum*, et des kystes de *G. duodenalis* viables par RT-qPCR à partir de *M. edulis* et *D. polymorpha* (n=4).

Chaque moule a été dopée simultanément avec 10 000 oocystes de *T. gondii* et *C. parvum* et 10 000 kystes de *G. duodenalis*. Les culots d'oocystes et de kystes issus de la digestion trypsique de la matrice mollusque ont été lavés puis soumis à une agitation mécanique en présence de billes (Tube Lysing Matrix E) *via* le FastPrep Instrument (2x40s – Vitesse 6.0) pour pré-extraire l'ARN des parasites. L'extraction des ARN est effectuée avec le Kit FastPrep Pro™ Soil-Direct (avec purification). Chaque extrait d'ARN dilué au 1/10^{ème} est

testé en duplicat. Les Cq indiqués correspondent aux Cq des échantillons purs extrapolés à partir de la valeur de Cq obtenue au 1/10^è, avec $Cq_{1/10^è} - Cq_{pur} = 3,3$ pour un facteur de dilution égal à 10 et une efficacité de PCR optimale égale à 2 ($\log_2(10)$).

	Pré-extraction ARN	Cq moyen	Ecart-type	Puits positif en RT-qPCR
<i>M. edulis</i>	<i>T. gondii</i>	33,25	1,48	8/8
	<i>C. parvum</i>	36,62	N/A	1/8
	<i>G. duodenalis</i>	28,59	0,48	8/8
<i>D. polymorpha</i>	<i>T. gondii</i>	34,88	1,17	8/8
	<i>C. parvum</i>	37,57	2,40	5/8
	<i>G. duodenalis</i>	34,86	1,24	8/8

Les résultats montrent que la viabilité est détectée en RT-qPCR pour la totalité des essais à partir de *M. edulis* et *D. polymorpha* dopée par des oocystes de *T. gondii* et kystes de *G. duodenalis*. En revanche, des oocystes de *C. parvum* viables sont détectés seulement pour 1/8 réplicats de *M. edulis* (12%) et 5/8 réplicats de *D. polymorpha* (63%). Ainsi, le protocole de RT-qPCR développé sur *M. edulis* et *D. polymorpha* pour *T. gondii* fonctionne pour les kystes de *G. duodenalis* mais nécessiterait une optimisation pour améliorer la détection de la viabilité des oocystes de *C. parvum*.

c) Détermination de la limite de détection des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum*, et des kystes de *G. duodenalis* en RT-qPCR à partir de *M. edulis* et *D. polymorpha*.

Bien que le protocole ne soit pas optimal pour la détection de *C. parvum* par RT-qPCR dans les moules, la limite de détection (LD₅₀) correspondant à la dernière dose pour laquelle 50% des échantillons sont détectés positifs a été caractérisée sur les deux types de moules (**Tableau XV**).

Tableau XV : Evaluation de la limite de détection des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum*, et des kystes de *G. duodenalis* viables par RT-qPCR chez *M. edulis* et *D. polymorpha* (n=2).

Chaque moule a été dopée simultanément avec une quantité d'oocystes et de kystes allant de 500 à 100 000. Le culot d'oocystes et de kystes issu de la digestion trypsique de la matrice mollusque est lavé puis soumis à une agitation mécanique en présence de billes (Tube Lysing Matrix E) via le FastPrep Instrument (2x40s – Vitesse 6.0) pour pré-extraire l'ARN des parasites. L'extraction des ARN est effectuée avec le Kit FastPrep Pro™ Soil-Direct (avec purification). Chaque extrait d'ARN dilué au 1/10^{ème} est testé en duplicat. Les Cq indiqués correspondent aux Cq des échantillons purs extrapolés à partir de la valeur de Cq obtenue au 1/10^è, avec $Cq_{1/10^è} - Cq_{pur} = 3,3$ pour un facteur de dilution égal à 10 et une efficacité de PCR optimale égale à 2 ($\log_2(10)$).

	Quantité de kystes	<i>T. gondii</i>		<i>G. duodenalis</i>			<i>C. parvum</i>	
		Cq moyen ± écart-type	Puits positif en RT-qPCR	Cq moyen ± écart-type	Puits positif en RT-qPCR	Cq	Puits positif en RT-qPCR	
<i>M. edulis</i>	100 000	29,77 ± 2,08	4/4	29,50 ± 1,49	4/4	N/A	0/4	
	50 000	31,50 ± 1,30	4/4	31,35 ± 1,50	4/4	N/A	0/4	
	10 000	31,41 ± 2,12	4/4	31,50 ± 0,47	4/4	N/A	0/4	
	5 000	33,47 ± 0,23	3/4	N/A	0/4	N/A	0/4	
	1 000	N/A	0/4	N/A	0/4	N/A	0/4	
	500	N/A	0/4	N/A	0/4	N/A	0/4	
<i>D. polymorpha</i>	100 000	33,67 ± 0,48	4/4	N/A	0/4	N/A	0/4	
	50 000	33,35 ± 0,30	4/4	N/A	0/4	N/A	0/4	
	10 000	35,58 ± 0,71	2/4	N/A	0/4	N/A	0/4	
	5 000	38,26 ± 0,10	3/4	N/A	0/4	N/A	0/4	
	1 000	36,72	1/4	N/A	0/4	N/A	0/4	
	500	N/A	0/4	N/A	0/4	N/A	0/4	

Dans cette expérimentation, la viabilité n'est pas détectée pour les oocystes de *C. parvum* sur *M. edulis* et *D. polymorpha* et pour les kystes de *G. duodenalis* sur *D. polymorpha* (Tableau XV). Ces résultats divergent des résultats obtenus précédemment dans les mêmes conditions expérimentales (Tableau XIV). Le vieillissement des suspensions mères de parasites au cours du temps peut en être responsable. On ne peut également exclure un problème lié spécifiquement aux lots de moules utilisés. Nos résultats ne permettent donc pas de conclure quant à la limite de détection de cette technique sur ces matrices pour *C. parvum*. Pour *T. gondii*, la LD₅₀ est comprise entre 1 000 et 5 000 oocystes pour les deux mollusques.

Pour *G. duodenalis* chez *M. edulis*, la LD₅₀ se situe entre 5 000 et 10 000 kystes viables. Ces limites de détection sont élevées et peu compatibles avec une surveillance environnementale, où la quantité parasitaire est très faible. Par conséquent, dans les conditions mises en œuvre, la RT-qPCR ne semble pas adaptée pour étudier la viabilité des trois parasites dans des matrices complexes telles que les moules.

La RT-qPCR pour étudier la viabilité des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum* et des kystes de *G. duodenalis* en matrice mollusque : Conclusions/Discussion

Notre principal objectif est de disposer d'une méthode permettant de détecter la viabilité des trois protozoaires *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis* de façon simultanée en matrice mollusque. Jusqu'à aujourd'hui, la plupart des études porte sur la détection d'ADN (Ghozzi *et al.*, 2017 ; Tei *et al.*, 2016 ; Marangi *et al.*, 2015 ; Putignani *et al.*, 2011 ; Leoni *et al.*, 2007) et très peu d'étude s'intéresse à la viabilité. Ces dernières utilisent principalement la méthode FISH (Robertson et Gjerde, 2008 ; Lucy *et al.*, 2008 ; graczyk *et al.*, 2007) (Arkush *et al.*, 2003;) et plus occasionnellement un marquage de viabilité à l'iodure de propidium (Gómez-Courso *et al.*, 2003 ; Negm, 2003) ou la RT-qPCR (Coupe *et al.*, 2018). La méthode choisie pour étudier la viabilité des trois parasites en matrice mollusque est la RT-qPCR. Plusieurs protocoles d'extraction d'ARN d'oocystes de *T. gondii* ont été testés sur la moule bleue et la dreissène, couplés à une étape de pré-extraction par agitation mécanique en présence de billes. La pré-extraction l'aide de billes a en effet été déjà décrite pour extraire l'ARN de *T. gondii* à partir de moule entière *M. galloprovincialis* (Arskursh *et al.*, 2003). Le Kit RNeasy Mini ne s'avère pas adapté à la matrice mollusque. Ce dernier n'a jamais été décrit pour extraire de l'ARN de pathogènes à partir de matrice mollusque mais un autre kit, RNeasy Plant Mini (QIAGEN), a déjà été utilisé pour l'extraction d'ARN de virus issus de palourde (Costafreda *et al.*, 2006). L'intérêt de ce dernier kit pour extraire l'ARN des parasites à partir de la matrice moule pourrait donc être évalué. Avec le Kit FastRNA Pro™ Soil-Direct, la plupart des échantillons de moule bleue et de dreissène dopés par *T. gondii* sont détectés en RT-qPCR. Jusqu'à aujourd'hui le kit FastPrep RNA Pro™ Soil-Direct a été appliqué uniquement sur le sol pour extraire l'ARN de bactéries, de levures (Tebbe *et al.*, 1993) mais aussi de *C. parvum* (Liang et Keeley, 2011). Cependant, dans notre étude, l'extraction d'ARN sur matrice moule bleue avec ce kit s'est avérée peu reproductible et source d'inhibiteurs, partiellement levée après dilution des ARN. La présence d'inhibiteurs de qPCR représente la principale limite d'utilisation de la RT-qPCR sur matrice mollusque, entraînant une diminution de la sensibilité ou des résultats faussement négatifs (Schrader *et al.*, 2012). De plus, l'extraction d'ARN à partir de moule bleue reste très dépendante des propriétés physico-chimique du mollusque. Cette variabilité est aussi observée pour la dreissène. L'ajout du gradient de Percoll 30% n'a pas permis l'élimination des inhibiteurs et l'amélioration des résultats de RT-qPCR. Par ailleurs, la faible sensibilité de la détection par RT-qPCR ne semble pas liée à la présence de RNases dans le tampon trypsine puisque l'ajout d'hypochlorite de sodium (Vrtacnik *et al.*, 2014) lors de l'élution n'a pas augmenté la fréquence de détection. D'après les valeurs de Cq obtenues, la quantité d'ARN extraite en

utilisant une agitation mécanique en FastPrep (2 x 30s Vitesse 6.0) semble plus importante par rapport au TissueLyser (30s à 33Hz). Comme nous le verrons ultérieurement dans ce manuscrit (**Partie 2.A., Rousseau *et al.*, en préparation**), ce mode d'agitation permet de libérer uniquement des sporocystes et peut donc s'avérer insuffisant pour libérer l'ARN des sporozoïtes contrairement au protocole FastPrep.

Le protocole incluant une digestion des mollusques en trypsine 1X suivie d'une agitation mécanique de 2x40s à la vitesse 6.0 en FastPrep et d'une extraction d'ARN avec le kit FastPrep Pro™ Soil-Direct (avec purification) a donc été retenu pour les oocystes de *T. gondii* et testé pour les oocystes de *C. parvum* et des kystes de *G. duodenalis*. Si la procédure a permis de détecter les deux parasites dans les deux matrices, la méthode apparaît plus efficace pour *Giardia* sur *M. edulis* que *D. polymorpha*. De plus, la sensibilité de la méthode (nombre de positifs) est plus faible pour *C. parvum* (12 à 63% de détection selon la moule). La matrice moule bleue possède une quantité de tissus supérieure à la dreissène qui peut contribuer à la protection des kystes de *Giardia* et de leurs ARN lors de l'agitation au Fastprep avec les billes, et donc favoriser leur détection dans cette matrice. Par ailleurs, les limites de détection de ce protocole s'avèrent relativement élevées : > 1 000 pour *T. gondii* (*M. edulis* et *D. polymorpha*) et > 5 000 pour *G. duodenalis* (*M. edulis*).

En raison de la taille des oocystes de *C. parvum* (5 µm) par rapport à *Giardia* (7-10 µm x 8-12 µm), une centrifugation suivie d'une filtration pourrait cependant le rendre plus efficace pour extraire l'ARN de *C. parvum* comme proposé par Liang et Keeley (2011).

Dans les conditions proposées, la RT-qPCR ne semble pas adaptée pour étudier la viabilité des trois protozoaires dans le cadre de surveillance environnementale, où la quantité parasitaire est très faible. Récemment une application environnementale de la RT-qPCR a permis de détecter des oocystes de *T. gondii* viables dans 6,7 % d'échantillons d'hémolymphe de moule *Perna canaliculus* (Coupe *et al.*, 2018). L'utilisation du compartiment hémolymphe pourrait peut-être limiter la présence d'inhibiteurs de qPCR par rapport aux organismes entiers et simplifier le protocole de RT-qPCR sans nécessiter l'étape d'extraction des oocystes des tissus. La bioaccumulation des trois parasites chez les mollusques a été étudiée dans différents tissus (branchies, glande digestive) et liquides (hémolymphe, intervalvaire). Dans l'ensemble, l'hémolymphe, les branchies et le tube digestif permettent de déterminer le niveau de contamination des mollusques par des protozoaires (Hohweyer *et al.*, 2017). Il a par ailleurs été démontré que des oocystes de *T. gondii*, infectieux et donc viables, étaient le plus

souvent détecté dans la glande digestive (89%) de *M. galloprovincialis* par rapport à l'hémolymphe ou les branchies (Arkursh *et al.*, 2003). D'autres études ont démontré que *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis* étaient retrouvés dans les tissus des moules, des huîtres (Willis *et al.*, 2014 ; Esmerini *et al.*, 2010 ; Robertson et Gjerde, 2008) mais aussi des dreissènes (Palos Ladeiro *et al.*, 2013). Afin d'optimiser la détection des parasites, des études proposent d'analyser les branchies et le tube digestif chez les moules ou les palourdes (Freire-Santos *et al.*, 2000 ; Gómez-Courso *et al.*, 2004 ; Leoni *et al.*, 2007) ou les tissus de mollusques entiers (Lucy *et al.*, 2008 ; Levesque *et al.*, 2010 ; Esmerini *et al.*, 2010). C'est cette dernière suggestion qui a été retenue dans le cadre de cette étude pour s'affranchir notamment des éventuels biais liés à une accumulation différentielle des parasites dans les organes et détecter un maximum de parasites viables. Cependant, cette approche a présenté l'inconvénient de conduire à une présence importante d'inhibiteurs qui limitent la détection des parasites viables dans les extraits. En conséquence, il serait intéressant de mener des études comparatives afin d'évaluer quelle approche, organisme entier par rapport à l'organe accumulateur, est la plus appropriée pour détecter chacun des parasites viables dans les moules.

CONCLUSIONS PARTIE 1

Notre principal objectif était de proposer une approche pour étudier simultanément la viabilité des trois parasites par biologie moléculaire, et ce quelle que soit la matrice : simple (eau) ou complexe (mollusque).

La PMA-qPCR ne s'avère pas être une approche à privilégier en matrice eau car, bien qu'elle permette de discriminer entre oocystes/kystes viables et traités thermiquement, elle ne permet pas de mettre en évidence des réductions de viabilité importantes et surtout, un signal est toujours détecté dans des parasites inactivés conduisant à des faux positifs. Même si seul le traitement thermique a été évalué et qu'il conviendrait de tester d'autres traitements d'inactivation, nos travaux indiquent que la PMA-qPCR n'apparaît pas pertinente pour une application sur matrice complexe.

Actuellement, la RT-qPCR reste donc la méthode moléculaire de choix pour étudier la viabilité des trois parasites en matrice eau (Travaillé *et al.*, 2016). Si elle a été utilisée avec succès pour évaluer la survie des oocystes et kystes inoculés à fortes doses (10^3 à 10^5) dans du basilic (Hohweyer *et al.*, 2016), l'approche RT-qPCR s'avère en revanche moins pertinente pour des matrices plus complexes telles que les mollusques, comme nous l'avons démontré dans ces travaux, ou encore de la purée de fraises (données personnelles, Projet FAM PARAVIPRESS 2014-2016). L'une des principales optimisations nécessaires pour la RT-qPCR en matrice complexe concerne la pré-extraction d'ARN (étape limitante) afin de réduire l'importante variabilité observée lors des essais.

Pour *Giardia*, les résultats prometteurs obtenus avec la technique de multiplication *in vitro* couplée à la qPCR pour détecter des kystes viables dans l'eau (LOD<1 kyste viable), ouvrent des perspectives particulièrement intéressantes pour évaluer la viabilité de *Giardia* dans une matrice complexe. Des perspectives de ce travail consistent donc à évaluer dans un premier temps la transférabilité de cette méthode sur une matrice complexe, à procéder à des optimisations si nécessaire afin de valider ou non la pertinence de cette approche.

Globalement, quelle que soit la technique, nos travaux soulignent la difficulté, voire l'impossibilité, de disposer d'un protocole unique pour les trois parasites et applicable à tous types de matrices. Ceci étant établi et accepté, et en l'absence d'une méthode moléculaire robuste pour la détection des parasites viables dans une matrice complexe, nous avons orienté nos efforts sur la culture-cellulaire couplée à la qPCR, technique spécifique à chaque parasite, mais qui permet de mesurer directement l'infectiosité, sans avoir recours aux modèles animaux (bioessais). Seuls *T. gondii* et *C. parvum* ont une phase de leur cycle où ils se multiplient à l'intérieur des cellules et peuvent donc être concernés par cette approche.

**PARTIE 2 : CC-qPCR : METHODE ALTERNATIVE
AUX BIOESSAIS POUR ETUDIER L'INFECTIOSITE
DES OOCYSTES DE *T. GONDII* ET DE *C. PARVUM***

La viabilité est un paramètre important pour estimer le risque mais non suffisant. En effet, seul un parasite infectieux peut potentiellement conduire à une infection chez l'Homme. La méthode de référence pour étudier l'infectiosité des trois protozoaires, disponible au sein des laboratoires de l'EA 7510 ESCAPE (laboratoires de Reims et de Rouen), est l'infection de modèles animaux. Cependant, son application n'est pas envisable en industrie agro-alimentaire car les bioessais sont très coûteux, le temps nécessaire pour obtenir une réponse est long (plusieurs semaines) et ils soulèvent de nombreux problèmes éthiques.

Il est donc apparu nécessaire de développer une méthode alternative aux bioessais, plus facile à mettre en œuvre en laboratoire et plus accessible aux industries agroalimentaires, permettant d'évaluer l'efficacité des procédés et l'exposition aux parasites infectieux dans les aliments. Une approche alternative aux bioessais est la culture cellulaire. Cette méthode a déjà été utilisée avec succès pour quantifier les oocystes viables de *Cryptosporidium* et *T. gondii* dans l'eau (Rochelle *et al.*, 2002 ; Slifko *et al.*, 2002 ; Ware *et al.*, 2010). Cependant, aucune méthode de ce type n'a été proposée pour détecter les oocystes viables et infectieux dans les matrices alimentaires (Rousseau *et al.*, 2018).

Notre objectif est de proposer un outil pour étudier l'infectiosité des oocystes de *T. gondii* et de *C. parvum*.

Ainsi, dans une première partie, nous avons optimisé la culture cellulaire à partir d'oocystes de *T. gondii* dans l'eau, puis comparé cette méthode au modèle *in vivo* et adapté la technique pour une application sur matrice mollusque (**Rousseau *et al.*, en préparation**).

Puis dans une seconde partie, à partir d'un protocole de culture cellulaire déjà disponible au laboratoire, nous avons mis en place la culture cellulaire couplée à la qPCR pour déterminer l'infectiosité des oocystes de *C. parvum* en matrice eau et évaluer sa faisabilité sur matrice complexe (moules *M. edulis* et *D. polymorpha*).

PARTIE 2.A. : T. GONDII

Dans cette étude, le potentiel de la CC-qPCR a été évalué pour étudier l'infectiosité des oocystes de *T. gondii* dans un contexte de biosurveillance. Un protocole a d'abord été mis au point dans une matrice simple (eau) puis adapté pour être appliqué à une matrice plus complexe, la moule. Ce travail fait l'objet d'un article qui sera soumis dans Applied and Environmental Microbiology.

Nous avons tout d'abord déterminé quel stade parasitaire serait le plus adapté pour infecter les cellules et estimer l'infectiosité des oocystes de *T. gondii* dans le cadre d'une application environnementale. Actuellement, le dékystement est la seule méthode décrite pour obtenir des sporozoïtes. Les oocystes sont broyés mécaniquement pour obtenir des sporocystes. Puis ces derniers sont incubés en présence de sels biliaries pour libérer les sporozoïtes. Cependant, cette méthode est longue et non reproductible car le rendement en sporozoïtes est aléatoire. Nous avons donc choisi de mettre en culture le stade sporocyste afin de s'affranchir de l'étape des sels biliaries. Différents traitements mécaniques (TissueLyser ou vortex couplé à différents types de billes) ont été appliqués pour obtenir les sporocystes à partir des oocystes. Le meilleur rendement (67%) a été obtenu après 30s de TissueLyser en utilisant un tube de Lysing Matrix E composé de différentes tailles de billes (2 mm et 425-600 µm en verre et 1,2 mm en céramique).

Pour définir les conditions optimales d'infection des cellules mise en culture par les sporocystes, deux paramètres ont été étudiés : (i) le temps de contact entre les sporocystes (2h ou 1 jour) et les cellules, suivi d'un lavage des puits pour éliminer les parasites non infectieux et (ii) le temps de culture cellulaire (2, 3 ou 6 jours). Avec un lavage des puits au bout d'un jour suivi de deux jours de culture cellulaire, la réduction du signal qPCR obtenu ($\Delta Cq = 2,5$) montre la possibilité des sporocystes de *T. gondii* de libérer les sporozoïtes qui vont envahir les cellules Vero, se multiplier et produire des tachyzoïtes. La limite de détection de cette méthode est inférieure à cinq oocystes. Lorsque le temps de culture augmente, la différence de signal entre le T0 et l'arrêt de culture augmente jusqu'à atteindre un ΔCq égal à 6,2 après 6 jours de culture. Nos résultats indiquent également que le traitement mécanique en TissueLyser permettant d'obtenir des sporocystes n'altère pas l'infectiosité de ces derniers à court terme. Nous avons démontré que les sporocystes ainsi obtenus conservent leur caractère infectieux jusque 5 mois à 4°C. Par ailleurs, les résultats obtenus avec la méthode de CC-

qPCR que nous avons développée à partir de sporocystes de *T. gondii* sont corrélés avec les résultats des bioessais.

Les moules *M. edulis* et *D. polymorpha* sont des concentrateurs de différents contaminants présents dans les eaux et représentent à ce titre, des outils d'intérêt pour la biosurveillance de la qualité des masses d'eau. Afin de pouvoir évaluer le risque pour l'homme, lié à la contamination des eaux par des oocystes de *T. gondii* via ces outils, il est nécessaire de pouvoir évaluer leur caractère infectieux dans ces matrices complexes. Le protocole de CC-qPCR a donc été adapté pour pouvoir être appliqué à ces deux mollusques. Ainsi, suite à une digestion trypsique, une purification par gradient de Percoll (30%) et un traitement à l'hypochlorite de sodium (1,6%) ont été réalisés. Les oocystes ainsi élués de la matrice mollusque sont broyés mécaniquement par TissueLyser afin d'obtenir des sporocystes. L'échantillon obtenu est dilué avant d'être déposé sur la culture cellulaire pour éviter le développement de moisissures. Enfin, le temps de culture a été augmenté à 62h sur dreissènes et 72h sur moules bleues pour pouvoir détecter significativement l'infectiosité. Nous avons montré que plus le temps de culture est important, plus on détecte l'infectiosité nettement sur les deux matrices mollusques et la détection de l'infectiosité est possible dès 62h sur dreissènes et 72h de culture sur moules bleues.

Les performances de la CC-qPCR sur matrice mollusque ont ensuite été évaluées : la limite de détection a été établie à moins de 10 oocystes de *T. gondii* infectieux pour les deux matrices, avec un résultat en 72h maximum contre quatre semaines en modèle animal. En revanche, l'absence de relation linéaire entre les Cq obtenus et la quantité d'oocystes dans les mollusques rend impossible la quantification des oocystes infectieux de *T. gondii* par CC-qPCR et donc son utilisation pour étudier l'efficacité des procédés industriels, ce qui est également impossible en modèle *in vivo*.

La CC-qPCR à partir du stade sporocyste de *T. gondii* est une méthode alternative aux bioessais rapide, peu coûteuse et plus facile à mettre en oeuvre en laboratoire permettant de détecter moins de cinq oocystes infectieux dans l'eau et dix oocystes infectieux en matrice mollusque. Cette méthode semble pertinente pour évaluer l'exposition de l'homme à des oocystes de *T. gondii* infectieux dans l'environnement.

Assessing *Toxoplasma gondii* oocysts infectivity by a sporocyst-based cell-culture assay combined to qPCR for environmental applications.

Angélique Rousseau ^{1,2,3}, Sandie Escotte-Binet¹, Stéphanie La Carbona ², Sophie Chagneau¹, Loïc Favennec³, Aurélien Dumètre^{4,5}, Sophie Kubina ^{1,2,3}, Jitender P. Dubey ⁶, Didier Majou ⁷, Aurélie Bigot-Clivot ⁸, Isabelle Villena ¹, Dominique Aubert ¹.

¹ EA7510, ESCAPE, Laboratoire de Parasitologie Mycologie, Université de Reims Champagne Ardenne, SFR Cap Santé Fed 4231, 51 Rue Cognacq Jay, 51096 Reims, France.

² ACTALIA Food Safety Department, 310 Rue Popielujko, 50000 Saint-Lô, France.

³ EA7510, ESCAPE, Laboratoire de Parasitologie Mycologie, Université de Rouen, 76183 Rouen Cedex, France

⁴ Aix Marseille Univ, IRD, AP-HM, SSA, VITROME, Marseille, France.

⁵ IHU-Méditerranée Infection, Marseille, France.

⁶ United States Department Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville Agricultural Research Center, Animal Parasitic Diseases Laboratory, building 1001, Beltsville, MD 20705 2350, USA.

⁷ ACTIA, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris CEDEX 05, France.

⁸ UMR-I 02 SEBIO INERIS-URCA-UHL, Université de Reims Champagne Ardenne, SFR Cap Santé Fed 4231, 51687 Reims Cedex 02, France

a.rousseau@actalia.eu

sandie.escotte@univ-reims.fr

s.lacarbona@actalia.eu

sophiechagneau@gmail.com

loic.favennec@chu-rouen.fr

sophie.kubina@etu.univ-rouen.fr

Jitender.Dubey@ARS.USDA.GOV

d.majou@actia-asso.eu

aurelie.bigot@univ-reims.fr

isabelle.villena@univ-reims.fr

dominique.aubert@univ-reims.fr

Corresponding authors

Corresponding author: Dominique Aubert, mail: dominique.aubert@univ-reims.

Acknowledgements

A. Rousseau and this work were supported by the UMT ACTIA PROTORISK and the Universities of Reims Champagne-Ardenne and Rouen Normandie, in the frame of a PhD with a CIFRE agreement between ACTALIA and the French Ministry of “Higher Education, Research and Innovation”. This study was also supported by the French national Research Agency (grant ANR-15-CE34-0005), the Normandie Region and the European Union through the European Regional Development Fund (FEDER). We thank HYDREOS, a French organization that promotes the water sector in North-East of France, for its backing. A.D. is supported by the Institut Hospitalo-Universitaire (IHU), the National Research Agency (grants 10-IAHU-03 and 17-CE21-0005-07), the Région Provence Alpes Côte d’Azur and European funding FEDER PRIMI. We thank Mrs Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for checking spelling and grammar.

ABSTRACT –

Toxoplasma gondii is an ubiquitous protozoan that infects several levels of the world's population and is responsible for foodborne toxi-infection. However, no standardized method is currently available to detect cysts in foods and therefore there are no regulations. However, ingestion of food contaminated with small amounts of these parasites may result in human infection. The objectives of this study are (i) to develop a method, applicable in biomonitoring, for a rapid detection of infectious *T. gondii* by cell culture coupled with the detection of qPCR (sporocyst-CC-qPCR), (ii) compare CC-qPCR and *in vivo* model for assessing to infectious *T. gondii* oocysts, and (iii) verify the feasibility of this method on blue and zebra mussels. The production of sporocysts from a mechanical treatment (30s, 33Hz) associated with beads made it possible to release 67% of the sporocysts. After culture, fewer than five *T. gondii* oocysts in water are detectable after two days of cell culture, compared to four weeks with the *in vivo* model. For both mussel matrices, using a percoll gradient (30%) combined to a sodium hypochlorite treatment, the LOD₁₀₀ was less than 10 oocysts of *T. gondii*. However, *in vitro* model is sensitive but not quantitative like *in vivo*. The development of CC-qPCR in water and in mussel matrices appears as a good alternative to the *in vivo* model. This method is useful for inactivation treatments of *T. gondii* oocysts and consider environmental health human risk.

Importance: The ubiquitous protozoa *Toxoplasma gondii* is now the subject of renewed interest, due to the spread of oocysts via water causing waterborne outbreaks of toxoplasmosis in different parts of the world. With a low sensitivity, *in vitro* cell culture represents a real

innovation, alternative method to animal models, and opens interesting perspectives for evaluating human exposure to infectious *T. gondii* oocysts in the environment, where oocysts number is very low.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, sporocysts, oocysts, *in vitro* cell culture, real-time-qPCR, infectivity, water, mussels, biomonitoring.

I. Introduction

The apicomplexan *Toxoplasma gondii*, an obligate intracellular parasite, can infect humans and a wide range of vertebrates leading to toxoplasmosis. This generally benign affection can cause severe life-threatening disease, particularly in immunocompromised patients and in congenitally affected children (AFSSA, 2005).

There are two major infective stage of the parasite that can infect humans: the tissue cysts (bradyzoites) found only in meat (Belluco *et al.* 2016; Condoleo *et al.* 2018), and the oocysts (sporozoites), widespread in soil, water or food (fruits, vegetables, mollusks...) (Jones and Dubey, 2010). Until 100 million *T. gondii* oocysts are excreted by infected cats and these forms are known to resist environmental conditions, most of physical and / or chemical disinfectants (Dumètre and Dardé, 2003) and certain industrial treatments applied to foods, such as high hydrostatic pressure (Lindsay *et al.* 2008) .

T. gondii oocysts have been responsible for 2% of parasitic protozoan outbreaks between January 2004 and December 2010 (Baldursson and Karanis, 2011; Jones and Dubey. 2010). Oocysts are transmitted by water and are associated to 21% of waterborne outbreaks between 1976 and 2009 (Meireles *et al.* 2015, Karanis *et al.* 2007; Baldursson and Karanis, 2011). In the studies that interested to *Toxoplasma* surveillance (reviewed by Plutzer and Karanis, 2016), *T. gondii* was detected in drinking waters (Villena *et al.* 2004). Water can also represent a risk for the contamination of fruits, vegetables and mollusks (Esmerini *et al.* 2010; Lass *et al.* 2012).

Most of the methods used to detect *T. gondii* in water have major limitations and large volumes of waters (until 1 000 L) are required to concentrate parasite before their potential detection. In watercourse, protozoa are subjected to dilution events and water characteristics such as salinity, organic matter content, temperature that can affect oocyst transport dynamics as well as spatial and temporal distributions (Daniels *et al.* 2014). Thus the use of the water

matrix to monitor the contamination level of water bodies leads to variable results that depend on physico-chemical and meteorological parameters that are particularly important in the present context of global climate change. This could represent a limitation when applying a monitoring approach based on this matrix. New methods, alternative to water analyses, have recently emerged in water quality surveys. They take into account host-associated microorganisms as natural biosamplers (Roslev *et al.* 2010). Special attention has been paid to bivalves because their intense filtering activity could lead to high accumulation of pathogens (Roslev *et al.* 2010; Grodzki *et al.* 2014). Hence, studying bivalves can highlight pathogen contamination even when water analysis results appear to be negative (Ayres *et al.* 1978). Laboratory studies have shown that marine and freshwater bivalves can concentrate waterborne protozoan parasites (Graczyk *et al.* 2003; Robertson *et al.* 2007; Palos Ladeiro *et al.* 2014). Consistent with this, some studies have reported the detection of *T. gondii* oocysts in different marine (Esmerini *et al.* 2010; Aksoy *et al.* 2014; Shapiro *et al.* 2015, Staggs *et al.* 2015) or continental (Kerambrun *et al.* 2015) bivalves.

Such bioaccumulation measurements of these protozoa in invertebrate species break away from current approaches to protozoa research. The advantages of such approach are the integrative (temporal) character of pathogen loads in invertebrates and the representativeness of pathogen measurements according to site (attached organisms). Additionally, to be able to study a large spatial scale (freshwater-seawater continuum), marine and seawater invertebrates could be tested at the same time.

Experiments have demonstrated that *T. gondii* oocysts can sporulate in seawater, be concentrated by mussels and remain infectious for laboratory mice (Lindsay *et al.* 2001; Arkush *et al.* 2003; Lindsay and Dubey, 2009). Usually, DNA-based methods are applied to detect protozoa in mollusks (Giangaspero *et al.* 2009; Staggs *et al.* 2015; Tedde *et al.* 2019).

However, DNA can persist for a long time in dead cells (Garcés *et al.* 2006), thus preventing to distinguish between viable and dead parasites. As only viable parasites are potentially infectious and leads to an illness, viability is a major feature for assessing the health risk. Methods to measure the viability of protozoa including *T. gondii* have been recently reviewed (Rousseau *et al.* 2018). Among molecular techniques, PMA based-PCR assays appeared to not be relevant to measure the viability of *T. gondii* oocysts (Rousseau *et al.* 2019) and RNA based-methods overestimate the exposure of humans to viable because of stability of RNA in dead parasites (Smith *et al.* 2004; Habtewold *et al.* 2015). Moreover, all viable parasites are not necessarily infectious.

Many authors have used animal models, the gold standard, to evaluate the exposure of humans to infective *T. gondii* oocysts spiked on raspberries or blueberries (Kniel *et al.* 2002;

Lindsay *et al.* 2008) or in naturally contaminated mussels, oysters (Esmerini *et al.* 2010) or water (Villena *et al.* 2004). However, bioassays are time consuming, labor intensive, expensive for lab and cause an ethical problem. Moreover, bioassays only provide a qualitative assessment of oocyst viability. It is therefore essential to develop complementary methods, easier to implement in the laboratory and also to stakeholders, to give tools to assess the risk associated with the presence of infective parasites in the environment.

One alternative approach to bioassays is *in vitro* method like infection of cell cultures. This methodology has been widely applied associated to qPCR or RT-qPCR detection to detect infective viruses (Grabow *et al.* 2001; Lee and Jeong, 2004), *Cryptosporidium parvum* oocysts (Rochelle *et al.* 2002; Jenkins *et al.* 2003; Najdrowski *et al.* 2007; Parr *et al.* 2007; Shahiduzzaman *et al.* 2010; Johnson *et al.* 2012) and *T. gondii* oocysts (Ware *et al.* 2010; Villegas *et al.* 2010). However, the later studies used the sporozoites to infect the cells, a parasite stage that requires a multi-steps process. Currently, excystation is the only method described for sporozoites. After a mechanical treatment, sporocysts are obtained from oocysts. Then, sporocysts are incubated with bile salts to release the sporozoites. However, this method is long and non-reproducible, mainly because of sporozoites yield. The objective of this study was to propose a rapid, accessible and sensitive method to detect infective *T. gondii* oocysts, for water quality monitoring based on the use of bivalves as indicators of the water contamination. An approach based on infection of cells using sporocysts, coupled to qPCR was first developed in simple matrix (water) and characterized in terms of limit of detection and correlation with *in vivo* assays. Then, the developed method was adapted to be applied to two mollusks bivalves, a coastal one (the blue mussel, *Mytilus edulis*), and a continental one (the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*) in order to propose a reliable tool for water quality assessment along the freshwater-seawater continuum.

II. Materials and methods

1. *T. gondii* oocysts

T. gondii oocysts of type III strain VEG were produced as described previously containing 87.2% of sporulated oocysts, provided in H₂SO₄ aqueous solution (2%) and stored at 4°C until use. Before experiments, oocysts were washed three times in sterile distilled water (dH₂O) to remove sulfuric acid. The concentrations of parasite suspensions used for experiments were calibrated by counting oocysts in sodium dodecyl sulfate (SDS) aqueous solution (0.5%) on Kova Slide (Kova® Slide 10) using a phase contrast microscope (Axioskop 40, Zeiss). Oocysts used throughout this study were less than 14 months aged and their viability was controlled by RT-qPCR targeting sporo-SAG before use. Several conditions were tested to obtain inactivated oocysts by heating them in dry heating block (5 min at +99°C, 2 min at +80°C or 2 min at +60°C). To minimize experimental variability, each treatment condition was tested the same day for CC-qPCR and *in vivo* model. Three aliquots were dedicated to bioassays and six for CC-qPCR analysis.

2. Release of sporocysts

To optimize the release of sporocysts, 10 000 oocysts in pH 7.4 PBS or 0.05% SDS (qsp 350 µL) and submitted to mechanical agitation using vortex (33 rpm) and TissueLyser (QIAGEN) at 33 Hz. Different size and types of beads were tested (2 mm or 425-600 µm in glass, 1.2 mm in ceramic or using a Lysing Matrix E tube from MP Biomedicals that contains 1.4 ceramic spheres, 0.1 mm silica spheres, and one 4 mm glass bead) and different treatment time (0 sec, 30 sec, 1 min, 2 min, 3 min or 5 min). The respective number of free sporocysts and oocysts was count in 18 KOVA slide cell count. To calculate the percentage of released sporocysts (= number of sporocyst counted / number of theoretical sporocysts), we considered that 100% of sporocysts were sporulated and 10 000 oocysts corresponded to 20 000 sporocysts. Each experiment was performed in single or duplicate.

3. Sporocyst-based cell culture infectivity assay for *T. gondii* oocysts in simple matrix

Vero cells line (ATCC, CCL-81) was used to support the developement of *T. gondii* parasites from sporocysts. Cells were maintained at 37°C in IMDM growth media containing glutaMAX™ (ThermoFisher, USA) supplemented with 5% (v/v) of heat-inactivated fetal bovine serum (Eurobio, France), 100 µg/mL of streptomycin (Gibco®) and 100 µg/mL of penicillin (Gibco®). Cells were grown to 80% confluence on 75 cm² culture flask (VWR,

Canada) in 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Once confluent, cells were washed with pH 7.4 PBS and trypsinized to remove the cell monolayer from the flask. About 200 000 cells were seeded into each well of 96-well culture plates and grown in medium during 24h as indicated above. The sporocysts obtained from 10 000 oocysts in cell culture medium were deposited on the confluent monolayer allowing the sporozoites to be spontaneously released and to invade cells for 2h or 1 day. After the time contact, cells were washed to remove the parasites that have not penetrated the cells and are considered as “none infective” (D0). Then, cells were cultivated for 2 days (D2), 3 days (D3) or 6 days (D6) at 37°C allowing the conversion from sporozoites to tachyzoites and their detection by real-time PCR. Control culture was incubated either alone without sporocysts. A serial dilution of oocysts in cell culture medium, ranging 20 to 20 000, was used to estimate the limit of detection of the cell culture infection assay in simple matrix.

4. Sporocyst-based cell culture infectivity assay for *T. gondii* oocysts recovered from mussels

Blue mussels (4–5 cm shell length), *M. edulis*, were collected on the intertidal rocky shore of Yport (Seine-Maritime, France). Zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, were collected at about 5 m depth in November at the Lac-du-Der-Chantecoq (Marne, France). Whole mussels were frozen before being sliced with a scalpel. Then mussels were spiked in stomacher bags (Bagpage R400, Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, France) with 10 000 *T. gondii* oocysts. A negative control was realized without oocyst. Each stomacher bag was incubated during 2h at room temperature and then over night at 4°C. Mussels tissues digestion was performed using 1X Trypsin (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) for 1h30 at 37°C under 90 rpm agitation. Filtrates were collected and 25 mL of NaCl 0.9% were added for washing the stomacher bag. Samples were washed twice at 2 500g +10°C during 10 min. The pellets were suspended with 1.5 mL of percoll 30 %. After 5 min at 12 000g, 1 mL of supernatant was discarded and 1 mL of NaCl 0.9% was added to break the percoll gradient. Bleach exposure treatment containing 1.6 % sodium hypochlorite during 10 min at 4°C was used to remove a potential bacteria contamination. The oocysts were then washed two times at 5 000g 5 min in IMDM growth media to remove bleach before sporocysts release using Lysing Matrix E tube and agitation for 30s with TissueLyzer. The sporocyst pellet was then resuspended in culture medium and inoculated into wells of a 24-well culture plate, containing each, a monolayer of 1.10⁶ Vero cells established as indicated above. After 3 hours of contact between sporocysts and cells, cells were washed (D0) and then cultured for 62h, 3 days (D3) and 6 days (D6). A serial dilution of oocysts ranging from 10 to 50 000 was used to

estimate the limit of detection of the cell culture infection assay in mussels (LD₁₀₀: 100% of positive samples are detected).

5. DNA extraction and real time qPCR

Using the QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN), the supernatant was discarded from the wells and cell-culture was suspended in 180 µL of the ATL buffer and 20 µL of proteinase K. The suspension was transferred into a 1.5 mL Eppendorf tube and the sample was processed further by following the manufacture-recommended procedures.

The 529 bp-repeat element was targeted using previously described primers and probe (Lelu *et al.* 2011). qPCR was performed using a SimpliAmp™ Thermal Cycler (ThermoFisher, Scientific Inc, Villebon-sur-Yvette, France) in a final volume of 25 µL containing 12.5 µL of iQ™ Supermix (Bio Rad, Marnes la Coquette, France), 1 µL of BSA 10 mg/mL (SIGMA, France), 1 µL of each primer 20 µM (forward, 5'-AGAGACACCGGAATGCGATCT-3'; reverse, 5'-CCCTCTTCTCCACTCTTCAATTCT-3'), 0.5 µL of probe 10 µM (5' FAM-ACGCTTTCCTCGTGGTGATGGCG-3' BHQ1), 5 µL of DNA template and 4 µL of DNase-RNase free water. Each DNA extract was tested in duplicate. The cycling parameters included a denaturation step at +95°C for 3 min followed by 40 cycles at +95°C for 15s and +65°C for 1 min. A decrease of C_q (quantification cycle) values between the D0 and the end of culture (water matrix: D2, D3, and D6; mussel matrices: 62h, D2, D3 or D6) highlighted the infectivity of the parasites and a signal difference ($\Delta C_q = C_{qD0} - C_{qend\ culture}$) was calculated.

6. *In vivo* inoculation for infectivity

As described in a previous study (Villena *et al.* 2004), *T. gondii* oocysts were inoculated in outbreed female Swiss Webster mice (Charles River Laboratory, Neuilly-sur-Seine, France) weighting 20-30g. Each mouse was intraperitoneally inoculated as this procedure allows controlling the dose of inoculation. After feeding, mice were housed in cages providing granules and water *ad libitum*. Mice were tested for *T. gondii* seroconversion with the modified agglutination test (MAT) four weeks post-inoculation.

To determine infectious oocysts quantity, inoculation results were reported to the standard range dilution. Oocyst serial dilutions, ranging from 0.1 to 1 000, were performed into four mice to obtain a semi-quantitative bioassay.

7. Statistical analysis

The C_q values obtained in qPCR were compared using the non-parametric Kruskal Wallis test. If the null hypothesis H₀ (the tested conditions have no effect on the measured value) was rejected, then the post hoc Wilcoxon-Mann-Whitney test was applied for two independent samples. All statistical tests were performed using StatXact7. Statistical difference was considered as $p < 0.05$.

III. Results

1. Selection of the protocol for the release of sporocysts from *T. gondii* oocysts

Viable oocysts were exposed to different mechanical disruption protocols to obtain a maximal release of intact sporocysts. The assessed parameters were: types (ceramic, glass, or a mix (Lysing Matrix E from MP Biomedicals) and size (0.4 to 2 mm) of beads, suspension solution (0.05% SDS, pH 7.4 PBS), time of shaking, instrument for shaking (vortex, TissueLyser). However, considering the high variability observed using vortex (data not shown), the TissueLyser has been selected for improvement assessment (Fig. 1).

Overall, irrespective of the time of TissueLyser shaking and of the suspension solution (0.05% SDS and pH 7.4 PBS), less than 40% of sporocysts are released with ceramic and glass beads. Higher release percentage was obtained following shaking with small glass beads (425-600 μm) for 30s in 0.05% SDS and with larger glass beads (2 mm) for 3 min in 0.05% SDS. But for these both conditions, the inter-assay variability was high (11%). A mechanical disruption with the TissueLyser associated to Lysing Matrix E tube led to the release of more than 25% of sporocysts irrespective of the agitation time. The highest release rate was obtained after 30s in pH 7.4 PBS, with 67% of sporocysts that were released. Hence, agitation of *T. gondii* oocysts for 30s in the Lysing Matrix E tube in pH 7.4 PBS buffer was the protocol retained to obtain sporocysts for cell culture infection.

2. CC-qPCR based on the infection of cells challenged with *T. gondii* sporocysts

The optimal contact time required for the sporocysts to release sporozoites and for the sporozoites to penetrate the cells was determined. To that aim, Vero cells and sporocysts were let in contact for 2 hours or 1 day (contact time before washing (D0, Fig. 2). At D0, irrespective of the contact time, *T. gondii* DNA was systematically detected by qPCR on total DNA extracted from the cell pellet. These results suggest that the tested time contacts are sufficient to allow some sporozoites to penetrate into the cells and/or that some sporocysts

remain stucked to the surface of Vero cells, even after washing. Then the ability of the sporozoites that have invaded the cells to produce tachyzoites that can multiply was assessed by qPCR following two to six days of cell culture. When cell culture was stopped at D2 or D3 following a contact time of 2h, no variation of Cq values could be observed (p value > 0.05), suggesting that no tachyzoites had multiplied within the cells. But after 6 days of cell culture, Cq significantly decreased between D0 and D6 ($\Delta Cq = 7.6$, p value < 0.05) demonstrating the presence of infective parasites.

When the contact between cells and sporocysts was lengthen to 1 day, the qPCR signal decreased from 25.51 ± 0.70 at D0 to 23.03 ± 0.95 only after 2 days of culture. Although increasing the time of culture resulted in a larger decrease of Cq values ($Cq_{D0} - Cq_{D6} = 6.2$; p-value < 0.05), the protocol allowing the detection of infective oocysts within 3 days (1 day contact time + 2 days cell culture) was selected. This assay was able to specifically detect infective oocysts as demonstrated by the absence of qPCR signal reduction following contact of cells with heat inactivated oocysts (Fig. 2).

T. gondii sporocysts stability after a storage time of 1 and 5 months at 4°C was tested (Fig. 3). The cell culture was stopped at D6 to be in the most favorable condition to observe *T. gondii* oocysts infectivity. Irrespective storage time at 4°C, Cq decreasing was similar between D0 and D6 ($\Delta Cq = 6$). Thus, mechanical shaking by TissueLyser does not alter the infectivity of *T. gondii* sporocysts in the long term (5 months). Thus, it demonstrates the importance of the sporocyst stage compared to sporozoites which are very fragile.

3. Sensitivity of the CC-qPCR *T. gondii* sporocyst-based CC-qPCR assay

A serial dilution ranging from 5 to 10 000 oocysts was used to prepare sporocysts and then infect cell culture using the protocols previously selected. The LD₁₀₀ is lower or equal five oocysts. The linear correlation between the number of infectious parasites and the Cq values ($R^2 = 0.97$, Table I) suggested that this model could be semi-quantitative and that the limit of quantification is lower or equal 5 oocysts.

4. Measure of *T. gondii* oocysts infectivity following heating by CC-qPCR and bioassay

T. gondii oocysts were inactivated by heat treatments for 5 min at 99°C, 2 min at 80°C and 2 min at 60°C. Infectivity of oocysts was then assessed by the developed cell culture-qPCR assay and mice bioassays. As shown in Table II, only untreated oocysts were infectious using both methods. Irrespective of the heat treatment, no tachyzoites were detected by CC-qPCR and no mice showed seroconversion. Hence, the proposed CC-qPCR *T. gondii* sporocyst-

based assay showed a good agreement with bioassay measure to determine the infectivity of *T. gondii* oocysts exposed to heat treatments.

5. Potential of the CC-qPCR assay to determine the infectivity of *T. gondii* oocysts in spiked mussels (*M. edulis* and *D. polymorpha*).

To determine the infectivity of oocysts in mussel matrices, some adjustments of the aforementioned sporocyst-based CC-qPCR assay have been required (see details in material and methods). First, the oocysts recovered from *M. edulis* and *D. polymorpha* were purified using a Percoll gradient (30%) combined to a sodium hypochlorite treatment, prior to sporocysts release. Second, in order to avoid cell contamination due to the mussel tissues brought to the cell culture, the cell infection was performed in 24-well plates to dilute the tissues, and the contact time between sporocysts and cells was reduced to 3 hours instead of 1 day to limit the establishment of putative contaminants.

Then, the kinetic of Vero cells infection with sporocysts released from oocysts inoculated to *M. edulis* and *D. polymorpha* homogenates is presented in Figure 4. For *D. polymorpha*, a significant decrease of Cq was observed from 62h (p-value <0.05) and was maximal after 6 days ($\Delta Cq = 8.52$). For *M. edulis*, the decrease was remarkable after 3 days of culture (D3) and reached a maximal after 6 days ($\Delta Cq = 9.3$). In order to detect *T. gondii* oocysts infectivity in mussel matrix as quick as possible, a time of culture of D3 was retained for both mussel matrices. Then the limit of detection of the sporocyst-based assays to detect infective parasite in *M. edulis* and *D. polymorpha* was determined (Table III). For both mussel matrices, the LD was below 10 oocysts of *T. gondii*. However, no linear relationship could be observed between the Cq and the amount of oocysts spiked on blue mussels indicating that this *in vitro* model is sensitive but not quantitative.

IV. Discussion

The waterborne transmission route of *T. gondii* to humans via the dissemination of oocysts through surface water and its epidemiological impact is now more significant than previously believed (Jones and Dubey, 2010; Baldursson and Karanis, 2011; Karanis *et al.* 2013; Efstratiou *et al.* 2017). Up to the year 2010, *T. gondii* was the aetiological agent in 10 reported waterborne outbreaks (Baldursson and Karanis, 2011; Karanis *et al.* 2007). The reporting countries were Brazil, Panama, Canada, French Guiana, and India. *Toxoplasma gondii* parasites have been detected in surface waters bodies used for recreation, commercial shellfish harvesting and as sources of drinking-water and could infect human. The continuous improvement of methods to detect *T. gondii* oocysts could help uncovering the prevalence of the parasite in different environmental samples.

Pathogen detection in water is complex since it requires a large water volume filtration and parasites concentrations for analysis. Expensive and time consuming, these methods do not allow a rapid detection in routine. Moreover, filtration and purification techniques from water supplies led to variable results depending on water quality, sampling period, locality and quantity (Gallas-Lindemann *et al.* 2013). There are few researches on the presence of *Toxoplasma* oocysts in water as normative process exist only for *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts (ISO15553/2006, NF T90-455 2001). Protozoa could persist in water bodies (freshwater and seawater) for several months (Lindsay *et al.* 2003) and could contaminate aquatic invertebrates. Several studies underline the presence of protozoa in aquatic animals (see review Palos-Ladeiro *et al.* 2013; Hohweyer *et al.* 2013). The majority of studies concern mollusks in link with their filter-feeding regime and principally coastal species which are edible and generally consume raw or undercooked (Palos-Ladeiro *et al.* 2013; Hohweyer *et al.* 2013) and may act as a vector to human waterborne parasite (Graczyk *et al.* 2004). These last years, an increase of interest was observed concerning *T. gondii* oocysts (Jones *et al.* 2014), suggesting a possible trophic transfer of oocysts to aquatic mammals from contaminated mollusks (Simon *et al.* 2013). In fact, contrary to a water matrix, using filter-feeding attached organisms as matrix makes the contamination measurement representative of the sample or exposure site. Measurements in biological matrices (mussels) must i) limit the variability (temporal integration) of measurements compared to those taken in water ii) traduce more reliably the degree of contamination of water bodies, thus facilitating their comparison.

In order to assess the risk linked to *T. gondii* oocysts, it is required to have information about parasite viability. The use of viability methods is based on the principle that only viable oocysts can lead to infection. However, viable parasites are not all necessarily infectious and

consequently such methods led to the overestimation of the risk. This is particularly the case of non-sporulated *T. gondii* oocysts that are non-infectious while being viable. The current method used to assess infectivity is mouse bioassay which is considered as the gold standard. However, as well as being expansive, the animal use raises ethical concerns. Cell culture has been described as a promising alternative method in term of cost and response delay. Cell culture is inoculated with sporozoites obtained from excysted *T. gondii* oocysts. Sporozoites invade cells and differentiate into tachyzoites, which multiply. Parasite foci are detected in cell culture by microscopy or molecular biology (qPCR or RT-qPCR). Cell culture combined to qPCR is largely described for *C. parvum* oocysts (Rochelle *et al.* 2002; Jenkins *et al.* 2003; Najdrowski *et al.* 2007; Shahiduzzaman *et al.* 2010; Johnson *et al.* 2012). Only few studies have described cell culture for *T. gondii* oocysts based on sporozoite inoculation and molecular detection (Villegas *et al.* 2010, Ware *et al.* 2010). CC-qPCR is more sensitive and rapid than the microscopic examination of infected cell cultures. However, no study has described CC-qPCR to detect infective *T. gondii* oocysts with the objective to detect low number of oocysts as this is the case in environmental samples (Rousseau *et al.* 2018). Additionally, the applicability of such approach to environmental applications is usually not considered. Here we describe the first use of cell culture using *T. gondii* sporocysts which is suitable for environmental application in terms of performance and implementation.

Several protocols have been described for the excystation of *T. gondii* oocysts. The effectiveness of the sporozoites releasing methods represents a critical step. This requires the breaking of both the oocyst and sporocyst walls to allow the sporozoites to escape and invade the cell culture. Mechanical agitation using vortex (Everson *et al.* 2002) or TissueLyser (Villegas *et al.* 2010) are the most common techniques to break the oocyst wall. However, such mechanical treatment alone does not seem efficient enough to disrupt the oocyst wall. After bile salt treatment, we observed a significant sporozoites loss and huge mortality. These results were not corroborated with the release of 82.6% sporocysts and 80.63% sporozoites by Villegas *et al.* (2010). Sporocysts release rate was even increased to 90-95% using chemical treatment but no information concerning sporozoites rate was determined (Christie *et al.* 1978). As *T. gondii* oocysts, *Eimeria* has on its surface a micropyle, which is sensitive to CO₂, pH, temperature and bile salts (Jolley *et al.* 1979). When the conditions of excystation are optimal (physiological conditions of the body), the micropyle acts as a sensor and thus facilitates the excystation of oocysts. This aspect has been investigated in *T. gondii* (Freyre and Falcón, 2004). In this study, they combined physical to chemical or mechanical treatments in order to find the best conditions to open oocysts wall. After an ultrasonic bath treatment (40 kHz) for 2 hours at 40-42 ° C (optimal temperature for the release of

sporozoites of *Eimeria*), in presence of Na_2CO_3 and in a medium saturated with CO_2 , 95% sporocysts were released. In our study, this protocol was reproduced using a 37 kHz ultrasonic bath. However, the percentage of released sporocysts has been estimated at 20%. In addition, it was found that about 56% oocysts had not excysted and that 40% of the sporozoites were already released. The loss percentage was estimated at 61.3%. This percentage included oocysts adhered to the plastic tube and sporozoites killed due to their fragility. Freyre and Flacón (2004) did not indicate loss percentage. After bile salt treatment, 34.7% of released sporozoites were counted but the majority were weakened or destroyed. This result was not corroborated with Freyre and Falcón (2004). In this study, 95% viable sporozoites were released, all sporulated oocysts were excysted and only 10% of sporocysts did not release sporozoites. We can therefore see a significant difference for the same protocol, with the exception of the intensity of the ultrasonic bath slightly lower in our study. However, the differences could also be due to the age of the oocysts. Sodium taurocholate was also used to released sporozoites but a low sporozoites release was observed (20 to 30 %) (Kasper *et al.* 1984). No reproducible protocols were found after many experiments to reproduce publication by other authors because of sporozoites fragility. It was already described for *Isospora suis* (Lindsay *et al.* 1983). To avoid cell culture from sporozoites, we tested the ability of oocysts to naturally excysted in cell culture.

As no concluding results were obtained from sporozoites, we finally tested an intermediate form, the sporocyst. Sporocysts represent a second level of protection for the sporozoites (Speer *et al.* 1998; Ferguson *et al.* 1979; 1982). However, its capacity to resist to physical and chemical attacks is relatively unknown. We could suppose that the structure of the inner layer of the sporocyst wall which is composed of four curved plates tightly joined together by suture lines, would provide mechanical resistance (Ferguson *et al.* 1982).

In water, thanks to several applies and more than 80% of rate sporocysts excysted, we choose to use two different mechanical methods to break the oocyst wall while keeping the sporocyst wall intact. Vortex (Everson *et al.* 2002) and TissueLyser (Villegas *et al.* 2010; Ware *et al.* 2010) combined to several glass beads were employed. Only a mechanical grinding with TissueLyser (30 s) associated to Lysing Matrix E tube in pH 7.4 PBS achieved 67 % of sporocysts. However, this percentage of released sporocysts is probably underestimated because 10%-15% of sporocysts never sporulate (Rousseau *et al.* 2019). This method can be easily implemented and can be applied to oocysts isolated from environmental or food samples as mussels.

We checked that the TissueLyser did not alter the infectivity of the sporocysts in cell culture in water in the long term (5 months) and mussel matrix. In order to find optimal conditions to

measure the infectivity, two parameters were studied: (i) the contact time between the sporocysts and the cells, that is required for the release of sporozoites and cell infection; (ii) the time of cell culture which is required to highlight the infection and to measure parasite multiplication by qPCR. From water samples, the contact of the sporocyst for 2h with the cells associated to a cell culture for 2 or 3 days appeared not enough to measure the infection. In contrast, a culture for six days allowed the detection of infective sporocysts in Vero cells, demonstrating that the release by mechanical grinding with TissueLyser was not damaging. Six days of culture is shorter than the 10 days usually described from sporozoites in previous studies (Villegas *et al.* 2010; Ware *et al.* 2010). In the presence of sporocysts, we can hypothesize that Vero cells secrete factors or substances promoting the excystation of sporocysts, thus leading to the production of sporozoites that could thus infect cells as soon as they are released. The time response to measure the infectivity (six days) remains still huge for industrial routine applications and to assess exposure to humans. After a time contact of 1 day between sporocysts and cells, infection was detected irrespective of the time of cell culture, starting from 2 days. This demonstrated that *T. gondii* sporozoites were able to invade cells and differentiate into replicative tachyzoites in three days, including 1 day of contact and 2 days of cell culture. Detection limit of such method was below five oocysts and limit of quantification could be estimated at five oocysts (Table 2). This performance in water is adapted to environmental or food biomonitoring.

To validate our CC-qPCR method in water, we studied the correlation with bioassay. Bioassay is mostly used as a qualitative method (Johnson, 1992; Villena *et al.* 2004; Wainwright *et al.* 2010; Lélou *et al.* 2012). Even if bioassay represents the gold standard for *T. gondii* infectivity, lack of reliability was described when low numbers are used (Rousseau *et al.* 2018). The use of a serial dilutions of oocysts into mice allowed the use of this model as a semi-quantitative method. Until 10 infectious oocysts could be detected. Oocysts were not infectious anymore following heating starting from 60°C to 99°C, using CC-qPCR and bioassays methods. Similar results were previously described using RT-qPCR and bioassays (Travaillé *et al.* 2016) but not by PMA-qPCR (Rousseau *et al.* 2019). Our cell culture appeared to be a good alternative method to bioassay as showed by other authors (Ware *et al.* 2010; Rousseau *et al.* 2018).

Ware and collaborators (2010) obtained cell culture data in a week to 10 days (TOP assay), a time period that appeared not rapid enough to assess risk reduction in the case of a water utility contamination event. A potential alternative is RT-qPCR, that allow to obtain results in a few hours. However, following UV exposure, RT-qPCR results did not correlate with the

TOP assay or bioassay results (Ware *et al.* 2010). In our study, the cell culture assay is reduced to only 3 days that facilitate a rapid decision-making by professionals.

The application of the protocol for obtaining sporocysts in water matrix is therefore transferable to the mussel matrices (*M. edulis* and *D. polymorpha*). Percoll gradient purification has been widely used for *T. gondii* cysts (Watts *et al.* 2017). In order to overcome the mussel matrices, a 30% Percoll gradient purification step (density = 1.04) was tested. With the Percoll gradient, most of the mussel matrices and bacteria were eliminated. Percoll gradient purification was used on clams but also on other types of matrix such as meat, cheese, eggs, fish (Fukushima *et al.* 2007). We observed the infectivity of *T. gondii* oocysts in mussel matrices. The percoll gradient therefore did not alter *T. gondii* oocysts infectivity as has been shown for *C. parvum* oocysts (Suresh and Rehg, 1996). This purification method therefore seems promising in CC-qPCR on a mollusk matrix.

In order to avoid fungi growth during cell culture, 24-well plates were used to dilute the mussel matrices still present after the percoll gradient. We have shown that the longer the culture time is, the more definitely the infectivity is detected on mussel matrices and the detection of infectivity is possible from 62h or 72h of cell culture for *D. polymorpha* or *M. edulis* respectively. These results were consistent with the observation at 72h compared to 48h of cell culture for *C. parvum* oocysts (Di Giovanni and Le Chevallier, 2005), which showed that the culture time is a very important parameter that must not be neglected. CC-qPCR on mussel matrices gave us a faster result compared to bioassays with a detection limit of less than 10 *T. gondii* oocysts on *M. edulis* and *D. polymorpha* in only 72h. By comparison, *in vivo*, the limit of detection on the *Mytella guyanensis* mussel was between 10 and 100 *T. gondii* oocysts and the result was obtained after eight weeks (Esmerini *et al.* 2010). However, the absence of linearity relation between the Cq obtained and the spiked oocysts quantity on the mussels makes it impossible to quantify infectious *T. gondii* oocysts by CC-qPCR and thus its use to study the industrial processes efficiency. This lack of quantification may be related to parasite / Vero cell ratio, which appears to be better for low parasite quantities (10 equivalents oocyst / 10^6 Vero cells). Thus, the CC-qPCR method in mussel matrix represents a good alternative to bioassays and seems particularly suitable for studying *T. gondii* oocysts infectivity on *M. edulis* and *D. polymorpha* in environmental monitoring with a result in 72 hours.

To conclude, considering that *in vivo* experiments are not realistic for risk assessment our laboratory developed a laboratory-accessible method based on Vero cells infection using sporocysts and qPCR detection, allowing the characterization of less than 5 and 10 infective oocysts in only 3 days for water and mussel matrix respectively. Our CC-qPCR in water from

A. ROUSSEAU

sporocyst stage appears relevant to assess the efficacy of inactivation treatment on *T. gondii* oocysts and to estimate water quality and human exposure to this pathogen in environmental samples.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

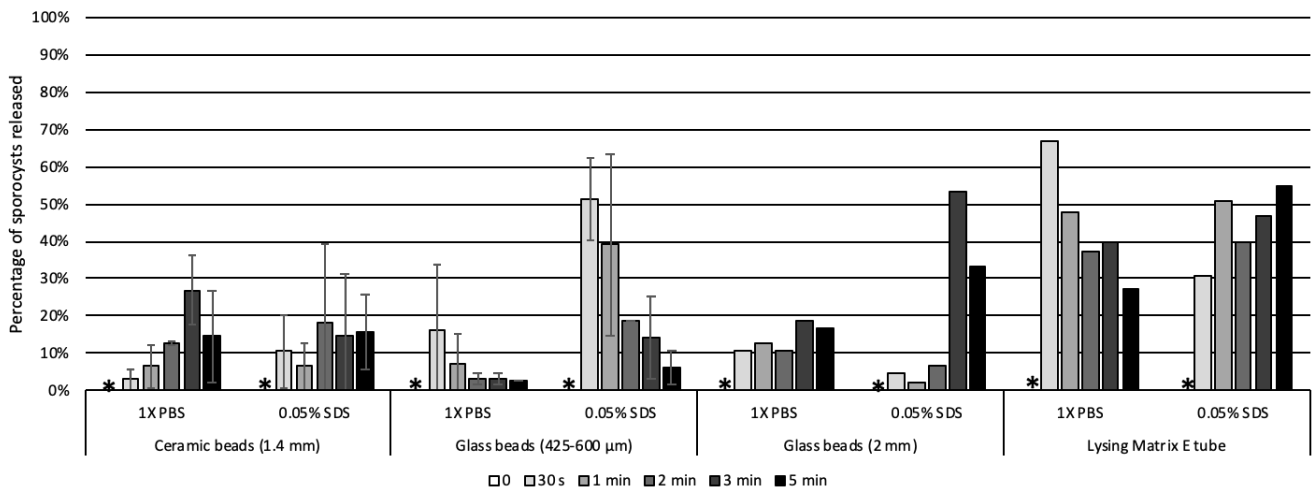


Fig. 1 Mechanical disruption of *T. gondii* oocysts released sporocysts by TissueLyser (33 Hz). Oocysts ($1 < n < 3$ independent experiments) were mixed with different types (ceramic, glass) and sizes of beads (1.4 mm in ceramic, 425-600 µm or 2 mm in glass, or using a Lysing Matrix E tube (MP Biomedicals) and submitted to TissueLyser agitation for 30 sec, 1 min, 2 min, 3 min or 5 min tested in TissueLyser (33Hz) to released sporocysts. * no observed sporocysts. The y axis indicates mean percentage of sporocysts released by microscopic count. When no standard deviation: n=1.

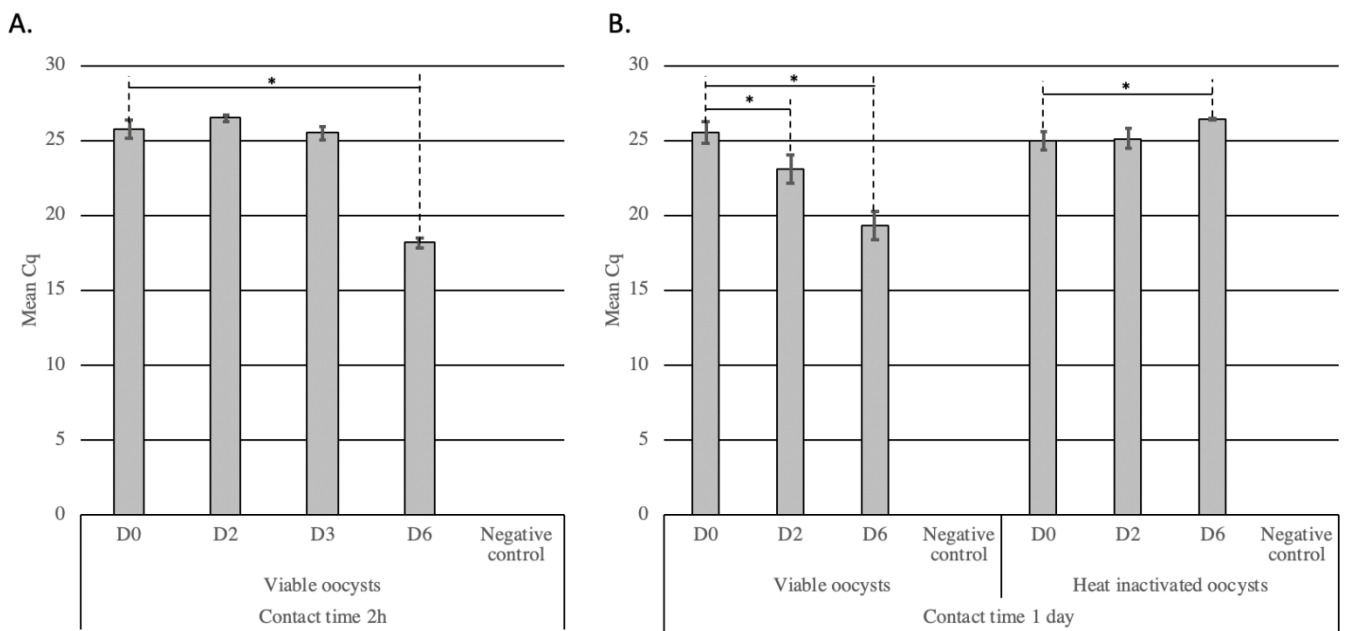


Fig. 2: Kinetic of cell infection by *T. gondii* sporocysts in simple matrix assessed by sporocyst-CC-qPCR assay. Following 2h (A) or 1 day (B) of contact between the sporocysts and Vero cells (contact time), the cells were cultivated for 2 to 6 days. Sporocysts were

obtained after TissueLyser shaking (30s, 33Hz) from viable and heat inactivated oocysts (5 min at 99°C). The y axis indicates mean qPCR signal (Cq) (n=2 independent experiments). Negative control corresponds to Vero cells without sporocysts. Asterisks show significant differences (p-value < 0.05).

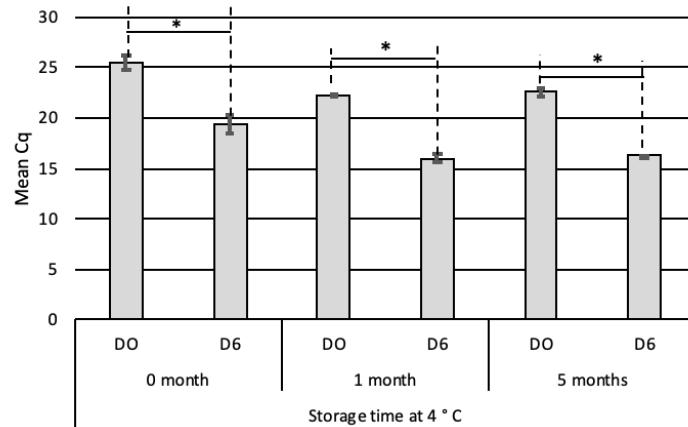


Fig. 3: Infectivity of *T. gondii* sporocysts after storage at 4°C assessed by sporocyst-CC-qPCR. After 1 day of contact between the sporocysts and Vero cells (contact time), the cells were cultivated for 6 days. Sporocysts were obtained after TissueLyser shaking (30s, 33Hz) from viable oocysts and stored 0, 1 or 5 months at 4°C. The y axis indicates mean qPCR signal (Cq) (2 < n < 9 independent experiments). Asterisks show significant differences (p-value < 0.05).

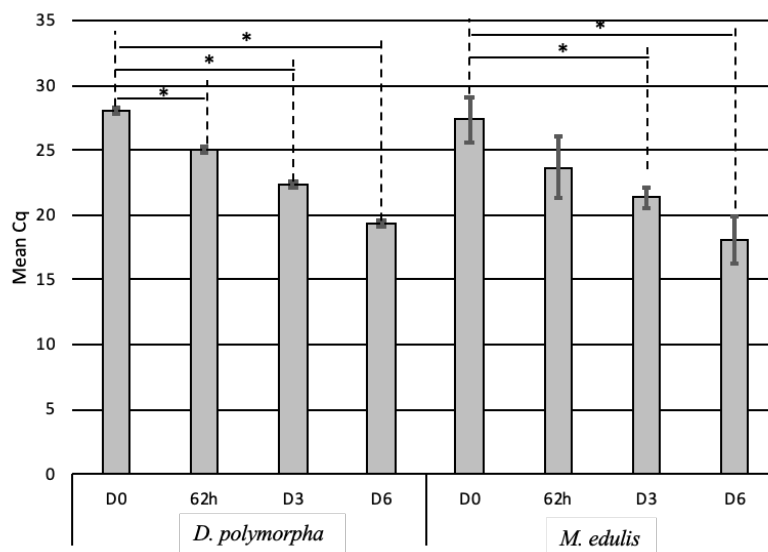


Fig. 4: Kinetic of cell infection by *T. gondii* sporocysts isolated from *D. polymorpha* and *M. edulis* assessed by sporocyst-CC-qPCR. Sporocysts were released from oocysts isolated

from mussels and following 3h of contact between the sporocysts and Vero cells (D0), the cells were cultivated for 62h, 3 (D3) or 6 days (D6). The y axis indicates mean qPCR signal (Cq) (n=3 independent experiments). Asterisks show significant differences in Cq (p-value <0.05).

Table I. Sensitivity of the *T. gondii* sporocyst-CC-qPCR assay to detect infective parasites in simple matrix. A serial dilution ranging 5 to 10 000 *T. gondii* oocysts was used to obtain sporocysts by mechanical grinding with TissueLyser (30s, 33Hz, Lysing Matrix E tube FastPrep). After centrifugation, the sporocyst pellet was resuspended in culture medium and then deposited on Vero cells (80% confluence) incubated at 37 ° C. qPCR specific to *T. gondii* was performed from the cell pellet DNA extract after a contact time between sporozoites and cells for 1 day (D0) and after culture of the cells for 2 days (D2) (n=3 independent experiments).

	Oocysts quantity	Mean Cq ± standard deviation	Positive well
D0	10 000	24.84 ± 0.04	3/3
	10 000	23.64 ± 0.31	3/3
D2	5 000	25.51 ± 1.51	3/3
	1 000	26.39 ± 1.06	3/3
	500	27.84 ± 0.30	3/3
	100	30.85 ± 0.80	3/3
	50	32.58 ± 0.62	3/3
	10	31.64 ± 0.93	3/3
	5	33.24 ± 1.95	3/3

Table II. Effects of heat treatments on the infectivity of *T. gondii* oocysts assessed by sporocyst-CC-qPCR and bioassay. n=3 independent experiments; ^a -, no detection of tachyzoites in Vero cell culture; +, detection of tachyzoites in Vero cell culture; ^b -, no seroconversion of mice; +, mice seroconversion.

Treatment	qCC-PCR ^a	Bioassay ^b
Untreated	+	+
5 min 99°C	-	-
2 min 80°C	-	-
2 min 60°C	-	-

Table III. Sensitivity of the *T. gondii* sporocyst-CC-qPCR assay to detect infective parasites in *D. polymorpha* and *M. edulis*. The oocyst pellet resulting from the tryptic digestion of the mussel matrix was washed and then purified by Percoll gradient 30%. The sporocysts were obtained by mechanical grinding with TissueLyser (30s, 33Hz). After centrifugation. The sporocyst pellet obtained was resuspended in culture medium and then deposited on Vero cells (80% confluence) incubated at 37 ° C. qPCR was performed from the parasite DNA extracted after a contact time between sporozoites and cells during 3h (D0) and after a culture of 3 days (D3) (n=3 independent experiments).

	Oocysts quantity	<i>D. polymorpha</i> Mean Cq ± Standard deviation	<i>M. edulis</i> Mean Cq ± Standard deviation
D0	10 000	25.73 ± 0.42	27.34 ± 1.73
D3	50 000	20.25 ± 0.36	18.13 ± 0.21
	10 000	21.83 ± 0.54	18.82 ± 0.41
	5 000	22.43 ± 0.55	19.00 ± 0.34
	1 000	23.85 ± 0.13	19.49 ± 0.64
	500	23.77 ± 0.44	20.15 ± 0.16
	100	24.42 ± 0.17	19.94 ± 0.69
	50	25.08 ± 1.23	19.72 ± 0.14
	10	24.10 ± 0.20	19.44 ± 0.36
Equation		y = -1.14x + 26.47	y = -0.28x + 24.21
R²		0.81	0.05

REFERENCES

AFSSA, 2005. Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation – Rapport du groupe de travail “*Toxoplasma gondii*”.

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 2 :128-135. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.012>

Arkush KD, Miller MA, Leutenegger CM, Gardner IA, Packham AE, Heckerroth AR, Tenter AM, Barr BC, Conrad PA, 2003. Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Int J Parasitol 33:1087-1097. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00181-4](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00181-4)

Aubert D, Villena I. 2009. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne Region, France. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 104: 290–295. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200023>

Ayres PA, Burton HW, Cullum ML. 1978. Sewage pollution and shellfish. In Techniques for the study of mixed populations. Society for applied bacteriology technical series Number 11 ed. Lovelock DM and Davies R. pp 51-62. London Academic Press.

Baldursson S, Karanis P. 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks _ An update 2004–2010. Water Research 45:6603–6614. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.013>

Belluco S, Mancin M, Conficoni D, Simonato G, Pietrobelli M, Ricci A. 2016. Investigating the determinants of *Toxoplasma gondii* prevalence in meat: a systematic review and meta-regression. PLoS One 11: e0153856. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153856>

Christie E, Pappas PW, Dubey JP. 1978. Ultrastructure of excystation of *Toxoplasma gondii* oocysts. J Parasitol 25 :438-443.

Condoleo R, Rinaldi L, Sette S, Mezher Z. 2018. Risk Assessment of human toxoplasmosis associated with the consumption of pork meat in Italy. Risk Analysis 38 :1202-1222. <https://doi.org/10.1111/risa.12934>

Daniels ME, Hogan J, Smith WA, Oates SC, Miler MA, hardin D, Shapiro K, Huertos ML, Conrad PA, Dominik C, Watson FGR. 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.053>

Di Giovanni, G.D., Lechevallier, M.W., 2005. Quantitative-PCR assessment of *Cryptosporidium parvum* cell culture infection. *Appl Environ Microbiol* 71 :1495–1500. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1495-1500.2005>

Dumètre A, Dardé ML. 2003. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? *FEMS Microbiol Rev* 27 :651–661. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00071-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00071-8)

Efstratiou A, Ongerth JE, Karanis P. 2017. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks _ An update 2011-2016. *Water Res* 144:14–22. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.036>

Ekman CC, Chiossi MF, Meireles LR, Andrade Júnior HF, Figueiredo WM, Marciano MA, Luna EJ. 2012. Case-control study of an outbreak of acute toxoplasmosis in an industrial plant in the state of São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 54:239–244.

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. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.036>

Everson WV, Ware MW, Dubey JP, Lindquist HD. 2002. Isolation of purified oocyst walls and sporocysts from *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol* 49:344-349.

Ferguson DJ, Birch-Andersen A, Siim JC, Hutchison WM. 1979. Ultrastructural studies on the sporulation of oocysts of *Toxoplasma gondii*. II. Formation of the sporocyst and structure of the sporocyst wall. *Acta Pathol Microbiol Scand B* 87B:183–190.

Ferguson DJ, Birch-Andersen A, Siim JC, Hutchison WM. 1982. Scanning electron microscopy of the oocyst and sporocyst of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B* 90:269–272.

Freyre A, Falcon J. 2004. Massive excystation of *Toxoplasma gondii* sporozoites. *Exp Parasitol* 107:72-77. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.03.014>

Fukushima H, Katsube K, Hata Y, Kishi R, Fujiwara S. 2007. Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell

counting and real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 73: 92-100.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01772-06>

Gallas-Lindemann C, Sotiriadou I, Mahmoodi MR, Karanis P. 2013. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in different water resources by Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Acta Tropica* 125: 231-236.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.10.007>

Garcés G, Effenberger M, Najdrowski M, Wackwitz C, Gronauer A, Wilderer PA, Leuhn M. 2006. Quantification of *Cryptosporidium parvum* in anaerobic digesters treating manure by (reverse-transcription) quantitative real-time PCR, infectivity and excystation tests. *Water Sci Technol* 53:195-202.

Giangaspero, A., R. Cirillo, V. Lacasella, A. Lonigro, M. Marangi, P. Cavallo, F. Berrilli, D. Di Cave, and O. Brandonisio. 2009. *Giardia* and *Cryptosporidium* in inflowing water and harvested shellfish in a lagoon in Southern Italy. *Parasitol Int* 58:12-17.
<https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.07.003>

Grabow WO, Taylor MB, de Villiers JC. 2001. New methods for the detection of viruses: call for review of drinking water quality guidelines. *Water Sci Technol* 43:1-8.

Graczyk TK, Conn DB, Lucy F, Minchin D, Tamang L, Moura LNS, daSilva AJ. 2004. Human waterborne parasites in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from the Shannon River drainage area, Ireland. *Parasitol Res* 93:385-391. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1142-4>

Graczyk TK, Conn DB, Marcogliese DJ, Graczyk H, De Lafontaine Y. 2003. Accumulation of human parasites by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*). *Parasitol Res* 89:107-112. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0729-x>

Grodzki M, Schaeffer J, Piquet J-C, Le Saux J-C, Chev e J, Ollivier J, Le Pendu J, Le Guyader FS. 2014. Bioaccumulation Efficiency, Tissue Distribution, and Environmental Occurrence of Hepatitis E Virus in Bivalve Shellfish from France. *Appl Environ Microbiol* 80:4269–4276.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00978-14>

Habtewold T, Groom Z, Duchateau L, Christophides GK. 2015. Detection of viable *Plasmodium* ookinetes in the midguts of *Anopheles coluzzi* using PMA-qrtPCR. *Parasites & Vectors* 8:455. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1087-8>

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 Protect* 9: 1488-1657. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.01.002>

Jenkins M, Trout J, Higgins J, Dorsch M, Veal D, Fayer R. 2003. Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Parasitol Res* 89:1–5. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0720-6>

Johnson AM, Di Giovanni GD, Rochelle PA. 2012. Comparison of assays for sensitive and reproducible detection of cell culture-infectious *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* in drinking water. *Appl Environ Microbiol* 78:156–162. <https://doi.org/10.1128/AEM.06444-11>

Johnson LL. 1992. SCID mouse models of acute and relapsing chronic *Toxoplasma gondii* infections. *Infect Immun* 60:3719–3724.

Jolley WR, Allen JV, Nyberg PA. 1979. Micropyle and oocyst wall changes associated with chemically mediated in vitro excystation of *Eimeria Stidal* and *Eimeria tenella*. *Int J Parasitol* 9:199-204.

Jones JL, Dubey JP. 2010. Waterborne toxoplasmosis-recent developments. *Exp Parasitol* 124:10–25. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.013>

Jones J, Parise M, Fiore A. 2014. Neglected Parasitic Infections in the United States: Toxoplasmosis. *Am J Trop Med Hyg* 90: 794–799. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0722>

Karanis P, Kourenti C, Smith H. 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health* 5:1-38.

Karanis K, Aldeyarbi HM, Mirhashemi EM, Khalil KM. 2013. The impact of the waterborne transmission of *Toxoplasma gondii* and analysis efforts for water detection: an overview and updat. *Environ Sci Pollut Res* 20 :86–99. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1177-5>

Karanis P, Kourenti C, Smith H. 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health* 5:1-38.

Kasper LH, Bradley MS, Pfefferkorn ER. 1984. Identification of stage-specific sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies. *J Immunol* 132:443-449.

Kerambrun E, Palos Ladeiro M, Bigot-Clivot A, Dedeourge-Geffard O, Dupuis E, Villena I, Aubert D, Geffard A. 2015. Zebra mussel as a new tool to show evidence of freshwater contamination by waterborne *Toxoplasma gondii*. *J Appl Microbiol* 120:498-508. <https://doi.org/10.1111/jam.12999>

Kniel KE, Lindsay DS, Sumner SS, Hackney CR, Pierson MD, Dubey JP. 2002. Examination of attachment and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts on raspberries and blueberries. *J Parasitol* 88:790-793. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0790:EOAASO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0790:EOAASO]2.0.CO;2)

Lass A, Pietkiewicz H, Szostakowska B, Myjak P. 2012. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 6:1101-8. doi: 10.1007/s10096-011-1414-8.

Lee HK, Jeong YS. 2004. Comparison of total culturable virus assay and multiplex integrated cell culture-PCR for reliability of waterborne virus detection. *Appl Environ Microbiol* 70:3632-3636. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3632-3636.2004>

Lélu M, Villena I, Dardé ML, Aubert D, Geers R, Dupuis E, Marnef F, Poulle ML, Gotteland C, Dumètre A, Gilot-Fromont E. 2012. Quantitative estimation of the viability of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil. *Appl Environ Microbiol* 78:5127-5132. <https://doi.org/10.1128/AEM.00246-12>

Lindsay DS, Current WL, Ernst JV. 1983. Excystation of *Isospora suis* Biester, 1934 of swine. *Fûr Parasitenkd* 69:27-34.

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 Eukaryot Microbiol Supp*:197S-198S.

Lindsay DS, Collins M, Mitchell S, Cole R, Flick G, Wetch C, Lindquist A, Dubey JP. 2003. Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in seawater. *J. Eukaryot Microbiol* 50:687–688.

Lindsay DS, Dubey JP. 2009. Long-term survival of *Toxoplasma gondii* sporulated oocysts in seawater. *J Parasitol* 95:1019-1020. <https://doi.org/10.1645/GE-1919.1>

Lindsay DS, Holliman D, Flick GJ, Goodwin DG, Mitchell SM, Dubey JP. 2008. Effects of high pressure processing on *Toxoplasma gondii* oocysts on raspberries. *J Parasitol* 94:757–758. <https://doi.org/10.1645/GE-1471.1>

Meireles LR, Ekman CC, Andrade HF, Luna EJ. 2015. Human toxoplasmosis outbreaks and the agent infecting form finding from a systematic review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 57:369-376. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000500001>

Najdrowski M, Joachim A, Dauschies A. 2007. An improved in vitro infection model for viability testing of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Vet Parasitol* 150 :150-154. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.09.005>

Palos Ladeiro M, Bigot A, Aubert D, Hohweyer J, Favennec F, Villena I, Geffard A. 2013. Protozoa interaction with aquatic invertebrate: interest for watercourses biomonitoring. *Environ Sci Pollut Res* 20:778–789. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1189-1>

Palos Ladeiro M, Aubert D, Villena I, Geffard A, Bigot A. 2014. Bioaccumulation of human waterborn protozoa by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): interest for water biomonitoring. *Water Res* 48:148-155. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.017>

Parr JB, Sevilleja JE, Samie A, Alcantara C, Stroup SE, Kohli A, Fayer R, Lima AA, Houpt ER, Guerrant RL. 2007. Detection and quantification of *Cryptosporidium* in HCT-8 cells and human fecal specimens using real-time polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 76:938-942.

Plutzer J, Karanis P. 2016. Neglected waterborne parasitic protozoa and their detection in water. *Water Res* 101:318-332. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.085>

Robertson, L.J., Gjerde, B., 2008. Development and use of a pepsin digestion method for analysis of shellfish for *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. *Journal of Food Protection*, 71, 959-966.

Rochelle PA, Marshall MM, Mead JR, Johnson AM, Korish DG, Rosen JS, De Leon R. 2002. Comparison of *in vitro* cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *Appl Environ Microbiol* 68 :3809–3817. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3809-3817.2002>

Roslev P, Bukh AS, Iversen L, Sonderbo H, Iversen N. 2010. Application of mussels as biosamples for characterization of faecal pollution in coastal recreational waters. *Water Sci Technol* 62 :586-593. <https://doi.org/10.2166/wst.2010.910>

Rousseau A, La Carbona S, Dumètre A, Robertson LJ, Gargala G, Escotte-Binet S, Favennec L, Villena I, Gérard C, Aubert D. 2018. Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne stages (cysts/oocysts) of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii*: a review of methods. *Parasite* 25: 14. <https://doi.org/10.1051/parasite/2018009>.

- Rousseau A, Villena I, Dumètre A, Escotte-Binet S, Favennec L, Dubey JP, Aubert D, La Carbona S. 2019. Evaluation of propidium monoazide-based qPCR to detect viable oocysts of *Toxoplasma gondii*. Parasitol Res. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06220-1>
- Shahiduzzaman M, Dyachenko V, Keidel J, Schmäsche R, Dauschies A. 2010. Combination of cell culture and quantitative PCR (cc-qPCR) to assess disinfectants efficacy on *Cryptosporidium* oocysts under standardized conditions. VetParasitol 167:43–49. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.042>
- Shapiro K, Van Wormer E, Aguilar B, Conrad PA. 2015. Surveillance for *Toxoplasma gondii* in California mussels (*Mytilus californianus*) reveals transmission of atypical genotypes from land to sea. Environ Microbiol 17:4177–4188. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12685>
- Shapiro K, Largier J, Mazet JAK, Bernt W, Ell JR, Melli AC, Conrad PA. 2009. Surface Properties of *Toxoplasma gondii* Oocysts and Surrogate Microspheres. Appl Environ Microbiol 75:1185–1191. <https://doi.org/10.1128/AEM.02109-08>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.04.031>
- Smith JJ, Gunasekera TS, Barardi CRM, Veal D, Vesey G. 2004. Determination of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability by fluorescence in situ hybridization using a ribosomal RNA-directed probe. J Appl Microbiol 96:409–417. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2004.02150.x>
- Speer CA, Clark S, Dubey JP. 1998. Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol 84:505–512.
- Staggs SE, Keely SP, Ware MW, Schable N, See MJ, Gregorio D, Zou X, Su C, Dubey JP, Villegas E. 2015. The development and implementation of a method using blue mussels (*Mytilus sp.*) as biosentinels of *Cryptosporidium spp.* and *Toxoplasma gondii* contamination in marine aquatic environments. Parasitol Res 114:4655–4667. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4711-9>
- Suresh P, Rehg JE. 1996. Comparative evaluation of several techniques for purification of *Cryptosporidium parvum* oocysts from rat feces. Journal of Clinical Microbiology, 34:38–40.
- Tedde T, Marangi M, Papini R, Salza S, Normanno G, Virgilio S, Giangaspero A. 2019. *Toxoplasma gondii* and Other Zoonotic Protozoans in Mediterranean Mussel (*Mytilus*

galloprovincialis) and Blue Mussel (*Mytilus edulis*): A Food Safety Concern? *J Food Prot* 27:535-542. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-157>

Travaillé E, La Carbona S, Gargala G, Aubert D, Guyot K, Dumètre A, Villena I, Houssin M. 2016. Development of a qRT-PCR method to assess the viability of *Giardia intestinalis* cysts, *Cryptosporidium* spp. and *Toxoplasma gondii* oocysts. *Food Control* 59:359–365. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.007>

USEPA, 2005. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA.

Villegas EN, Augustine SAJ, Villegas LF, Ware MW, See MJ, Lindquist HDA, Schaefer III FW, 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* 81:219–225. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.03.023>

Villena I, Aubert D, Gomis P, Ferté H, Ingland J-C., Denis-Bisiaux H, Dondon J-M., Pisano E, Ortis N, Pinon J-M. 2004. Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. *Appl Environ Microbiol* 70:4035–4039. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4035-4039.2004>

Wainwright KE, Lagunas-Solar M, Miller MA, Barr BC, Melli AC, Packham AE, Zeng N, Truong T, Conrad PA. 2010. Radiofrequency-induced thermal inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. *Zoonoses Public Health*, 57:74-81. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01280.x>

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 EnvironMicrobiol* 76:5140-5147. <https://doi.org/10.1128/AEM.00153-10>

Watts EA, Dhara A, Sinai AP. 2017. Purification *Toxoplasma gondii* tissue cysts using percoll gradients. *Curr Protoc Microbiol* 45: 20C.2.1-20C.2.19. <https://doi.org/10.1002/cpmc.30>

PARTIE 2.B. : C. PARVUM

Dans cette partie, nous avons mis en œuvre l'infection de cellules par des sporozoïtes, telle que déjà disponible au laboratoire (Brasseur *et al.*, 1998), pour caractériser l'infectiosité d'oocystes de *C. parvum*. Nous avons cependant testé un autre type cellulaire (HCT-8 au lieu de Caco-2), et couplé cette technique à une détection par qPCR plutôt qu'une détection par microscopie à épifluorescence. La limite de détection de cette approche a été établie en matrice simple (eau) puis la technique a été transférée sur matrices moules.

Matériels et méthodes

a) Oocystes non traités

Les suspensions d'oocystes de *C. parvum* (isolat Iowa) non traités sont identiques à celles décrites précédemment (cf. Partie 1.A.1.2. Section a).

b) Lignée cellulaire

La lignée cellulaire HCT-8 (ATCC No. CCL-244: American Type Culture Collection, Rockville, MD) a été utilisée pour étudier l'infectiosité des oocystes de *C. parvum*. Les cellules adhérentes sont maintenues en milieu de culture IMDM contenant du glutaMAX™ (ThermoFisher, USA) supplémenté par 5% (v/v) de sérum de veau foetal inactivé à 56°C pendant 30 minutes (Eurobio, France), 100 µg/ml de streptomycine (Gibco®) et 100 U/mL de pénicilline (Gibco®) dans des boîtes de culture cellulaire (T75 cm² ; VWR, Canada) dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ à 37 ° C. A partir de 80% de confluence (après 24h à 37°C), les cellules sont lavées avec du PBS 1X puis trypsinées pour décoller les cellules de la boîte de culture. Avant l'inoculation des parasites, environ 2.10⁵ cellules ont étéensemencées dans du milieu de culture en plaque 96 puits (matrice eau) ou 1.10⁶ cellules en plaque 24 puits (matrices mollusques) pendant 24h à 37°C.

c) Mollusques utilisés et élution/récupération des oocystes des mollusques

Les caractéristiques des moules, *M. edulis* et *D. polymorpha*, sont les mêmes que celles indiquées précédemment (cf. Partie 1.B. Section b).

La procédure mise en œuvre pour éluer et récupérer les oocystes à partir des moules est identique à celle mise en œuvre pour la détection par RT-qPCR, avec purification au gradient de Percoll (cf. Partie 1.B. Section c).

d) Obtention des sporozoïtes et infection des cellules HCT-8

Le dékystement des oocystes de *C. parvum* en matrice eau ou à partir du culot d'oocystes extrait de la matrice mollusque débute avec une incubation à 4°C pendant 10 min dans 200 µL d'hypochlorite de sodium 1,6%. Après centrifugation 5 min à 5 000g, chaque culot d'oocyste est resuspendu en milieu de culture IMDM contenant du glutaMAX™ (ThermoFisher, USA) et de l'acide taurocholique 1,5% (Sigma, St. Quentin Fallavier, France). La suspension est incubée pendant 1h30 à 37°C pour achever le dékystement (Brasseur *et al.*, 1998). Après centrifugation (5 min à 5 000g), le culot de sporozoïtes est resuspendu en milieu de culture IMDM contenant du glutaMAX™ (ThermoFisher, USA) additionné de 5% (v/v) de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (Eurobio, France), 100 µg / mL de streptomycine (Gibco®) et 100 µg / mL de pénicilline (Gibco®) puis déposé sur le tapis cellulaire. La culture ensemencée est ensuite incubée à 37°C. Après 2h d'incubation, le milieu de culture est remplacé (correspondant à l'étape de lavage) par un milieu de co-culture contenant 200 µL de milieu IMDM, 4 mg/L d'acide paraminobenzoïque (A9875, Sigma, St Louis, MO, USA), 35 mg/L d'acide ascorbique (A4544, Sigma), 25 mmol/L de glucose (Merck, Darmstadt, Allemagne), 100 UI/L d'insuline (Novo Nordisk Pharmaceutique, Boulogne-Billancourt, France), 15 mmol/L HEPES (83264, Sigma), 100 µg/mL de streptomycine (Gibco®) et 100 µg/mL de pénicilline (Gibco®) et 20% (v/v) de sérum de veau fœtal (Brasseur *et al.*, 1998). Des puits de culture sont arrêtés à T0, correspondant au témoin de culture, d'autres après 2h de contact entre sporozoïtes et cellules (T2h, temps de contact), tandis que pour les autres puits, la culture cellulaire est arrêtée après 24h de culture (matrice eau) ou 48h de culture (matrice mollusque) à 37°C.

e) Détermination des limites de détection (LD₉₅) de la CC-qPCR en matrices eau et moules

Pour la matrice eau, la limite de détection a été estimée grâce à une série de dilutions d'oocystes viables allant de 19 à 19 000. Dans le cas de la matrice mollusque, les moules ont été dopées par 10 à 50 000 oocystes. La limite de détection LD₉₅ correspond à la dernière dose pour laquelle 95% des échantillons positifs sont détectés.

f) Extraction d'ADN des sporozoïtes et qPCR

L'extraction d'ADN de sporozoïtes est réalisée à partir du culot cellulaire en utilisant le kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN, Courtaboeuf, France) selon le protocole décrit précédemment (cf. Partie 1.A.2 Section d), à T0, T2h, T24h ou T48h. L'ADN de *C. parvum* est détecté par qPCR selon le protocole d'amplification déjà indiqué (cf. Partie 1.A.1.2.

Section b). Une diminution de Cq entre T0 ou T2h et le temps d'arrêt de la culture met en évidence une multiplication parasitaire qui signe la viabilité des oocystes de *C. parvum*. Une différence de signal en qPCR est calculée ($\Delta Cq = Cq_{T0} - Cq_{\text{arrêt de culture}}$ ou $\Delta Cq = Cq_{T2h} - Cq_{\text{arrêt de culture}}$).

g) Analyses statistiques

Les valeurs de Cq et les valeurs de réduction du signal (ΔCq) ont été comparées en utilisant le test non paramétrique de Kruskal Wallis selon les conditions statistiques décrites précédemment (cf. Partie 1.A.2. Section e).

Résultats

a) Évaluation de l'infectiosité des oocystes de *C. parvum* par CC-qPCR en matrice simple

Le protocole d'infection de cellules Caco-2 pour étudier l'infectiosité *in vitro* d'oocystes de *C. parvum* a été proposé par le laboratoire (Brasseur *et al.*, en 1998). Nous avons testé ce protocole sur des cellules HCT-8 pour quantifier l'infectiosité des oocystes par qPCR. A l'aide d'une gamme d'oocystes de *C. parvum*, la limite de détection de cette méthode a été déterminée (**Tableau XVI**).

Tableau XVI : Détermination de la limite de détection d'oocystes de *C. parvum* infectieux par CC-qPCR (LD₉₅) en matrice eau.

Le dékystement des sporozoïtes est initié, à partir d'une gamme d'oocystes de *C. parvum* allant de 19 à 19 000, par une incubation dans de l'hypochlorite de sodium 1,6% pendant 10 min à 4°C suivi d'un traitement dans de l'acide taurocholique 1,5% pendant 1h30 à 37°C. Après centrifugation, le culot de sporozoïtes est resuspendu en milieu de culture puis déposé sur un tapis de cellules HCT-8 (confluence 80%). Une qPCR a été réalisée pour détecter *C. parvum* à partir de l'ADN extrait des cellules immédiatement après la mise en culture des sporozoïtes (T0), après un temps de contact entre les sporozoïtes et les cellules de 2h (étape de lavage) et après culture pendant 24h (uniquement pour toute la gamme). Chaque extrait d'ADN est testé en duplicat.

	Quantité d'oocystes	Cq moyen ± écart-type	Puits positif en qPCR
T0	19 000	36,31 ± 1,29	4/4
2h	19 000	35,28 ± 0,48	6/6
24h	19 000	33,65 ± 0,98	6/6
	1 900	33,65 ± 4,43	6/6
	190	36,93	1/6
	19	N/A	0/6

Pour 19 000 oocystes de *C. parvum*, aucune différence significative n'est observée entre les Cq obtenus à T0 et ceux obtenus après un temps de contact de 2h entre sporozoïtes et cellules (p-value > 0,05), ce qui indique que ces 2h ne sont pas suffisantes pour qu'il y ait multiplication parasitaire dans les cellules. En revanche, après 24h, les sporozoïtes ont pénétré

les cellules et se sont multipliés, comme en témoigne la diminution significative du Cq entre T0 et 24h ($\Delta Cq = 2,7$), qui traduit donc l'infectiosité des oocystes de *C. parvum*. La limite de détection à 95% (LD₉₅) de cette méthode est comprise entre 190 et 1 900 oocystes de *C. parvum*.

b) Évaluation de l'infectiosité des oocystes de *C. parvum* par CC-qPCR en matrice mollusque

Le protocole de CC-qPCR a été testé sur *M. edulis* et *D. polymorpha* dopées par 10 000 oocystes de *C. parvum*, après élution et purification des oocystes de la matrice. Les résultats sont présentés en **Figure 14**.

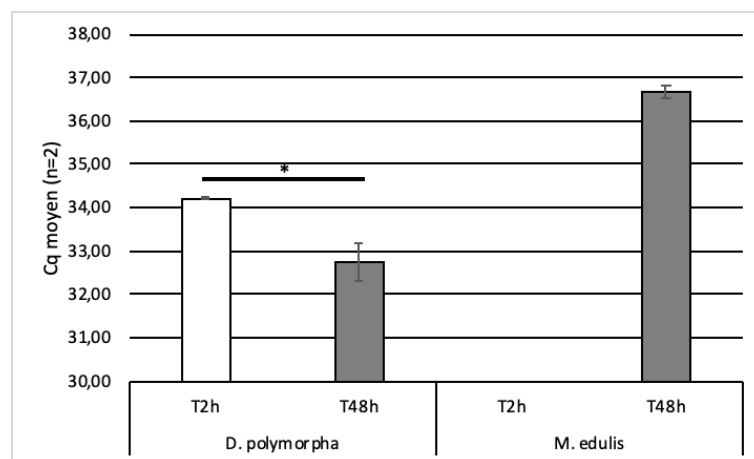


Figure 14: Etude de l'infectiosité de 10 000 oocystes de *C. parvum* chez *D. polymorpha* et *M. edulis* par CC-qPCR.

Les culots d'oocystes issus de la digestion trypsique de la matrice mollusque sont lavés puis purifiés par gradient de Percoll 30%. Le dékystement des sporozoïtes est initié par une incubation dans de l'hypochlorite de sodium 1,6% pendant 10 min à 4°C suivi d'un traitement dans de l'acide taurocholique 1,5% pendant 1h30 à 37°C. Après centrifugation, le culot de sporozoïtes est resuspendu en milieu de culture puis déposé sur un tapis de cellules HCT-8 (confluence 80%). Une qPCR a été réalisée pour détecter *C. parvum* à partir de l'ADN extrait des cellules après un temps de contact entre les sporozoïtes et les cellules de 2h (T2h) et après une culture de 48h (T48h). Chaque extrait d'ADN est testé en duplicat. Les astérisques montrent des différences significatives (p-value < 0,05).

Entre T2h et T48h de culture, une différence significative de Cq est observée pour *D. polymorpha* ($\Delta Cq = 1,5$; $p\text{-value} < 0,05$). Pour *M. edulis* après 48h de culture, un Cq tardif est détecté ($36,65 \pm 0,14$). Ce résultat suggère qu'à T2h après le lavage, le signal n'est pas détectable car il est en-dessous de la limite de détection en qPCR ($Cq > 40$). En l'état, le protocole de CC-qPCR pourrait être appliqué à l'étude de l'efficacité d'inactivation de procédés industriels en utilisant des doses de parasites initiales élevées ($> 10\ 000$). En revanche, ce protocole nécessiterait une optimisation pour diminuer le signal en qPCR et espérer étudier l'infectiosité des oocystes de *C. parvum* à partir de *M. edulis* et *D. polymorpha* en surveillance environnementale.

La CC-qPCR, comme méthode alternative aux bioessais pour étudier l'infectiosité des oocystes de C. parvum : Conclusions/discussion

La comparaison de plusieurs types cellulaires (HCT-8, Caco-2 et MDCK) a montré que les cellules HCT-8 représentaient le modèle de choix pour évaluer l'infectiosité des oocystes de *C. parvum* car une meilleure corrélation avec les modèles de souris BALB/c et CD-1 (Rochelle *et al.*, 2002 ; Slifko *et al.*, 2002). Nous avons donc testé le protocole de culture cellulaire initialement développé au laboratoire sur cellules Caco-2 (Brasseur *et al.*, 1998), sur des cellules HCT-8. La limite de détection de la CC-qPCR est comprise entre 190 et 1 900 oocystes de *C. parvum* en matrice eau. Ces valeurs sont supérieures à celles obtenues par Di Giovanni et Le Chevallier (2005) en CC-qPCR sur le même type cellulaire (5 à 25 oocystes). Cependant, cette différence pourrait être expliquée par un traitement de dékystement différent (HBSS pH2-Trypsin 1% incubé pendant 1h à 37°C avec 10s de vortex toutes les 15 min). De nombreuses études ont utilisé 48 heures post-infection comme critère d'évaluation de l'infection (Keegan *et al.*, 2003 ; Rochelle *et al.*, 2002 ; Slifko *et al.*, 1999). D'après Di Giovanni et Le Chevallier (2005), 48 heures de culture ne représentent que 60% de l'infection pouvant être obtenue après 72 heures de culture. Par conséquent, le temps de culture peut avoir un effet sur la capacité à détecter une infection, en particulier pour un très faible nombre d'oocystes infectieux. Cette période de 72h de culture a d'ailleurs été utilisée dans une application de la culture cellulaire couplée à la-PCR conventionnelle pour détecter des oocystes infectieux dans des échantillons environnementaux, contenant probablement un faible nombre d'oocystes (Le Chevallier *et al.*, 2003). L'importante variabilité biologique observée dans nos essais de CC-qPCR ne permet pas de quantifier le nombre exact d'oocystes infectieux présents initialement. Seule une détection qualitative (présence / absence d'infection) est possible comme cela a été précédemment décrit (Di Giovanni et Le

Chevallier, 2005). Cette variabilité peut être liée au nombre réel d’ocystes inoculés, au taux de dékystement, au ratio parasite/cellules HCT-8, mais aussi au fait que tous les ocystes ne sont pas forcément infectieux.

La détection de l’infectiosité des ocystes de *C. parvum* dopés sur matrice mollusque a été démontrée après 48h de culture cellulaire. Nos résultats sont cohérents avec ceux de Suresh et Rehg (1996) qui ont montré que 97% des ocystes de *C. parvum* purifiés par gradient de Percoll conservent leur antigénicité et leur pouvoir infectieux sur des cellules HCT-8 et en essais *in vivo*. Ces derniers ont aussi montré que le pourcentage d’ocystes perdus est plus élevé avec le gradient de Percoll ce qui pourrait peut-être expliquer l’obtention d’un signal tardif en qPCR. Ainsi sans optimisation, le protocole de CC-qPCR peut être utilisé pour déterminer si un procédé industriel induit une inactivation des ocystes dans la matrice, à condition d’utiliser de fortes doses de parasites. En revanche, ce protocole nécessite une optimisation pour une application dans le cadre de surveillance environnementale, quelle que soit la matrice. L’amélioration du rendement de dékystement des ocystes représente une des pistes principales à explorer. A l’heure actuelle, le modèle *in vivo* reste la méthode la plus robuste pour déterminer l’infectiosité d’ocystes présents à de faibles concentrations dans des matrices aussi complexes que les coquillages, y compris les moules (Fayer *et al.*, 1999 ; Li *et al.*, 2006 ; Esmerini *et al.*, 2010).

CONCLUSION PARTIE 2

Les travaux réalisés dans cette seconde partie ont consisté à mettre en place une méthode permettant d'établir le caractère infectieux des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum*, d'abord en matrice simple (eau) puis en matrice complexe (moules). Une approche basée sur l'infection de cellules par les parasites, couplée à la qPCR pour mettre en évidence la multiplication parasitaire a été privilégiée. Ces techniques sont cependant spécifiques de chacun des parasites compte-tenu notamment des divergences suivantes : (i) dékystement mécanique pour *T. gondii* et chimique pour *C. parvum*, (ii) cellules HCT-8 pour *C. parvum* et Vero pour *T. gondii*, (iii) temps de culture de 24h pour *C. parvum* et deux jours pour *T. gondii*. Globalement, le résultat d'infectiosité pour *C. parvum* est obtenu en 26h et en trois jours pour *T. gondii*.

En conséquence, dans le cadre d'une analyse d'un échantillon environnemental (eau ou moules), ce type d'approche nécessite, soit d'avoir une idée à priori du contaminant recherché, soit de diviser la prise d'essai pour pouvoir tester la présence des deux parasites et diminuant par conséquent la probabilité de détection.

La CC-qPCR développée dans notre étude pour détecter l'infectiosité des oocystes de *T. gondii* s'avère particulièrement intéressante pour une application en biosurveillance ou pour évaluer l'efficacité des procédés industriels, car elle permet de mettre en évidence rapidement de faibles doses de parasites infectieux, à la fois en matrice eau ($LD_{100} < 5$ oocystes) et mollusque ($LD_{100} < 10$ oocystes). Cette méthode présente des performances bien supérieures à celles obtenues en RT-qPCR (Partie 1.B) et permet également d'atteindre un niveau d'information supérieur en caractérisant le potentiel infectieux et non uniquement la viabilité. Cet outil constitue donc une réelle innovation, alternative aux modèles animaux, et ouvre des perspectives intéressantes dans le domaine de l'évaluation de l'exposition de l'homme aux oocystes de *T. gondii* dans l'environnement et les aliments. Des essais complémentaires devront cependant être menés pour évaluer la faisabilité de la technique sur d'autres matrices alimentaires telles que les légumes à feuilles vertes et les fruits rouges à baie qui représentent des matrices à risque.

Pour *C. parvum*, la CC-qPCR proposée à l'heure actuelle pour détecter des oocystes infectieux demeure moins robuste que l'utilisation de l'*in vivo* en matrice simple et dans les moules, en raison notamment d'une limite de détection élevée ($190 < LD_{95} < 1\ 900$ oocystes en

matrice eau). Cependant, sur matrice moules, cette approche peut présenter un intérêt, notamment par rapport à l'utilisation de la RT-qPCR (Partie 1.B.).

Etant donné que la CC-qPCR s'avère plus pertinente que la RT-qPCR pour les deux parasites et qu'elle permet de mettre en évidence des oocystes infectieux, cette approche a été utilisée pour étudier la survie des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum* chez les moules, au cours de la bioaccumulation et de la dépuration (Partie III).

**PARTIE 3 : EVALUATION DE LA SURVIE DES
OOCYSTES DE *T. GONDII* ET DE *C. PARVUM* EN
MATRICE MOLLUSQUE**

Introduction

Les oocystes de *Toxoplasma gondii* et *Cryptosporidium parvum* ont été reconnus comme des parasites majeurs impliqués dans des épidémies d'origine hydrique et alimentaire. Outre les eaux d'irrigation contaminées, des oocystes ont été détectés dans plusieurs écosystèmes aquatiques (Villena *et al.*, 2004 ; Giangaspero *et al.*, 2005 ; Aubert et Villena, 2009 ; Castro-Hermida *et al.*, 2010; Gallas-Lindemann *et al.*, 2013). Par exemple, dans l'eau potable, les oocystes de *T. gondii* ont été trouvés dans 27,2% des échantillons en Pologne (Sroka *et al.*, 2006) et les oocystes de *C. parvum* dans 10,2% à 53% des échantillons provenant du Portugal (Almeida *et al.*, 2010), d'Espagne (Castro-Hermida *et al.*, 2010) ou du Luxembourg (Helmi *et al.*, 2011). Des études de l'équipe (Hohweyer *et al.*, 2013 ; Palos-ladeiro *et al.*, 2014) ont montré l'intérêt d'utiliser les bivalves comme bioindicateurs de la présence de protozoaires dans l'environnement aquatique. Leurs principaux atouts reposent sur leur capacité à filtrer de grands volumes d'eau et à accumuler des contaminants chimiques ou biologiques (Binelli *et al.*, 2015). C'est notamment le cas de la moule bleue marine (*Mytilus edulis*), une espèce consommable, et de la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*), une espèce invasive d'eau douce qui résiste à de nombreux contaminants (De Lafontaine *et al.*, 2000).

La détection des protozoaires dans les tissus des bivalves repose essentiellement sur des méthodes moléculaires, telles que la PCR. Cependant, ces méthodes ne permettent pas d'avoir une information sur la viabilité des parasites. La FISH est l'une des méthodes les plus souvent utilisées pour étudier la viabilité des parasites en matrice mollusque. Mais cette méthode d'estimation de la viabilité conduit à une surestimation du risque car tous les parasites viables ne sont pas nécessairement infectieux. De nombreux auteurs ont utilisé des modèles animaux pour évaluer l'infectiosité des oocystes de *C. parvum* chez *M. edulis* (Li *et al.*, 2006), chez *Cerastoderma edule*, *Ostrea edulis* et *M. galloprovincialis* (Gomez-Couso *et al.*, 2003 ; Gomez-Bautista *et al.*, 2000) et les oocystes de *T. gondii* chez *Crassostrea rhizophorae* (Esmerini *et al.*, 2010) ou dans l'eau (Villena *et al.*, 2004 ; Issac-Renton *et al.*, 1998). Cependant, ces essais biologiques sont longs, coûteux et soulèvent des problèmes éthiques. En outre, ils ne fournissent qu'une évaluation qualitative de la viabilité/infectiosité, utile en biosurveillance mais peu adaptée à l'évaluation des process en industrie agroalimentaire. Il est donc essentiel de développer des méthodes complémentaires, faciles à mettre en œuvre en laboratoire et accessibles aux industries agro-alimentaires ou aux organismes impliqués dans la biosurveillance, pour évaluer l'exposition à ces parasites infectieux en milieu alimentaire et aquatique (Rousseau *et al.*, 2018). Des avancées

significatives ont été réalisés en ce sens dans le cadre de cette thèse, avec le développement d'une approche basée sur la CC-qPCR, applicable à la matrice moule pour évaluer le caractère infectieux des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum* (cf. Partie 2).

Le but de cette étude a été d'appliquer les techniques de CC-qPCR développées au cours de la thèse pour évaluer la survie de *T. gondii* et *C. parvum* au cours de la bioaccumulation par des moules (*M. edulis* et *D. polymorpha*), puis de la dépuration. Pour ce faire, les moules ont été exposées à deux doses de parasites dans l'eau (1 000 et 10 000 oocystes/jour/bivalve) et échantillonnées après sept jours d'accumulation et sept jours de dépuration.

Matériels et méthodes

a) Les parasites utilisés

Les oocystes de *C. parvum* (isolat Iowa) viables sont fournis par Waterborne™ Inc (cf. Partie 1.A.1.2. Section a). Pour les oocystes de *T. gondii* fournis par J.P. Dubey (USDA, Beltsville, Etats-Unis), une souche ME49 de génotype II (87 % d'oocystes sporulés) a été utilisée. Les conditions de conservation, lavage et dénombrement de la suspension d'oocystes sont décrits précédemment (Rousseau *et al.*, 2019, cf. Partie 1A.1.1).

Les pourcentages de viabilité de chaque suspension d'oocystes ont été déterminés par RT-qPCR (Rousseau *et al.*, 2019, cf. Partie 1.A.1.1) et sont estimés à 73 % pour *T. gondii* et 96 % pour *C. parvum*.

b) Les mollusques utilisés

Pour les essais de bioaccumulation et dépuration en aquarium, une collecte de dreissènes a été réalisée à environ 5 mètres de profondeur dans le Lac-du-Der-Chantecoq (Marne, France) en Mars 2018. Au laboratoire, les dreissènes ont été conservées un jour à 4°C à l'obscurité dans des réservoirs aérés contenant 50% d'eau de lac et 50% d'eau de source Cristalline® (Aurèle, France). Seules les moules mesurant 2,2±0,3 cm ont été acclimatées pendant deux semaines dans de l'eau Cristalline® aérée à 11±1°C à l'obscurité. Les dreissènes sont nourries deux fois par semaine avec 2.10⁶ de microalgues, de *Chlorella pyrenoidosa* et de *Scenedesmus obliquus*, par dreissène.

Les moules bleues (4-5 cm de longueur de coquille) ont été collectées sur la côte rocheuse intertidale d'Yport (Seine-Maritime, France) en Mars 2018. Elles ont été placées

dans un aquarium d'eau de mer (33 mg/L) reconstituée, avec un mélange de sels (Tetra marine sea salt, ZooMalia) dans de l'eau physiologique, pendant deux semaines à température contrôlée ($11\pm 1^\circ\text{C}$) à l'obscurité. Les moules bleues sont nourries deux fois par semaine avec 4.10^6 par algues de *Isochrysis galbana* par mollusque.

c) Conditions d'exposition

Les moules sont réparties au hasard dans deux aquariums distincts contenant 95 dreissènes ou 80 moules bleues. Les moules bleues sont placées dans des aquariums contenant 12 L d'eau de mer reconstituée (33 mg/L) et les dreissènes dans des aquariums contenant 4,5 L d'eau de source (Cristaline®, Aurèle, France) (pour tenir compte des capacités journalière de filtration des deux espèces). Les mollusques sont ensuite exposés à 1 000 ou 10 000 parasites/mollusque/jour pendant sept jours, puis sont transférés dans de nouveaux aquariums remplis d'eau exempts de parasites pendant sept jours à $11\pm 1^\circ\text{C}$ pour subir l'étape de dépuration. Les mollusques sont échantillonnés à T0, après 7 jours d'exposition (7d) et après 7 jours de dépuration (14d).

Le volume d'eau des aquariums a été ajusté proportionnellement au nombre de moules pendant l'exposition. Pour s'assurer que les conditions d'expositions dans les aquariums n'altèrent pas la viabilité et l'infectiosité des parasites, 1 000 ou 10 000 de chaque protozoaire sont déposés dans un tube de 1,5 mL fermé contenant de l'eau de mer ou d'eau douce, puis ces tubes sont placés dans les aquariums afin d'être exposés aux mêmes conditions expérimentales ($11 \pm 1^\circ\text{C}$ dans l'obscurité).

Pour caractériser la bioaccumulation (par qPCR) et l'infectiosité en modèle animal, trois dreissènes et trois moules bleues sont échantillonnées de manière aléatoire pour chaque méthode et par condition expérimentale. Pour étudier de l'infectiosité des oocystes par CC-qPCR, six dreissènes et six moules bleues sont prélevées aléatoirement (trois individus testés immédiatement et trois aux temps d'arrêt de culture cellulaire). Des contrôles positifs d'extraction de parasites des matrices mollusques sont réalisés en dopant des mollusques (N = 5) avec 1 000 ou 10 000 oocystes de *T. gondii* ou *C. parvum*.

d) Elution/récupération des oocystes des matrices mollusques

L'élution des oocystes de la matrice mollusque est réalisée *via* une digestion trypsique des tissus (sans hypochlorite de sodium) comme indiqué précédemment (cf. Partie 1.B section c). Le culot obtenu est directement être utilisé pour l'extraction d'ARN ou soumis à une étape de purification des parasites par gradient de Percoll (cf. Partie 1.B section c).

e) Mesure de la bioaccumulation par qPCR

L'ADN est extrait à l'aide du kit pour sol FastDNA® SPIN (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France) selon les instructions du fournisseur puis amplifié par qPCR dans un thermocycleur CFX96 TOUCH™ (Bio-Rad, USA) dans les mêmes conditions que précédemment décrites pour *T. gondii* (Rousseau *et al.*, 2019) et *C. parvum* (cf. Partie 1.A.1.2. Section b).

Tableau XVII : Cibles de qPCR pour *T. gondii*.

Organisme	Région ciblée	Séquences des amorces	Séquence des sondes	Taille amplicon	Références
<i>T. gondii</i>	RE (AF487550)	TOXO-F : 5'-AGA GAC ACC GGA ATG CGA TCT -3' TOXO-R : 5'-CCC TCT TCT CCA CTC TTC AAT TCT -3'	TOXO-P : HEX-5'ACG CTT TCC TCG TGG TGA TGG CG-BHQ2-3'	81 pb	Lélu <i>et al.</i> , 2012

Pour déterminer le nombre d'équivalents parasites dans chaque échantillon, une courbe de référence a été établie à partir d'ADN extrait de tissu de moule inoculé (1 moule/inoculum) avec une quantité connue d'oocystes (dilution en série au 1/10^{ème} allant de 1 à 10 000 oocystes). La droite $Cq = f(\log_{10} \text{équivalent oocyste} / \text{réaction})$ peut ainsi être tracée. Les résultats de la qPCR sont rapportés sur la courbe de référence pour déterminer les quantités d'oocystes dans chaque échantillon. La valeur de Cq correspond au premier cycle pour lequel la fluorescence dépasse un seuil fixé et permet de quantifier l'ADN cible. Pour s'affranchir de la présence éventuelle d'inhibiteurs, chaque échantillon a été analysé en duplicat à la concentration pure et dilué au 1/10^{ème}. Les Cq indiqués correspondent aux Cq des échantillons purs extrapolés à partir de la valeur de Cq obtenue au 1/10^{ème}, avec $Cq_{1/10^{\text{ème}}} - Cq_{\text{pur}} = 3,3$ pour un facteur de dilution égal à 10 et une efficacité de PCR optimale égale à 2 ($\log_2(10)$).

f) CC-qPCR

L'entretien des lignés cellulaires, le dékystement des parasites à partir d'oocystes récupérés des mollusques et leurs mises en culture ont été réalisés comme décrits précédemment pour *T. gondii* (cf. Partie 2A, Rousseau *et al.*, en préparation) et pour *C. parvum* (cf. Partie 2B sections b à d). Des puits de culture sont arrêtés après 2h ou 3h de contact (T0) entre parasites et cellules pour *C. parvum* et *T. gondii* respectivement, tandis que pour les autres puits, la culture cellulaire de *T. gondii* est arrêtée après trois jours de culture (*D. polymorpha*) ou cinq jours de culture (*M. edulis*) à 37°C, et après deux jours pour *C. parvum* (*D. polymorpha* et *M. edulis*).

Les protocoles d'extraction d'ADN des sporozoïtes et de qPCR sont décrits précédemment pour *T. gondii* (cf. Partie 2A, Rousseau *et al.*, en préparation) et *C. parvum* (cf. Partie 2B Section f).

g) *In vivo*

Toutes les expériences impliquant des animaux sont supervisées par le comité d'éthique local, conformément à la réglementation du ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

- *T. gondii*

Comme décrit par Villena *et al.*, 2004, les oocystes de *T. gondii* sont inoculés chez des souris Swiss Webster femelles (Laboratoire Charles River, Neuilly-sur-Seine, France) pesant de 20 à 30 g. Le culot d'oocystes est remis en suspension dans 900 µL d'eau physiologique et 100 µL de pénicilline 10⁵ U / L, de streptomycine 10⁵ µg / mL et d'amoxicilline à 0,1 g / mL. Chaque échantillon de mollusque prélevé (pur ou dilué au 1/10^{ème}, 1/100^{ème} et 1/1000^{ème}). Des souris non infectées (témoins) sont inoculées avec 1 mL de PBS sans oocyste. Chaque souris est inoculée par voie intrapéritonéale afin de pouvoir contrôler la dose d'inoculation. Les souris sont nourries puis hébergées dans des cages avec des granules et de l'eau à volonté. Les souris sont testées pour la présence d'anticorps antitoxoplasmiques par le test d'agglutination modifiée (MAT) quatre semaines *après l'inoculation*. Pour déterminer la quantité d'oocystes infectieux, les résultats d'inoculation sont rapportés à la gamme de dilution standardisée.

- *C. parvum*

Pour évaluer l'infectiosité des oocystes de *C. parvum*, des souris MNRI âgées de cinq jours (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) sont utilisées. Chaque culot d'oocystes est remis en suspension dans 600 µL de PBS et six souris allaitantes sont gavées oralement par 100 µL

comme décrit précédemment (Delaunay *et al.*, 2000). Pour déterminer la quantité d'oocystes infectieux, les résultats d'inoculation ont été rapportés à une gamme de dilution standardisée allant de 10 à 1 000 oocystes dans 100 µl de PBS. Des souris non infectées (témoins) sont gavées avec 100 µl de PBS sans oocystes. Sept jours après l'inoculation, des souriceaux nouveau-nés sont euthanasiés. Tout l'intestin grêle est prélevé, ouvert longitudinalement, coupé en petits morceaux et homogénéisé individuellement pendant 30 secondes dans 1,5 mL d'eau déionisée. Deux cents microlitres d'échantillon sont analysés par cytométrie en flux par immunofluorescence.

Des échantillons (homogénats intestinaux ou oocystes purifiés utilisés comme contrôle) sont incubés pendant 30 min à 37 ° C avec une dilution finale au 1/20^{ème} de l'anticorps monoclonal conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) dirigé contre un antigène de la paroi de *Cryptosporidium* spp. (Crypt-a-Glo, Waterborne Inc., Nouvelle-Orléans, Louisiane, États-Unis). L'analyse par cytométrie en flux par immunofluorescence est réalisée à l'aide du cytomètre en flux LSR FORTESSA (systèmes d'immunocytométrie Becton Dickinson (BDIS), San José, CA, USA). La détection par cytométrie en flux des oocystes de *C. parvum* est réalisée à l'aide des paramètres suivants : (1) détecteur de dispersion de la lumière à angle direct (FSC): E00, (2) détecteur de dispersion de la lumière à angle latéral (SSC): 304 V, (3) détecteur de fluorescence verte (Filtre passe long de 670 nm): 505 V. Les comptages d'oocystes absolus sont réalisés à l'aide de billes fluorescentes uniformes calibrées en ce qui concerne la granularité et l'intensité de fluorescence (Fluorosphères/Flow-countTM; Beckman Coulter, Fullerton, Californie, USA).

h) Analyses statistiques

Le logiciel R (version 3.4.2) avec RStudio est utilisé pour dessiner les graphiques avec le paquet «ggplot2». Aucune analyse statistique n'a été réalisée en raison d'un nombre insuffisant de répliquats biologiques (trois répliquats biologiques avec un duplicat pour chacun).

Résultats

Dans l'essai en aquarium avec *M. edulis* exposée à 10 000 de chaque parasite, une mortalité importante a été observée. Par conséquent, seuls les tests *in vivo* ont pu être réalisés pour évaluer le caractère infectieux des oocystes. Aucune différence n'a été observée pour les aquariums en réplicat.

a) Bioaccumulation et persistance des parasites

L'étude de la bioaccumulation par qPCR permet de s'assurer que les oocystes se sont accumulés dans les tissus des deux espèces de mollusques (*D. polymorpha* et *M. edulis*). Les résultats sont présentés en **Figure 15**.

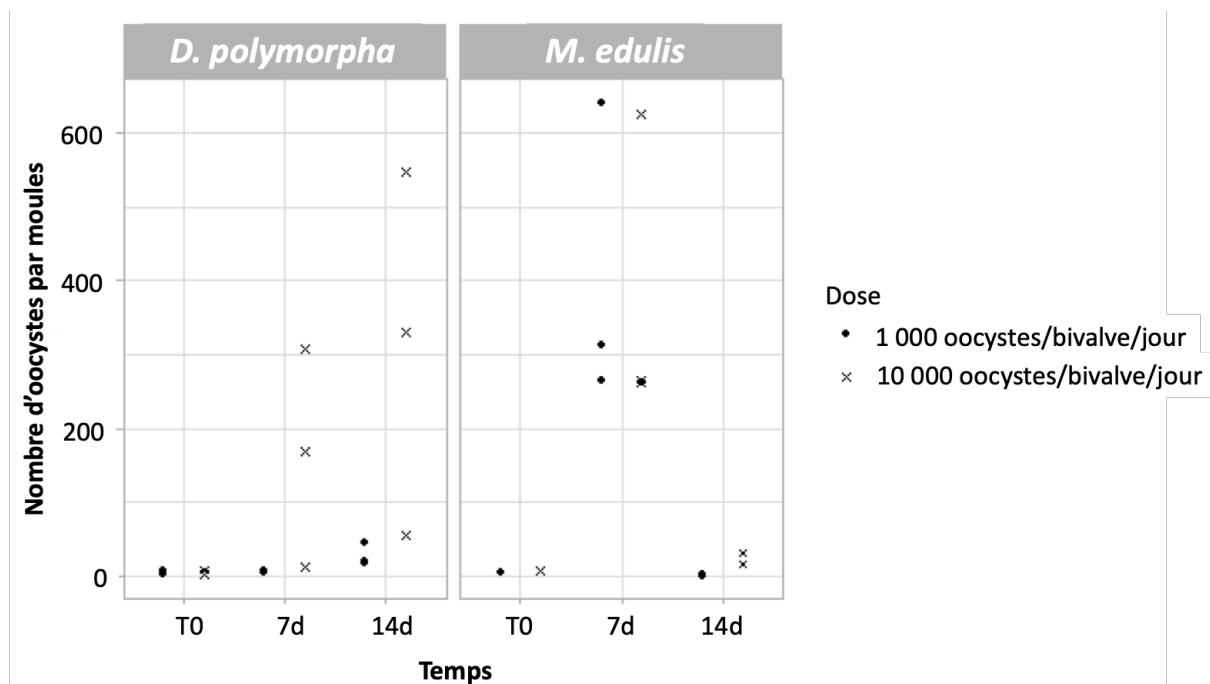


Figure 15 : Suivi de la bioaccumulation et de la persistance des oocystes de *T. gondii* chez *D. polymorpha* et *M. edulis*.

Le diagramme de dispersion représente le nombre d'oocystes par moule pour chaque dose (1 000 et 10 000 oocystes/mollusque/jour) à différents temps : T0 (avant exposition), bioaccumulation (7d) et dépuración (14d) (n = 3).

A T0, aucun mollusque (n = 12) n'est contaminé par des oocystes de *T. gondii*. Dès sept jours de bioaccumulation, des oocystes de *T. gondii* sont détectés dans les tissus de *D.*

polymorpha et de *M. edulis* pour chaque condition expérimentale (**Figure 15**). Pour les dreissènes, les résultats montrent une accumulation dose-dépendante avec 1-6 oocystes/dreissène à 1 000 oocystes/dreissène/jour et 14-330 oocystes/dreissène à 10 000 oocystes/mollusque/jour (**Figure 15, 7d**). Même après sept jours de dépuración, des oocystes sont encore détectés avec 13 à 40 oocystes/dreissène pour 1 000 parasites/dreissène/jour et 50-913 oocystes/dreissène pour 10 000 oocystes/mollusque/jour (**Figure 15, 14d**). Il n'y a donc aucun effet de la dépuración sur les dreissènes. Pour *M. edulis*, la bioaccumulation d'oocystes de *T. gondii* est également dépendante de la dose, allant de 53 à 98 oocystes/mollusque pour la dose la plus faible et de 52 à 939 oocystes/moule bleue pour la dose la plus élevée (**Figure 15, 14d**). La dépuración semble être plus efficace chez *M. edulis* puisque seulement 1 oocyste/moule bleue et 3 à 6 oocystes/moule bleue sont détectés respectivement pour 1 000 et 10 000 oocystes/moule bleue/jour. Ces résultats démontrent que les oocystes de *T. gondii* peuvent être accumulés par les moules bleues et les dreissènes, et persister dans leurs tissus jusque 7 jours après le début de la dépuración. La moule bleue semble être capable d'éliminer plus efficacement les oocystes.

Aucun oocyste de *C. parvum* n'a été détecté dans les deux moules indiquant que, si il y a eu bioaccumulation, la quantité d'oocystes est inférieure à la limite de détection (LD₉₅) estimée entre 50 et 100 oocystes pour *M. edulis* et *D. polymorpha*.

b) Survie des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum* évaluée par CC-qPCR

Après avoir vérifié que les oocystes de *C. parvum* et de *T. gondii* en suspension dans de l'eau de mer ou de l'eau douce conservaient leur potentiel infectieux dans les conditions d'exposition et de dépuración des moules, nous avons étudié l'infectiosité de ces derniers après sept jours d'accumulation dans les mollusques, suivis de sept jours de dépuración. Les résultats sont présentés en **Figure 16** pour *T. gondii* et en **Figure 17** pour *C. parvum*.

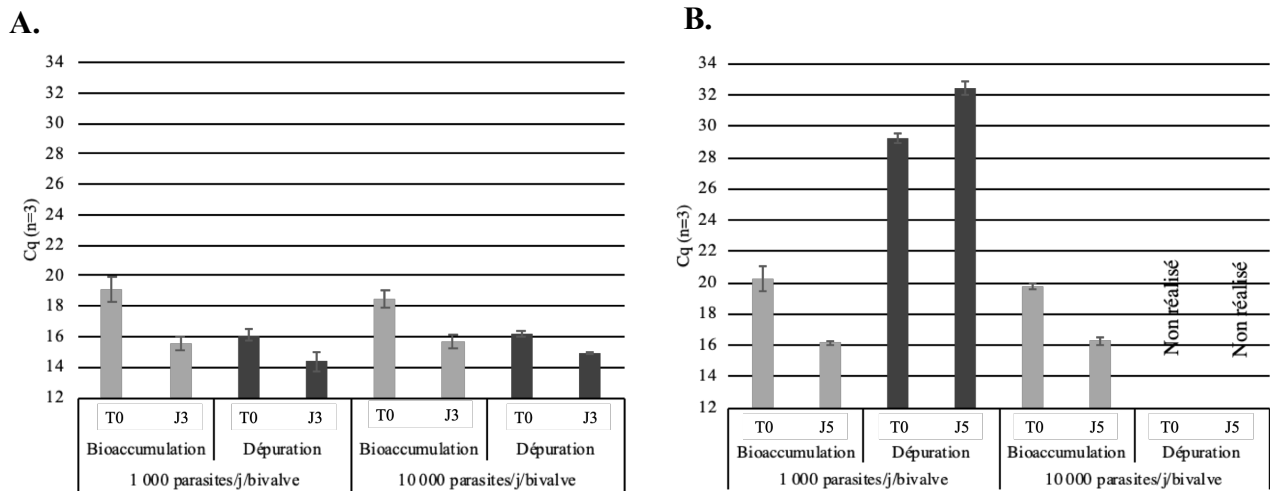


Figure 16 : Infectiosité des oocystes de *T. gondii* dans les tissus de *D. polymorpha* (A) et de *M. edulis* (B) déterminée par CC-qPCR.

Les culots d'oocystes issus de la digestion trypsique de la matrice mollusque sont lavés puis purifiés par gradient de Percoll 30%. Le dékystement des sporozoïtes est initié par une incubation dans de l'hypochlorite de sodium 1,6% pendant 10 min à 4°C suivi d'un traitement dans de l'acide taurocholique 1,5% pendant 1h30 à 37°C. Après centrifugation, le culot de sporozoïtes est resuspendu en milieu de culture puis déposé sur un tapis de cellules Vero (confluence 80%). Une qPCR a été réalisée à partir de l'ADN extrait des cellules après 7 jours de bioaccumulation (en gris clair) et 7 jours de dépuración (en gris foncé), pour chaque dose (1 000 et 10 000 oocystes/jour/bivalve) après un temps de contact entre les sporozoïtes et les cellules de 3h (T0) et après une culture de 3 jours (J3) ou de 5 jours (J5) selon le mollusque (n=3). Chaque extrait d'ADN est testé en duplicat. Les astérisques montrent des différences significatives (p-value < 0,05).

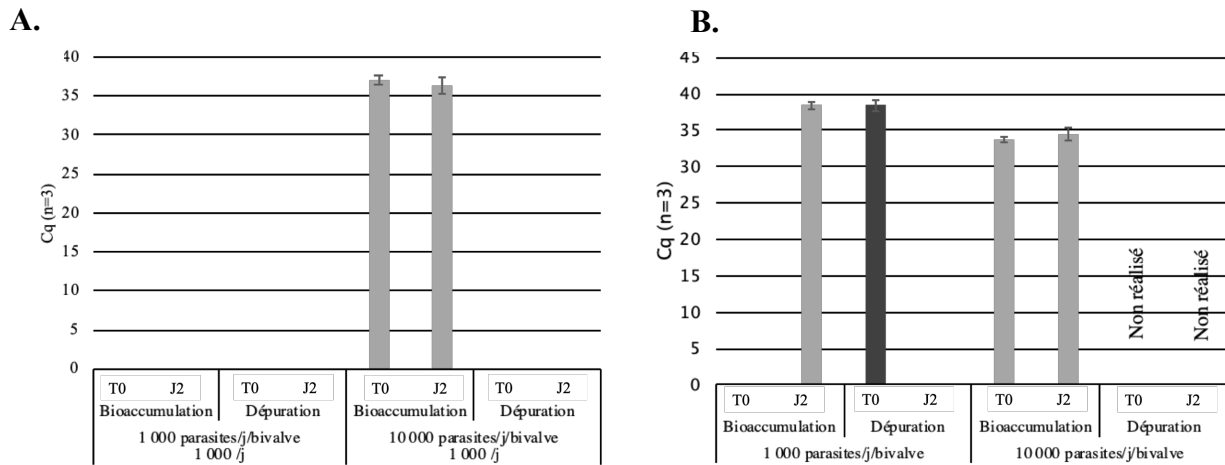


Figure 17 : Infectiosité des oocystes de *C. parvum* dans les tissus de *D. polymorpha* (A) et *M. edulis* (B) déterminée par CC-qPCR.

Les culots d'oocystes issus de la digestion trypsique de la matrice mollusque sont lavés puis purifiés par gradient de Percoll 30%. Le dékystement des sporozoïtes est initié par une incubation dans de l'hypochlorite de sodium 1,6% pendant 10 min à 4°C suivi d'un traitement dans de l'acide taurocholique 1,5% pendant 1h30 à 37°C. Après centrifugation, le culot de sporozoïtes est resuspendu en milieu de culture puis déposé sur un tapis de cellules HCT-8 (confluence 80%). Une qPCR a été réalisée à partir de l'ADN extrait des cellules après sept jours de bioaccumulation (en gris clair) et sept jours de dépuración (en gris foncé), pour chaque dose (1 000 et 10 000 oocystes/jour/bivalve) après un temps de contact entre les sporozoïtes et les cellules de 2h (T0) et après une culture de 2 jours (J2) (n=3). Chaque extrait d'ADN est testé en duplicat. Les astérisques montrent des différences significatives (p-value < 0,05).

Chez *D. polymorpha* après sept jours d'exposition, le signal de qPCR a diminué entre T0 et J3 ($\Delta Cq = 3,55$ et $\Delta Cq = 2,74$ pour 1 000 et 10 000 oocystes/mollusque/jour respectivement), mettant en évidence des oocystes de *T. gondii* infectieux. Ces derniers restent infectieux même après sept jours de dépuración ($\Delta Cq = 1,75$ et $\Delta Cq = 1,26$ pour 1 000 et 10 000 oocystes/mollusques/jour, respectivement).

Après sept jours d'exposition à des doses faibles et élevées ($\Delta Cq = 4,12$ pour 1 000 oocystes/mollusque/jour, $\Delta Cq = 3,47$ pour 10 000 oocystes /mollusque/jour), les oocystes de *T. gondii* restent infectieux dans *M. edulis* (**Figure 16B**). Cependant, après sept jours de

dépuration, des oocystes sont détectés dans la moule bleue mais ne semblent plus infectieux ($\Delta Cq = -2,94$ pour 1 000 oocystes /mollusque/jour).

Chez *D. polymorpha*, les oocystes de *C. parvum* sont détectés après sept jours d'accumulation, mais uniquement pour la dose d'oocystes la plus élevée (**Figure 17A**). Cependant le signal qPCR obtenu est tardif ($Cq > 36$) et reste stable entre T0 et J2, suggérant que les oocystes de *C. parvum* ne sont pas infectieux. En revanche, à cette dose, aucun oocyste n'est détecté après sept jours de dépuration, ce qui suggère que les parasites sont peut-être éliminés lors de la dépuration par les dreissènes ou que le signal est inférieur à la limite de détection de la qPCR ($Cq > 40$). Dans tous les cas, s'il persiste des oocystes, ils ne sont probablement plus infectieux.

Chez *M. edulis*, les oocystes de *C. parvum* sont accumulés après sept jours pour les deux doses. Cependant, pour 1000 oocystes/mollusque/jour, un signal qPCR n'est obtenu qu'après deux jours de culture cellulaire (J2, $Cq = 38,38 \pm 0,53$), suggérant que les oocystes de *C. parvum* bioaccumulés par les moules bleues ne sont probablement pas infectieux ou que la quantité de sporozoïtes à T0 est trop faible pour être détectée. Pour la dose la plus élevée, le signal de qPCR détecté après 7 jours de bioaccumulation reste stable entre T0 et l'arrêt de culture cellulaire (J2). Les oocystes de *C. parvum* ne sont donc pas infectieux (**Figure 17B**). Seule la dose la plus faible a été analysée après sept jours de dépuration. Un signal de qPCR tardif est détecté uniquement à T0 ($Cq = 37,53 \pm 0,92$) suggérant qu'il persiste des oocystes mais qu'ils ne sont plus infectieux.

c) Survie des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum* évaluée par bioessais

- *T. gondii*

L'infectiosité des oocystes de *T. gondii* bioaccumulés puis après dépuration par les dreissènes est étudiée chez la souris. Les résultats sont présentés dans le **Tableau XVIII**.

Tableau XVIII : Nombre de souris infectées par *D. polymorpha* exposé à des oocystes de *T. gondii* (bioaccumulation et dépuration) présentant une séroconversion et le devenir des souris (mortalité avant 60 jours).

Le nombre d'oocystes de *T. gondii* infectieux a été estimé par rapport à la gamme de dilution de l'échantillon (n=3). Le broyat de dreissène sans oocyste inoculé aux souris n'est pas mortel pour ces dernières, la mortalité des souris étant attribuée aux oocystes de *T. gondii*. La séroconversion a été testée par agglutination directe sur les sérums de souris survivantes après 60 jours.

		Bioaccumulation				Dépuration			
		Pur	1/10 ^e	1/100 ^e	1/1000 ^e	Pur	1/10 ^e	1/100 ^e	1/1000 ^e
1 000 oocystes/jour/mollusque	Séroconversion	5/5	1/6	2/6	2/6	4/5	1/6	0/6	0/6
	Mortalité	1/6	0/6	0/6	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6
	Nombre d'oocystes infectieux	> 1000				10 - 100			
10 000 oocystes/jour/mollusque	Séroconversion	2/2	6/6	2/6	0/6	2/2	6/6	1/6	0/6
	Mortalité	4/6	0/6	0/6	0/6	4/6	0/6	0/6	0/6
	Nombre d'oocystes infectieux	10 - 100				10 - 100			

Après sept jours de bioaccumulation de *D. polymorpha* avec 1 000 oocystes/dreissène/jour, une séroconversion est observée pour toutes les souris (5/5) et une souris est morte suite à l'inoculation d'un échantillon pur. La séroconversion est observée chez 2/6 souris jusqu'à une dilution de 1/1000^{ème}. On peut donc en déduire que le nombre d'oocystes infectieux est supérieur à 1 000 oocystes/dreissène. Après sept jours de dépuration, l'inoculation d'un échantillon pur conduit à la mort d'une souris et 4/5 souris ce sont séroconverties. En revanche, aucune séroconversion n'a lieu pour l'échantillon dilué au 1/100^{ème}, ce qui suggère que le nombre d'oocystes infectieux était compris entre 10 et 100 oocystes/dreissène. Ce résultat montre que le traitement de dépuration n'est pas totalement efficace pour éliminer tous les oocystes infectieux. Pour 10 000 oocystes/dreissène/jour, les résultats après bioaccumulation et dépuration sont similaires. L'inoculation de l'échantillon pur provoque la mort de quatre souris et la séroconversion des souris restantes (2/2). De plus, jusqu'à la dilution au 1/100^{ème}, la séroconversion est observée chez au moins une souris (dépuration), indiquant que le nombre d'oocystes infectieux est compris entre 10 et 100 oocystes/dreissène.

Les résultats obtenus avec la moule bleue sont présentés dans le **Tableau XIX**.

Tableau XIX : Nombre de souris infectées par *M. edulis* exposé à des oocystes de *T. gondii* (bioaccumulation et dépuration) présentant une séroconversion et le devenir des souris (mortalité avant 60 jours).

Le nombre d'oocystes de *T. gondii* infectieux a été estimé par rapport à la gamme de dilution de l'échantillon (n=3). Le broyat de moule bleue sans oocyste inoculé aux souris n'est pas mortel pour ces dernières, la mortalité des souris étant attribuée aux oocystes de *T. gondii*. La séroconversion a été testée par agglutination directe sur les sérums de souris survivantes après 60 jours.

		Bioaccumulation				Dépuration			
		Pure	1/10 ^e	1/100 ^e	1/1000 ^e	Pure	1/10 ^e	1/100 ^e	1/1000 ^e
1 000 oocystes/jour/mollusque	Séroconversion	6/6	1/6	0/6	0/6	6/6	1/6	0/6	0/6
	Mortalité	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	Nombre d'oocystes infectieux	10 - 100				10 - 100			
10 000 oocystes/jour/mollusque	Séroconversion	5/5	5/5	4/5	2/6	5/5	6/6	2/6	1/6
	Mortalité	1/6	1/6	0/5	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6
	Nombre d'oocystes infectieux	> 1000				> 1000			

Après bioaccumulation et dépuration chez *M. edulis*, pour 1 000 oocystes/moules bleues/jour, l'inoculation d'un échantillon pur conduit à une séroconversion chez la souris (6/6) et ce jusqu'à la dilution au 1 /10^{ème} (1/6 souris). Ainsi, le nombre d'oocystes infectieux estimé après bioaccumulation et dépuration est compris entre 10 et 100 oocystes/moule bleue. Après bioaccumulation avec 10 000 oocystes/moule bleue/jour, une souris est morte et toutes les souris ont séroconverti (5/5) suite à l'inoculation d'un échantillon pur ou dilué au 1/10^{ème}. Avec une séroconversion de 2/6 souris jusqu'à la dilution de l'échantillon au 1/1000^{ème}, le nombre d'oocystes infectieux est estimé à plus de 1 000 oocystes/moules bleues. Après la dépuration, l'inoculation d'un échantillon pur conduit à la mort d'une souris et la séroconversion des souris restantes (5/5). De plus, la séroconversion des souris (6/6) est observée pour l'échantillon dilué au 1/10^{ème} alors que la séroconversion a lieu chez seulement 2/6 et 1/6 souris pour les échantillons dilués respectivement au 1/100^{ème} et 1/1000^{ème}. Ainsi, le nombre d'oocystes infectieux est estimé supérieur à 1 000 oocystes/moules bleues. Ce résultat montre que le traitement de dépuration n'est pas efficace pour éliminer les oocystes infectieux

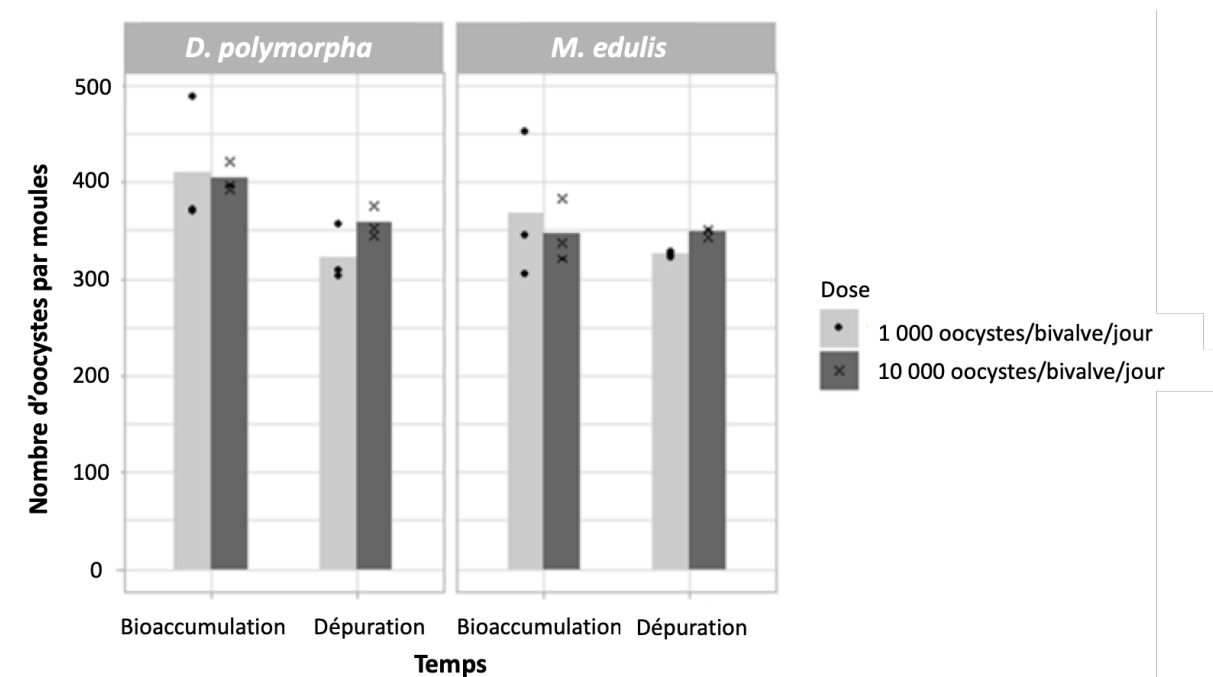
de la moule bleue, quel que soit la dose. Pour *M. edulis*, un effet dose sur la bioaccumulation et sur la dépuration est présent.

- *C. parvum*

L'infectiosité des oocystes de *C. parvum* bioaccumulés puis après dépuration par les mollusques a été étudiée chez la souris. Les résultats sont présentés dans la **Figure 18**.

Figure 18 : Infectiosité des oocystes de *C. parvum* dans les tissus de *D. polymorpha* (A) et de *M. edulis* (B).

Le diagramme de dispersion représente le nombre d'oocystes infectieux par mollusque après bioaccumulation et dépuration, pour chaque dose (1 000 et 10 000 oocystes/jour/bivalve). Le diagramme en barres représente la moyenne d'oocystes infectieux pour chaque condition (n = 3).



Pour 1000 oocystes/dreissène/jour, 410 ± 67 et 323 ± 29 oocystes infectieux de *C. parvum* sont dénombrés respectivement après sept jours de bioaccumulation et sept jours de dépuration. Pour 10 000 oocystes/mollusque/jour, 404 ± 16 et 328 ± 16 oocystes infectieux de *C. parvum* sont détectés après sept jours de bioaccumulation et sept jours de dépuration. Les

quantités d'oocystes accumulés dans les tissus (410 ± 67 pour 1000 vs. 404 ± 16 pour 10000) et présents en fin de dépuración (323 ± 29 pour 1000 vs. 328 ± 16 pour 10000) ne semblent pas dépendantes du nombre de parasites présents dans l'eau. Par contre, une tendance à la diminution du nombre d'oocystes infectieux entre les phases de bioaccumulation et de dépuración n'est observée que pour la dose 10 000.

Pour 1 000 oocystes/moule bleue/jour, 367 ± 77 et 326 ± 3 oocystes infectieux de *C. parvum* sont respectivement détectés après sept jours de bioaccumulation et sept jours de dépuración. Pour 10 000 oocystes/moule bleue/jour, 348 ± 33 et 349 ± 4 oocystes infectieux de *C. parvum* sont dénombrés après sept jours de bioaccumulation et sept jours de dépuración. A l'instar de la dreissène, aucun effet dose n'est observé puisque le nombre d'oocystes infectieux détectés en fin de bioaccumulation (367 ± 77 vs. 348 ± 33) et en fin de dépuración (326 ± 3 vs. 349 ± 4) est comparable quelle que soit la dose. En revanche, le nombre d'oocystes infectieux reste stable entre les étapes de bioaccumulation et de dépuración aux deux doses, suggérant qu'aucune dépuración n'a eu lieu. Ainsi, d'après l'ensemble de ces résultats quelle que soit la matrice mollusque considérée et la quantité de parasites dans l'eau, les oocystes accumulés dans les tissus des moules conservent leur caractère infectieux et le traitement de dépuración ne semble pas être efficace.

Evaluation de la survie des oocystes de T. gondii et de C. parvum en matrice mollusque : *Conclusions/discussion*

La méthode de détection actuellement utilisée dans l'eau pour *Cryptosporidium* est la séparation immunomagnétique associée à une détection par immunofluorescence (IMS-IFA) (Méthode 1623.1 de l'USEPA et NF T90-455 / A1). L'IFA a largement été transposée pour les bivalves (Fayer *et al.*, 2003; Freire-Santos *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2005) et en particulier chez *M. edulis* (Li *et al.*, 2006; Lucy *et al.*, 2008) ou *D. polymorpha* (Graczyk *et al.*, 2004; Lucy *et al.*, 2008). Cependant, Fayer *et al.* (2002) ont démontré par IFA que seulement 50% des oocystes de *C. parvum* sont détectés dans des crustacés. Plusieurs études ont utilisé une méthode de biologie moléculaire telle que la qPCR (Kerambrun *et al.*, 2016 ; Marangi *et al.*, 2015; Staggs *et al.*, 2015). Dans notre étude, nous avons procédé à une détection par qPCR directement à partir d'extraits des moules *D. polymorpha* et *M. edulis* et ainsi mis en évidence leur capacité à accumuler et à dépurar les oocystes de *T. gondii* et *C. parvum* dans des conditions expérimentales. Les résultats de qPCR mettent en évidence une accumulation dose dépendante des oocystes de *T. gondii* par *D. polymorpha* et *M. edulis*. Cependant, aucun

oocyste de *C. parvum* n'a été détecté chez les deux espèces de mollusques. Bien que présentant une limite de détection correcte ($50 < LD_{95} < 100$ oocystes par moule), la méthode de détection par qPCR ne semble pas suffisamment sensible pour détecter la bioaccumulation des oocystes de *C. parvum*. Le faible nombre de copies (4) de la séquence d'ADN génomique ciblée (Laxer *et al.*, 1991) ainsi que le rendement de récupération des parasites peuvent contribuer à ce niveau de détection. L'IMS-qPCR a été décrite pour *C. parvum* comme une méthode alternative plus sensible par rapport à l'IMS-IFA (Lowery *et al.*, 2001) et pourrait donc être envisagée pour améliorer la détection sur la matrice moule et être en mesure d'évaluer la bioaccumulation. A ce jour, aucune technique d'IMS et aucun réactif de microscopie d'analyse par immunofluorescence n'est disponible pour les oocystes de *T. gondii*. Plus récemment, la séparation magnétique par des lectines (LMS) a été décrite pour isoler les oocystes de *T. gondii* à partir d'échantillons d'eau concentrée avant la détection par microscopie ou qPCR (Harito *et al.*, 2017b, 2017a, 2016). Cependant, on peut s'interroger sur l'utilisation de lectines dans le cadre de matrices complexes en raison de leur liaison non spécifique à un très grand nombre de glycoconjugués.

D'autre part, étant donné que seul un parasite infectieux représente un risque pour la santé humaine, il semble nécessaire d'obtenir une information concernant l'infectiosité. Cette dernière a été déterminée par deux méthodes : la CC-qPCR et les bioessais. Dans notre étude, les oocystes de *T. gondii* restent infectieux après sept jours de bioaccumulation par *M. edulis* et *D. polymorpha* par CC-qPCR et bioessais. Ces résultats sont cohérents avec la persistance de l'infectiosité des oocystes de *T. gondii* après 85 jours chez *Crassostrea virginica* (Lindsay *et al.*, 2004). Une autre étude a mis en évidence la présence de parasites viables par RT-qPCR et infectieux en modèle animal, trois jours après l'exposition de *Mytilus galloprovincialis* aux oocystes de *T. gondii* (Arkush *et al.*, 2003). Pour *C. parvum*, des oocystes infectieux ont également été mis en évidence chez les deux mollusques après sept jours de bioaccumulation, par les essais *in vivo* uniquement. La présence d'oocystes infectieux a déjà été démontrée en modèle animal, chez des moules espagnoles, *Mytilus galloprovincialis*, naturellement contaminées (Gomez-Bautista *et al.*, 2000). Plus récemment, il a été mis en évidence la présence d'oocystes de *C. parvum* viables chez l'huître *Crassostrea belcheri* sept jours après exposition en aquarium (Sutthikorchai *et al.*, 2016).

Après l'étape de dépuration, des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum* infectieux sont toujours détectés chez les deux moules *via* les bioessais. Dans notre étude, la réduction de l'infectiosité est faible voire inexistante.

A l'exception de la *M. edulis* en fin de dépuración (résultats uniquement pour la dose faible), les résultats de CC-qPCR et de bioessais sont corrélés pour *T. gondii*. Ainsi, l'approche CC-qPCR s'avère une méthode alternative intéressante et pertinente dans le cadre de l'évaluation de l'exposition à des parasites infectieux dans l'environnement *via* les bivalves. L'absence de corrélation entre les deux techniques en fin d'étape de dépuración de *M. edulis* soulève des questionnements quant à l'impact du processus d'élimination mis en place par la moule sur l'intégrité de l'oocyste. En effet, une altération de la structure pourrait affecter les rendements de récupération des oocystes à partir des tissus et/ou de libération des sporocystes, et par conséquent le résultat de CC-qPCR.

Pour *C. parvum* en revanche, les résultats de CC-qPCR ne sont pas corrélés pas avec les essais en modèle animal. Contrairement à *T. gondii*, la corrélation entre l'approche de CC-qPCR telle que proposée dans le cadre de cette thèse pour *C. parvum* (Partie 2B) et les bioessais, n'a pas été établie en matrice simple, ni mollusque. Compte-tenu de ces résultats, il apparaît important de réaliser des essais complémentaires.

Actuellement, aucune étude n'a évalué l'infectiosité des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum* chez *D. polymorpha*. Cependant, Palos Ladeiro *et al.*, (2018) ont montré que les oocystes de *C. parvum* pourraient être phagocytés par des hémocytes des dreissènes dans des conditions *in vitro*. Ceci n'a pas été observé pour les oocystes de *T. gondii*, peut-être en raison de leur diamètre (10-12 μm ; Dubey *et al.*, 1998) par rapport à *C. parvum* (4 - 5 μm ; Fayer *et al.*, 2000). Ces données suggèrent que la dreissène devrait être capable d'éliminer plus facilement les oocystes de *C. parvum* et que le nombre d'oocystes infectieux devraient diminuer au cours de la dépuración. Les résultats obtenus dans le cadre de notre étude sur l'organisme vivant ne vont cependant pas en ce sens. Le nombre élevé d'oocystes bioaccumulés à traiter par la moule pourrait induire une saturation du système immunitaire ne permettant pas d'éliminer efficacement *C. parvum* contrairement aux essais *in vitro* dans lesquels le nombre d'oocystes pris en charge par les hémocytes est plus faible.

Globalement les parasites bioaccumulés au bout de sept jours par les moules conservent leur caractère infectieux et des oocystes infectieux sont toujours présents après sept jours de dépuración. Ceci démontre que : i) ces deux bivalves peuvent constituer des outils intégrateurs de la contamination en parasites protozoaires des eaux dans le temps et dans l'espace sur le continuum continental-marin ; ii) sept jours de dépuración ne sont pas ou peu efficaces pour éliminer des mollusques les oocystes infectieux et/ou réduire l'infectiosité.

Par conséquent, dans le cadre de la moule bleue, sachant que le temps de dépuracion varie en fonction du classement sanitaire des zones de production (0, 48h et 60 jours), le consommateur peut encore être exposé au danger. Il conviendrait donc de déterminer le temps de dépuracion nécessaire pour éliminer complètement le risque d'exposition.

CONCLUSIONS GENERALES

Tout au long de ce projet de thèse, notre objectif a été de développer une méthode pour étudier la viabilité et/ou l'infectiosité des trois protozoaires, *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis*, si possible simultanément, et applicable à toutes les matrices. Pour atteindre cet objectif, les essais se sont déroulés en trois étapes. Dans un premier temps, des méthodes moléculaires pour étudier la viabilité ont été évaluées dans une matrice simple (eau) et sur deux matrices mollusques (la moule bleue et la dreissène). Dans un second temps, une méthode alternative aux bioessais, permettant de caractériser le potentiel infectieux des oocystes par infection de cellules couplée à la qPCR a été proposée sur matrice simple puis appliquée sur matrice complexe (moule bleue et dreissène) pour *T. gondii* et *C. parvum*. Enfin ces méthodes ont été utilisées pour évaluer la survie des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum* dans les mollusques au cours de la bioaccumulation et de la dépuración. L'ensemble des résultats est synthétisé dans le **tableau XX**.

Tableau XX : Tableau de synthèse des différentes méthodes permettant d'étudier la viabilité et l'infectiosité des trois parasites dans l'eau ou dans les mollusques.

Un code couleur a été utilisé pour les limites de détection (LD) : LD acceptable (Vert), LD ne permettant pas une application en biosurveillance (orange), LD inacceptable car très élevée (rouge). A partir des LD de chaque méthode, nous avons conclu sur l'applicabilité (✓) ou non (✗) de la méthode décrite en biosurveillance et pour l'étude de l'efficacité des procédés. Si la LD n'est pas établie, les méthodes ont été considérées comme non applicable.

			<i>T. gondii</i>	<i>C. parvum</i>	<i>G. duodenalis</i>
Eau	Viabilité	PMA-qPCR	LOD : Non déterminée Biosurveillance : ✗ Efficacité des procédés : ✗	LOD : Non déterminée Biosurveillance : ✗ Efficacité des procédés : ✗	LOD : Non déterminée Biosurveillance : ✗ Efficacité des procédés : ✗
		RT-qPCR	LOD < 2 oocystes / μ L suspension d'ARN (Travaillé et al., 2016) Biosurveillance : ✓ Efficacité des procédés : ✓	LOD < 2 oocystes / μ L suspension d'ARN (Travaillé et al., 2016) Biosurveillance : ✓ Efficacité des procédés : ✓	LOD < 2 kystes / μ L suspension d'ARN (Travaillé et al., 2016) Biosurveillance : ✓ Efficacité des procédés : ✓
		CC-qPCR	LOD < 5 oocystes Biosurveillance : ✓ Efficacité des procédés : ✓	190 oocystes < LOD < 1 900 oocystes Biosurveillance : ✓ Efficacité des procédés : ✓	LOD < 1 kyste Biosurveillance : ✓ Efficacité des procédés : ✓
	Infectiosité	CC-qPCR	LOD < 5 oocystes Biosurveillance : ✓ Efficacité des procédés : ✓	190 oocystes < LOD < 1 900 oocystes Biosurveillance : ✓ Efficacité des procédés : ✓	LOD non déterminée Biosurveillance : ✗ Efficacité des procédés : ✗
		Bioessais	LOD < 10 oocystes Biosurveillance : ✓ Efficacité des procédés : ✓	1 oocyste < LOD < 10 oocystes (Delaunay et al., 2000) Biosurveillance : ✓ Efficacité des procédés : ✓	LOD non déterminée Biosurveillance : ✗ Efficacité des procédés : ✗
	Moule bleue	Viabilité	RT-qPCR	1 000 oocystes < LOD < 5 000 oocystes Biosurveillance : ✗ Efficacité des procédés : ✓	LOD > 100 000 oocystes Biosurveillance : ✗ Efficacité des procédés : ✗
Infectiosité		CC-qPCR	LOD < 10 oocystes Biosurveillance : ✓ Efficacité des procédés : ✗	LOD non déterminée Biosurveillance : ✗ Efficacité des procédés : ✗	LOD non déterminée Biosurveillance : ✗ Efficacité des procédés : ✗
		Bioessais	LOD < 100 oocystes Biosurveillance : ✓ Efficacité des procédés : ✓	LOD : Non déterminée Biosurveillance : ✗ Efficacité des procédés : ✗	LOD non déterminée Biosurveillance : ✗ Efficacité des procédés : ✗
Dreissène	Viabilité	RT-qPCR	1 000 oocystes < LOD < 5 000 oocystes Biosurveillance : ✗ Efficacité des procédés : ✓	LOD > 100 000 oocystes Biosurveillance : ✗ Efficacité des procédés : ✗	LOD > 100 000 kystes Biosurveillance : ✗ Efficacité des procédés : ✗
	Infectiosité	CC-qPCR	LOD < 10 oocystes Biosurveillance : ✓ Efficacité des procédés : ✗	LOD non déterminée Biosurveillance : ✗ Efficacité des procédés : ✗	LOD non déterminée Biosurveillance : ✗ Efficacité des procédés : ✗
		Bioessais	100 oocystes < LOD < 1 000 oocystes Biosurveillance : ✗ Efficacité des procédés : ✓	LOD : Non déterminée Biosurveillance : ✗ Efficacité des procédés : ✗	LOD non déterminée Biosurveillance : ✗ Efficacité des procédés : ✗

En PMA-qPCR, le protocole n'est commun à aucun des trois protozoaires. Cette méthode permet de différencier des oocystes des *T. gondii* vivants et morts (inactivés thermiquement) mais l'abattement mesuré reste faible par rapport à ce qui est observé avec d'autres méthodes comme la RT-qPCR ou le modèle *in vivo*. La PMA-qPCR n'est donc pas adaptée pour évaluer l'efficacité du traitement thermique. Pour les oocystes de *C. parvum* et les kystes de *G. duodenalis*, la réponse en PMA-qPCR varie selon le traitement subi. De plus, pour des oocystes/kystes inactivés thermiquement (par la chaleur et/ou le froid), le signal en PMA-qPCR persiste alors qu'aucun signal de viabilité n'est détecté en RT-qPCR. Ainsi en l'état actuel, la PMA-qPCR n'a pas été retenue comme méthode alternative à la RT-qPCR, méthode de référence du laboratoire, pour une éventuelle application en matrice mollusque.

Sur matrice mollusque, le protocole utilisé pour l'extraction des ARN et la RT-qPCR ne nous a pas permis de détecter les trois protozoaires viables simultanément. Les oocystes de *T. gondii* sont détectables à partir de dreissène et de moule bleue (1 000 oocystes < LOD < 5 000 oocystes) et les kystes de *G. duodenalis* (5 000 kystes < LOD < 10 000 kystes) sont détectables uniquement à partir de moule bleue. Les deux matrices mollusques ne semblent pas se comporter de la même façon. La méthodologie de RT-qPCR n'est donc pas applicable

en l'état, à l'étude de la viabilité des trois protozoaires dans le cadre de surveillance environnementale. En revanche, l'étude de l'efficacité des procédés industriels, basée sur l'utilisation d'une quantité importante de parasites au départ, est possible pour *T. gondii* et *G. duodenalis* à partir de moule bleue et pour *T. gondii* à partir de dreissène.

Les méthodes de biologie moléculaire semblaient les plus prometteuses en termes de délai de réponse (1 jour), de mise en œuvre, de coût pour permettre aux industriels d'estimer le risque parasitaire dans les aliments. Cependant, leur capacité à détecter spécifiquement des parasites viables (PMA-qPCR) ou de faible quantité de parasites dans des matrices complexes (RT-qPCR) n'a pas pu être validée. De plus, seules les méthodes pour évaluer l'infectiosité permettent d'évaluer strictement l'exposition de l'homme à des protozoaires infectieux dans les matrices alimentaires, sans surestimation du risque. Pour *T. gondii*, le modèle *in vivo* permet de détecter jusqu'à 10 oocystes infectieux après quatre semaines *post inoculation* et pour *C. parvum*, jusqu'à un oocyste infectieux dans un délai d'une semaine *post inoculation*. Ces deux méthodes pourraient être utilisables semi-quantitativement par la mise en œuvre de dilutions.

Cependant, le modèle *in vivo* présente toujours des inconvénients majeurs qui sont le temps nécessaire pour obtenir un résultat et surtout les problèmes bioéthiques liés à l'utilisation d'animaux en laboratoire. Afin de proposer une méthode plus adaptée pour étudier l'efficacité des procédés dans les industries agro-alimentaire et en biosurveillance, l'infection de cellules couplée à la qPCR (CC-qPCR) a été développée comme méthode alternative aux bioessais afin d'évaluer l'infectiosité des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum* en matrice eau et mollusque. Cependant, il n'a pas été possible de quantifier le nombre d'oocystes infectieux en culture cellulaire. Cela est lié à plusieurs facteurs, dont (i) la variabilité du nombre réel d'oocystes au départ, (ii) la variabilité liée au dékystement des sporocystes (*T. gondii*) ou oocystes (*C. parvum*) mis en culture, (iii) le fait que tous les oocystes ne sont pas infectieux dans la suspension d'oocystes et (iv) la variabilité biologique due au nombre et aux stades de développement intracellulaire du parasite et par conséquent le nombre de copies des cibles génomiques. Dans l'eau, la limite de détection de la CC-qPCR est inférieure à cinq oocystes de *T. gondii* en 48h et inférieure à 10 oocystes sur matrice mollusque en 72h. Ainsi, la méthode de CC-qPCR en matrice eau et mollusque représente une bonne alternative aux bioessais et semble adaptée pour étudier l'infectiosité des oocystes de *T. gondii* sur *M. edulis* et *D. polymorpha* en surveillance environnementale mais aussi pour étudier l'efficacité des procédés industriels avec un résultat en 72h. Pour les oocystes de *C.*

parvum, la limite de détection dans l'eau est comprise entre 190 et 1 900 oocystes infectieux de *C. parvum* en 48h. Cette méthode de CC-qPCR nécessiterait une optimisation pour améliorer la limite de détection sur matrice eau et mollusque et étudier l'infectiosité des oocystes de *C. parvum* dans le cadre de surveillance environnementale ou dans les aliments. Aucune information concernant l'infectiosité des kystes de *Giardia* n'est obtenue par multiplication *in vitro* couplée à la qPCR, mais cette méthode permet d'évaluer quantitativement leur multiplication et donc leur viabilité. Un kyste viable peut ainsi être détecté dans l'eau en 48h. Cette approche semble prometteuse, pourrait remplacer la RT-qPCR, pour estimer le risque dans des échantillons environnementaux ou des aliments en ayant recours à une IMS pour s'affranchir de la matrice. De plus, l'emploi de cellules HCT-8 pour les trois parasites permettrait d'évaluer la viabilité des kystes de *Giardia* et l'infectiosité des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum*. Même si ce type d'approche semble être prometteur pour une application en matrice mollusque, il serait nécessaire de déterminer le rendement du dékystement des kystes de *G. duodenalis* ou oocystes de *C. parvum* (étape limitante du protocole), si besoin de l'optimiser. Il pourrait être ensuite envisagé d'appliquer la CC-qPCR et la multiplication *in vitro*-qPCR sur d'autres matrices alimentaires à risque tel que les huîtres (mangées crues) ou les fruits et légumes.

Avant ce projet de thèse, des méthodes étaient disponibles au laboratoire pour détecter l'ADN des oocystes de *T. gondii* et *C. parvum* et des kystes de *G. duodenalis* en matrice eau, basilic et framboises et pour accéder à la viabilité par RT-qPCR sur matrice eau et basilic. De plus, l'*in vivo* était la méthode qualitative de référence donnant une information sur l'infectiosité des trois parasites dans la matrice eau. La culture cellulaire associée à une détection microscopique était utilisée, comme méthode alternative aux bioessais, pour étudier l'infectiosité des oocystes de *C. parvum* en matrice eau. Cependant, aucune application n'avait été réalisée sur matrice mollusque. Concernant les méthodes moléculaires de mesure de la viabilité, ce projet de thèse a permis de déterminer que la PMA-qPCR n'était pas une technique pertinente, d'adapter la RT-qPCR à l'étude de la viabilité de *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis* sur matrice mollusque et de développer la multiplication *in vitro* couplée à la qPCR pour les kystes de *G. duodenalis* sur matrice eau. Le modèle *in vivo* de *T. gondii* a été optimisé pour permettre de rendre un résultat semi-quantitatif. A cela s'ajoute le développement de la CC-qPCR pour *T. gondii* et *C. parvum* à partir de matrice eau et mollusque comme méthode alternative aux bioessais. L'ensemble des méthodes disponibles avant ce projet de thèse et présentes en fin de thèse est présenté en **Figure 19**.

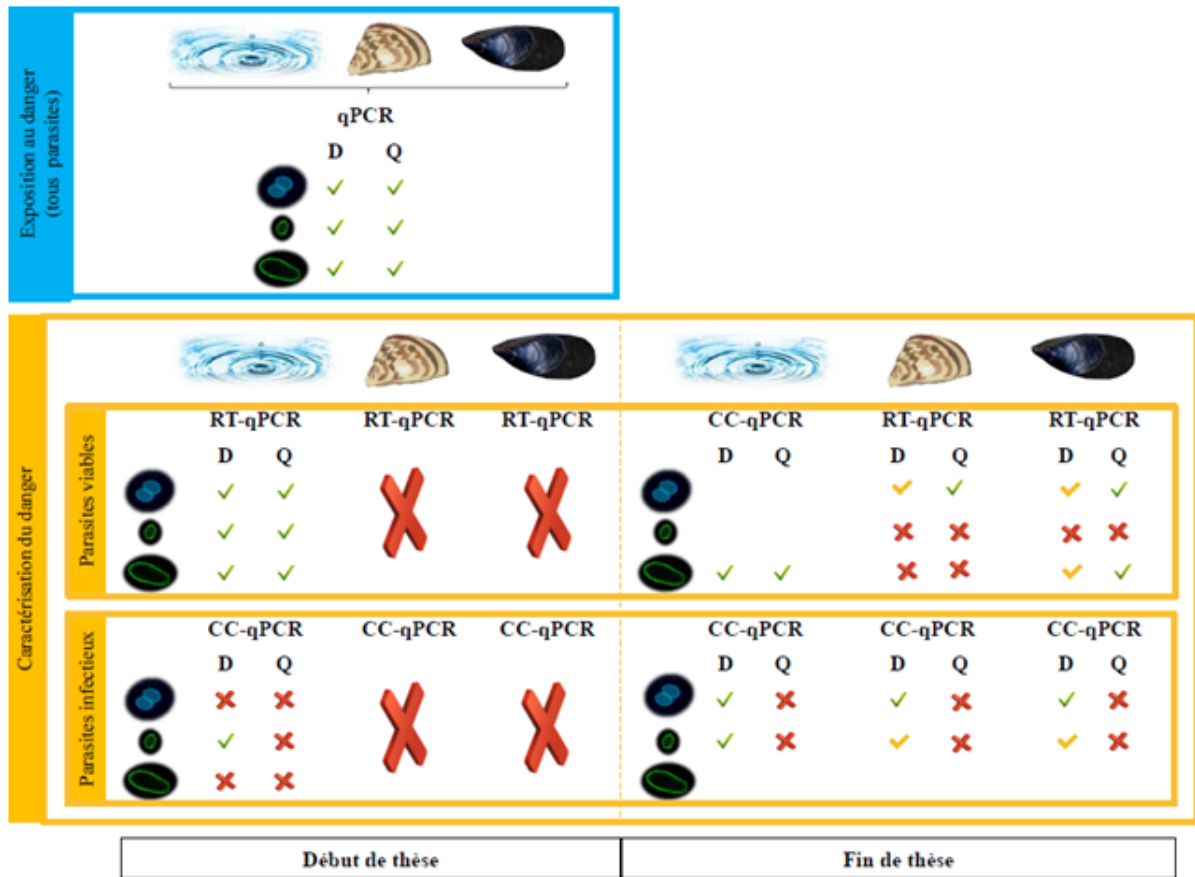


Figure 19 : Schéma de synthèse des techniques disponibles dans la littérature et/ou au sein du laboratoire avant/après la thèse et leur applicabilité dans un contexte de biosurveillance et de mesure d'efficacité d'inactivation de traitements sur matrice eau et mollusque.

: oocyste de *T. gondii* ; : oocystes de *C. parvum* ; : kystes de *G. duodenalis*

D : détection ; ✗ > ✓ > ✓ : degré de compatibilité décroissant avec l'application en biosurveillance dans les matrices eau et mollusque.

Q : quantification ; ✗ > ✓ > ✓ : degré de compatibilité décroissant avec des mesures d'efficacité de procédés dans les matrices eau et mollusque.

Les méthodes développées ont permis de montrer que les oocystes de *T. gondii* et *C. parvum* bioaccumulés sept jours dans les moules bleues et les dreissènes demeuraient infectieux. Après sept jours de déuration, l'infectiosité des oocystes de *T. gondii* persiste uniquement dans les dreissènes par CC-qPCR. Mais ces derniers résultats ne concordent pas avec ceux obtenus avec le modèle *in vivo*. Les bioessais restent la méthodologie la plus

sensible pour évaluer le risque environnemental lié à la présence de *T. gondii* infectieux. En revanche, les oocystes de *C. parvum* ont à priori perdu leur infectiosité après 7 jours de dépuration dans les deux matrices mollusques. Le traitement de dépuration est efficace pour inactiver les oocystes de *C. parvum* sur la matrice mollusque et donc limiter le risque infectieux pour les consommateurs. Par ailleurs, la bioaccumulation d'oocystes infectieux par les bivalves peut être utilisé comme outil de biosurveillance, afin de mettre en évidence une exposition de l'homme à des oocystes infectieux présents dans les milieux aquatiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abamecha, F., Awel, H., 2016. Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women following antenatal care at Mizan Aman general hospital, bench Maji zone (BMZ), Ethiopia. *BMC Infectious Diseases*, 16, 460.

Åberg, R., Sjöman, M., Hemminki, K., Pirnes, A., Räsänen, S., Kalanti, A., Pohjanvirta, T., Cacciò, S.M., Pihlajasaari, A., Toikkanen, S., Huusko, S., Rimhanen-Finne, R., 2015. *Cryptosporidium parvum* caused a large outbreak linked to frisée salad in Finland, 2012. *Zoonoses Public Health*, 62, 618–624.

Ackerman JD. 1999. Effect of velocity on the filter feeding of dreissenid mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for trophic dynamics. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56, 1551-1561.

Adam, E.A., Yoder, J.S., Gould, L.H., Hlavsa, M.C., Gargano, J.W., 2016. Giardiasis outbreaks in the United States, 1971–2011. *Epidemiology and Infection*, 144, 2790-2801.

Adam, R.D., 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 447-475.

AFSSA, 2002. Rapport sur les infections à protozoaires liées aux aliments et à l'eau : évaluation scientifique des risques associés à *Cryptosporidium* sp.

AFSSA, 2005. Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation – Rapport du groupe de travail “*Toxoplasma gondii*”.

Agulló-Barceló, M., Moss, J.A., Green, J., Gillespie, S., Codony, F., Lucena, F., Nocker, A., 2014. Quantification of relative proportions of intact cells in microbiological samples using the example of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Letters in Applied Microbiology*, 58, 70–78.

Ahmad, S.O., El Fadaly, H.A., Zaki, M.S., Barakat A. M. A., 2016. Incidence of zoonotic parasites in egyptian raw vegetable salads. *Life Science Journal*, 13, 27-31.

Ahmed, S.A., Karanis, P., 2017. An overview of methods/techniques for the detection of *Cryptosporidium* in food samples. *Parasitology research*, 117, 629-653.

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 Microbiology*, 44, 128–135.

Al-Megrin, W.A.I., 2010. Prevalence of intestinal parasites in leafy vegetables in Riyadh, Saudi Arabia. *International Journal of Zoological Research*, 5, 20-23.

Almeida, A., Pozio E, Cacciò SM. 2010. Genotyping of *Giardia duodenalis* cysts by new real-time PCR assays for detection of mixed infections in human samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 1895-1901.

Alonso, J.L., Amorós, I., Guy, R.A., 2014. Quantification of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in wastewater using propidium monoazide quantitative real-time PCR. *Parasitology Research*, 113, 2671–2678.

Alum, A., Sbai, B., Asaad, H., Rubino, J.R., Khalid Ijaz, M., 2012. ECC-RT-PCR: a new method to determine the viability and infectivity of *Giardia* cysts. *International Journal of Infectious Diseases*, 16, e350–e353.

Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 76, 160-202.

Ancelle, T., Goulet, V., Tirard-Fleury, V., Baril, L., du Mazaubrun, C., Thulliez, P., Weislo, M., Carme, B., 1996. La toxoplasmose chez la femme enceinte en France en 1995. Résultats d'une enquête nationale périnatale. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 51, 227-229.

Anses, 2011a. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : *Giardia duodenalis*. <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2010sa0230Fi.pdf>

Anses, 2011b. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : *Toxoplasma gondii*. <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2010sa0274Fi.pdf>

Aqeely, H., El-Gayar, E.K., Perveen Khan, D., Najmi, A., Alvi, A., Bani, I., Mahfouz, M.S., Abdalla, S.E., Elhassan, I.M., 2014. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* amongst Pregnant Women in Jazan Province, Saudi Arabia. *Journal of Tropical Medicine*, 2014.

Arkush, K.D., Miller, M.A., Leutenegger, C.M., Gardner, I.A., Packham, A.E., Heckerth, 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.

Armon, R., Cheruti, U., 2012. Environmental aspects of zoonotic diseases by. IWA Press.

Aubert, D., Villena, I., 2009. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne Region, France. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 290–295

Bahia-Oliveira, L.M.G., Jones, J.L., Azevedo-Silva, J., Alves, C.C.F., Oréface, F., and Addiss, D.G., 2003. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 9, 55–62.

Balasundaram, M.B., Andavar, R., Palaniswamy, M., Venkatapathy, N., 2010. Outbreak of acquired ocular toxoplasmosis involving 248 patients. *Archives of Ophthalmology*, 128, 28-32.

Baldursson, S., Karanis, P., 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Research*, 45, 6603-6614.

Barr, S.C., 1998. Enteric protozoal infections. *In*: Greene, C.E., editor. *Infectious diseases of the dog and cat*. WB Saunders Company, Philadelphia, 482-490.

Barwick, R.S., Mohammed, H.O., White, M.E., Bryant, R.B., 2003. Factors associated with the likelihood of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in soil from dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 86, 784-791.

Basnet, S., Schneider, M., Gazit, A., Mander, G., Allan Doctor, 2009. Fresh goat's milk for infants: myths and realities—a review. *American Academy of Pediatrics*, 4, e973- e977.

Beauvais, B., Garin, J.F., Lariviere, M., Languillat, G., Galal, H., 1976. Toxoplasmose et transfusion. *Annales De Parasitologie Humaine Et Comparée*, 51, 625-635.

Beer, K.D., Gargano, J.W., Roberts, H.E., Hill, V.R., Garrison, L.E., Kutty, P.K., Hilborn, E.D., Wade, T.J., Fullerton, K.E., Yoder, J.S., 2015a. Outbreaks associated with drinking United States, 2011-2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance*. 64, 842-848.

Beer, K.D., Gargano, J.W., Roberts, V.A., Reses, H.E., Hill, V.R., Garrison, L.E., Kutty, P.K., Hilborn, E.D., Wade, T.J., Fullerton, K.E., Yoder, J.S., 2015b. Outbreaks associated with environmental and undetermined water exposures United States, 2011-2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance*, 64, 849-851.

Benenson, M.W., Takafuji, E.T., Lemon, S.M., Greenup, R.L., Sulzer, A.J., 1982. Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *The New England journal of medicine*, 307, 666–669.

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*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 1973–1983.

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 & Technology*, 39, 1492–1505.

Binelli, A., Della Torre, C., Magni, Parolini, M., 2015. Does zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) represent the freshwater counterpart of *Mytilus* in ecotoxicological studies? A critical review. *Environmental Pollution*, 196, 386-403.

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*). *Mutation Research*, 649, 135–145.

Bingham, A.K., Meyer, EA., 1979. *Giardia* excystation can be induced *in vitro* in acidic solutions. *Nature*, 277, 301– 302.

Blackburn, B.G., Mazurek, J.M., Hlavsa, M., Park, J., Tillapaw, J., Parrish, M., Salehi, E., Franks, W., Koch, E., Smith, F., Xiao, L., Arrowood, M., Hill, V., Silva, A., Johnston, S., Jones, J.L., 2006. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 684-686.

Boening, D., 1999. An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters. *Environmental Monitoring and Assessment*, 55, 459–470.

Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Vincent-Hubert, F., Palais, F., Geffard, A., Biagianti-Risbourg, S., Pain-Devin, S., Tusseau-Vuillemin, M.H., 2010. Lessons from a transplantation

of zebra mussels into a small urban river: an integrated ecotoxicological assessment. *Environmental Toxicology*, 25, 468–478.

Bouwknegt, M., Devleeschauwer, B., Graham, H., Robertson, L.J., van der Giessen, J.W.B., the Euro-FBP workshop participants, 2018. Prioritisation of food-borne parasites in Europe, 2016. *Eurosurveillance*, 23.

Bowie, W.R., King, A.S., Werker, D.H., Isaac-Renton, J.L., Bell, A., Eng, S.B., 1997. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC *Toxoplasma* Investigation Team. *Lancet*, 350, 173–177.

Braeye, T., De Schrijver, K., Wollants, E., Van Ranst, M., Verhaegen, J., 2015. A large community outbreak of gastroenteritis associated with consumption of drinking water contaminated by river water, Belgium, 2010. *Epidemiology and Infection*, 143, 711-719.

Brasseur, P., Uguen, C., Moreno-Sabater, A., Favennec, L., Ballet, J.J., 1998. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in natural waters. *Folia Parasitologica*, 45, 113-116.

Brescia, C.C., Griffin, S.M., Ware, M.W., Varughese, E.A., Egorov, A.I., Villegas, E.N., 2009. *Cryptosporidium* propidium monoazide-PCR, a molecular biology-based technique for genotyping of viable *Cryptosporidium* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 6856–6863.

Brunkard, J.M., Ailes, E., Roberts, V.A., Hill, V., Hilborn, E.D., Craun, G.F., Rajasingham, A., Kahler, A., Garrison, L., Hicks, L., Carpenter, J., 2011. Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water United States, 2007-2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries*, 60, 38-68.

Bryce, J., Boschi-Pinto, C., Shibuya, K., Black, R.E., 2005. WHO child health epidemiology reference group. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*, 365, 1147-1152.

Bultel, C., Derouin, F., 2006. Bulletin épidémiologique trimestriel n°22. *Toxoplasma gondii*. http://agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/documents/be_22.pdf

Buschini, A., Carboni, P., Martino, A., Poli, P., Rossi, C., 2003. Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. *Mutation Research*, 537, 81–92.

Cacciò, S. M., Widmer, G., 2014. *Cryptosporidium*: parasite and disease. Springer, 564 s.

Campbell, I., Tzipori, S., Hutchison, G., Angus, K.W., 1982. Effect of disinfectant on survival of *Cryptosporidium* oocysts. *Veterinary Record*, 111, 414-415.

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.

Carcamo, C., Hooton, T., Wener, M.H., Weiss, N.S., Gilman, R., Arevalo, J., Carrasco, J., Seas, C., Caballero, M., Holmes, K.K., 2005. Etiologies and manifestations of persistent diarrhea in adults with HIV-1 infection: a case-control study in Lima, Peru. *Journal of Infectious Diseases*, 191, 11-19.

Casemore, D.P., Jessop, E.G., Douce, D., Jackson, F.B., 1986. *Cryptosporidium* plus *Campylobacter*: an outbreak in a semi-rural population *Journal of hygiene*, 96, 95–105.

Castro-Hermida, J.A., García-Preedo, I., González-Warleta, M., Mezo, M., 2010. *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies of Galicia, Spain. *Water Research*, 44, 5887-5896.

CDC, 1996. Foodborne outbreak of diarrheal illness associated with *Cryptosporidium parvum*-Minnesota, 1995. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 45, 783-784.

CDC, 1997. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00045558.htm> *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 46, 4-8.

CDC, 1998. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00053914.htm> *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 47, 565-567.

CDC, 2011. Cryptosporidiosis outbreak at a summer camp-North Carolina, 2009. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 60, 918–922.

CDC, 2012. Outbreak of cryptosporidiosis associated with a firefighting response-Indiana and Michigan, June 2011. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 61, 153.

CDC, 2013. Surveillance for water- borne disease outbreaks associated with drinking water and other non-recreational water-United States, 2009-2010. Morbidity and Mortality Weekly Report, 62, 714.

CDC, 2015. Cryptosporidiosis associated with consumption of unpasteurized goat milk-Idaho, 2014. Morbidity and Mortality Weekly Report, 64, 194-195.

Chalmers, R. M., Sturdee, A.P., Mellors, P., Nicholson, V., Lawlor, F., Kenny, K., Timpson, P., 1997. *Cryptosporidium parvum* in environmental samples in the Sligo area, Republic of Ireland: a preliminary report. Letters in Applied Microbiology, 25, 380-384.

Chalmers, R.M., Davies, A.P., 2010. Minireview: clinical cryptosporidiosis. Experimental Parasitology, 124, 138-146.

Chauret, C., Armstrong, N., Fisher, J., Sharma, R., Springthorpe, S., Sattar, S., 1995. Correlating *Cryptosporidium* and *Giardia* with microbial indicators. American Water Works Association 87, 76-84.

Chehrazi-Raffle, A., Luu, M., Yu, Z., Liou, F., Kittleson, M., Hamilton, M., Kobashigawa, J., 2015. *Toxoplasma gondii* serology and outcomes after heart transplantation: contention in the literature. Transplantation Proceedings, 47, 1949-1953.

Cheun, H.I., Kim, C.H., Cho, S.H., Ma, D.W., Goo, B.L., Na, M.S., Youn, S.K., Lee, W.J., 2013. The first outbreak of giardiasis with drinking water in Korea. Osong Public Health and Research Perspectives, 4, 89-92.

Cho, E.J., Yang, J.Y., Lee, E.S., Kim, S.C., Cha, S.Y., Kim, S.T., Lee, M.H., Han, S.H., Park, Y.S., 2013. A waterborne outbreak and detection of *Cryptosporidium* oocysts in drinking water of an older high-rise apartment complex in Seoul. Korean Journal of Parasitology, 51, 461-466.

Chochillon, C., Gobert, J.G., Buchel, L., Savel, J., 1986. *Giardia intestinalis* : étude comparée des débits fécaux lipidiques et azotés chez des adultes et des enfants parasités. Pathologie Biologie, 34, 830-834.

Coetzee, N., Edeghere, O., Orendi, J., Chalmers, R., Morgan, L., 2008. A swimming pool-associated outbreak of cryptosporidiosis in Staffordshire, England, October to December

2007. Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin, 13, pii: 19028.

Collier, S.A., Smith, S., Lowe, A., Hawkins, P., McFarland, P., Salyers, M., Rocco, P., Bumby, G., Maillard, J.M., Williams, C., Fleischauer, A., Radke, V., Roberts, J.M., Hightower, A.W., Bishop, H.S., Mathison, B.A., da Silva, A.J., Carpenter, J., Hayden, A.S., Hlavsa, M.C., Xiao, L., Roberts, V.A., Brunkard, J., Beach, M.J., Hill, V., Yoder, J., Dunbar, E.L., Dearen, T., Bopp, C., Humphrys, M.S., Phillips, G., Chang, L., Meites, E.M., 2011. Cryptosporidiosis outbreak at a summer camp - North Carolina. Morbidity and Mortality Weekly Report, 60, 918-922.

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.

Collins, M.V., Flick, G.J., Smith, S.A., Fayer, R., Rubendall, E., Lindsay, D.S., 2005. The Effects of E-beam Irradiation and Microwave Energy on Eastern Oysters (*Crassostrea virginica*) Experimentally Infected with *Cryptosporidium parvum*. Journal of eukaryotic microbiology, 52, 484-488.

Condoleo, R., Rinaldi, L., Sette, S., Mezher, Z., 2018. Risk Assessment of Human Toxoplasmosis Associated with the Consumption of Pork Meat in Italy. Risk Analysis, 38, 1202-1222.

Conroy, D.A., 1960. A note on the occurrence of *Giardia* sp. in a Christmas pudding. Revista ibérica de parasitología, 20, 567–571.

Contreras, P.J., Urrutia, H., Sossa, K., Nocker, A., 2011. Effect of PCR amplicon length on suppressing signals from membrane-compromised cells by propidium monoazide treatment. Journal of Microbiological Methods, 87, 89–95.

Cooper, M. A., Sterling, C. R., Gilman, R. H., Cama, V., Ortega, Y., Adam, R.D., 2010. Molecular analysis of household transmission of *Giardia lamblia* in a region of high endemicity in Peru. Journal of Infectious Diseases, 202, 1713-1721.

Costa, R., Aldridge, D.C., Moggridge, G.D., 2008. Seasonal variation of zebra mussel susceptibility to molluscicidal agents. *Journal of Applied Ecology*, 45, 1712-1721.

Costafreda, M.I., Bosch, A., Pintó, R.M., 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3846–3855.

Coupe, A., Howe, L., Burrows, E., Sine, A., Pita, A., Velathantriri, N., Vallée, E., Hayman, D., Shapiro, K., Roe, W.D., 2018. First report of *Toxoplasma gondii* sporulated oocysts and *Giardia duodenalis* in commercial green-lipped mussels (*Perna canaliculus*) in New Zealand. *Parasitology Research*, 117, 1453-1463.

Couvreur, J., Thulliez, P., 1996. Toxoplasmose acquise à localisation oculaire ou neurologique. *La Presse Médicale*, 25, 438-442.

Daly, E.R., Roy, S.J., Blaney, D.D., Manning, J.S., Hill, V.R., Xiao, L., Stull, J.W., 2010. Outbreak of giardiasis associated with a community drinking-water source. *Epidemiology and Infection*, 138, 491–500.

Danyluk, M.D., Goodrich-Schneider, R.M., Schneider, K.R., Harris, L.J., Worobo, R.W., 2012. Outbreaks of foodborne disease associated with fruit and vegetable juices. UF/IFAS - University of Florida, Institute of Food and Agricultural Science, 1–7.

Dardé, M.L., 2008. *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence. *Parasite*, 15, 366–371.

Dardé, M.L., Peyron, F., 2002. Toxoplasmose In: DENIS F. Les bactéries, champignons et parasites transmissibles de la mère à l'enfant, John Libbey Eurotest, Paris, 317-347.

Davenel, S., Galaine, J., Guelet, B., Marteil, S., Robert-Gangneux, F., 2010. La toxoplasmose congénitale en France en 2009. *Journal de Pharmacie Clinique*, 29, 5-30.

De Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., Chan, H.M., 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology*. 50, 51-71.

de Moura, L., Bahia-Oliveira, L.M., Wada, M.Y., Jones, J.L., Tuboi, S.H., Carmo, E.H., Ramalho, W.M., Camargo, N.J., Trevisan, R., Graça, R.M., da Silva, A.J., Moura, I., Dubey,

J.P., Garrett, D.O., 2006. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 326-329.

Delaunay, A., Gargala, G., Li, X., Favennec, L., Ballet, J.J., 2000. Quantitative flow cytometric evaluation of maximal *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in a neonate mouse model. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4315-4317.

Delmas, G., Gallay, A., Pihier, N., Weill, F-X., Vaillant, V., de Valk, H., 2006. Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, 51-52, 418-422.

Demar, M., Ajzenberg, D., Maubon, D., Djossou, F., Panchoe, D., Punwasi, W., Valery, N., Peneau, C., Daigre, J.L., Aznar, C., Cottrelle, B., Terzan, L., Dardé, M.L., Carne, B., 2007. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clinical Infectious Diseases*, 45, e88-95.

DeSilva, M.B., Schafer, S., Kendall Scott, M., Robinson, B., Hills, A., Buser, G.L., Salis, K., Gargano, J., Yoder, J., Hill, V., Buser, G.L., Salis, K., Gargano, J., Yoder, J., Hill, V., Xiao, L., Roellig, D., Hedberg, K., 2016. Communitywide cryptosporidiosis outbreak associated with a surface water-supplied municipal water system-Baker City, Oregon, 2013. *Epidemiology and Infection*, 144, 274–284.

Desmonts, G., Couvreur, J., Alison, F., Baudelot, J., Gerbeaux, J., Lelong, M., 1965. Etude épidémiologique sur la toxoplasmose : de l'influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la fréquence de l'infection humaine. *Revue Europeenne D'Etudes Cliniques Et Biologiques*, 10, 952-958.

Di Giovanni, G.D., Lechevallier, M.W., 2005. Quantitative-PCR assessment of *Cryptosporidium parvum* cell culture infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1495–1500.

Dixon, B., 2015. Transmission dynamics of foodborne parasites on fresh produce. *Foodborne parasites in the food supply web: occurrence and control*, 482.

Dixon, B., 2016. Parasitic illnesses associated with the consumption of fresh produce - an emerging issue in developed countries. *Current Opinion in Food Science*, 8, 104-109.

Dubey, J.P., 1998. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *Journal of Protozoology*, 84, 862-865.

Dubey, J.P., 2001. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. *Journal of Parasitology*, 87, 215-219.

Dubey, J.P., 2004. Toxoplasmosis, a waterborne disease. *Veterinary Parasitology*, 126, 57-72.

Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Speer, C.A., 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 267-299.

Dubey, J.P., Miller, N.L., Frenkel, J.K., 1970a. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology*, 56, 447-456.

Dubey, J.P., Miller, N.L., Frenkel, J.K., 1970b. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *Journal of Experimental Medicine*, 132, 636-662.

Dujardin, M., Narbonne, J.F., Alexander, S., 2000. The belgian dioxin crisis. *Biomedical Research*, 21, 337-343.

Dumètre, A., Dardé, M.L., 2003. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 651-661.

Dumètre, A., Dardé, M.L., 2005. Immunomagnetic separation of *Toxoplasma gondii* oocysts using a monoclonal antibody directed against the oocyst wall. *Journal of Microbiological Methods*, 61, 209-217.

Dumètre, A., Dardé, M.L., 2007. Detection of *Toxoplasma gondii* in water by an immunomagnetic separation method targeting the sporocysts. *Parasitology Research*, 101, 989-996.

Dumètre, A., Le Bras, C., Baffet, M., Meneceur, P., Dubey, J.P., Derouin, F., Duguet, J.P., Joyeux, M., Moulin, L., 2008. Effects of ozone and ultraviolet radiation treatments on the infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. *Veterinary Parasitology*, 153, 209-213.

ECDC, 2018a. Cryptosporidiosis - Annual Epidemiological Report for 2015. https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER_for_2015-cryptosporidiosis.pdf

ECDC, 2018b. Giardiasis - Annual Epidemiological Report for 2015. https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER_for_2015-giardiasis.pdf

Edvinsson, B., Lappalainen, M., Evengård, B., ESCMID Study Group for Toxoplasmosis, 2006. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12, 131–136.

EFSA, 2006. Risk Issues. <http://www.efsa.europa.eu/>

EFSA, 2007. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the european union in 2006. *EFSA Journal*, 130, 1–352.

EFSA/ECDC, 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15, 5077.

Efstratiou, A., Ongerth, J.E., Karanis, P., 2017. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011–2016. *Water Research*, 114, 14–22.

Eisenstein, L., Bodager, D., Ginzl, D., 2008. Outbreak of giardiasis and cryptosporidiosis associated with a neighborhood interactive water fountain-Florida, 2006. *Journal of environmental health*, 71, 18–22; quiz 49–50.

Ekdahl, K., Andersson Y., 2005. Imported giardiasis: impact of international travel, immigration, and adoption. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72, 825–830.

Ekman, C.C., Chiossi, M.F., Meireles, L.R., Andrade Júnior, H.F. de, Figueiredo, W.M., Marciano, M.A., Luna, E.J., 2012. Case-control study of an outbreak of acute toxoplasmosis in an industrial plant in the state of São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 54, 239–244.

Elizaquivel, P., Sanchez, G., Aznar, R., 2012. Application of propidium monoazide quantitative PCR for selective detection of live *Escherichia coli* O157:H7 in vegetables after inactivation by essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 159, 115–121.

Elsser, K.A., Moricz, M., Proctor, E.M., 1986. *Cryptosporidium* infections: a laboratory survey. *Canadian Medical Association Journal*, 135, 211–213.

Eraky, M.A., Rashed, S.M., El-Sayed Nasr, M., El-Hamshary, A.M.S., El-Ghannam, A.S., 2014. Parasitic contamination of commonly consumed fresh leafy vegetables in Benha, Egypt. *Journal of Parasitology Research*, 2014.

Erickson, M. C., Ortega, Y. R., 2006. Inactivation of protozoan parasites in food, water, and environmental systems. *Journal of Food Protection*, 69, 2786-2808.

Esch, K.J., Petersen, C.A., 2013. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals *Clinical Microbiology Reviews*, 26, 58-85.

Esmerini, P.O., Gennari, S.M., Pena, H.F.J., 2010. Analysis of marine bivalve shellfish from the fish market in Santos city, São Paulo state, Brazil, for *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*, 170, 8–13.

Ethelberg, S., Lisby, M., Vestergaard, L.S., Enemark, H.L., Olsen, K.E., Stensvold, C.R., Nielsen, H.V., Porsbo, L.J., Plesner, A.M., Mølbak, K., 2009. A foodborne outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection. *Epidemiology & Infection*, 137, 348–356.

Everson, W.V., Ware, M.W., Dubey, J.P., Lindquist, H.D., 2002. Isolation of purified oocyst walls and sporocysts from *Toxoplasma gondii*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49, 344-349.

FAO/OMS, 2003. Garantir la sécurité sanitaire et la qualité des aliments : directives pour le renforcement des systèmes nationaux de contrôle alimentaire
www.wpro.who.int/foodsafety/documents/docs/French_Guidelines_Food_control.pdf

FAO/WHO, 2014. Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites: FAO/WHO, 324 s.

Favennec, L., Magne, D., Chochillon, C., Gargala, G., Gobert, J-G., 2006. Infections intestinales humaines à *Giardia duodenalis*. EMC – Maladies infectieuses, 1-14.

Fayer, R., Graczyk, T.K., Lewis, E.J., Trout, J.M., Farley, C.A., 1998a. Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. Applied and Environmental Microbiology, 64, 1070-1074.

Fayer, R., Morgan, U., Upton, S.T., 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. International Journal for Parasitology, Thematic Issue: Emerging Parasite Zoonoses, 30, 1305-1322.

Fayer, R., Trout, J.M., Jenkins, M.C., 1998b. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. Journal of Parasitology, 84, 1165-1169.

Fayer, R., Trout, J.M., Lewis, E.J., Santin, M., Zhou, L., Lal, A.A., Xiao, L., 2003. Contamination of Atlantic coast commercial shellfish with *Cryptosporidium*. Parasitology Research, 89, 141–145.

Fayer, R., Trout, J.M., Lewis, E.J., Xiao, L., Lal, A., Jenkins, M.C., Graczyk, T.K., 2002. Temporal variability of *Cryptosporidium* in the Chesapeake Bay. Parasitology Research, 88, 998–1003.

Fayer, R., Xiao, L., 2008. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2. utg. Boca Raton: Taylor & Francis. 560 s.

Ferguson, D. J., Birch-Andersen, A., Siim J. C., Hutchison, W. M., 1982. Scanning electron microscopy of the oocyst and sporocyst of *Toxoplasma gondii*. Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica, 90, 269–272.

Ferguson, D.J., Birch-Andersen, A., Siim, J.C., Hutchison, W.M., 1979. Ultrastructural studies on the sporulation of oocysts of *Toxoplasma gondii*. I. Formation of the sporocyst and structure of the sporocyst wall. Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology, 87B, 183–190.

Fever, B., 2012. Giardiasis - *Giardia Enteritis, Lambliasis*.
<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/giardiasis.pdf>

Figueras, M.J., Borrego, J.J., 2010. New perspectives in monitoring drinking water microbial quality. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7, 4179-4202.

Fittipaldi, M., Nocker, A., Codony, F., 2012. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *Journal of Microbiological Methods*, 91, 276–289.

Fittipaldi, M., Pino Rodriguez, N.J., Adrados, B., Agustí, G., Peñuela, G., Morató, J., 2011. Discrimination of viable *Acanthamoeba castellanii* trophozoites and cysts by propidium monoazide real-time polymerase chain reaction. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 58, 359–364.

Fontaine, M., Guillot, E., 2002. Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. *FEMS Microbiology Letter*, 214, 13-17.

FranceAgriMer. Consommation de viande ovine : une baisse difficile à enrayer. Montreuil-sous-Bois : FranceAgriMer, 2012.

Freire-Santos, F., Oteiza-Lopez, A. M., Vergara-Castiblanco, C. A., E. Ares-Mazas, E., E. Alvarez-Suarez, E., Garcia-Martín. O., 2000. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve molluscs destined for human consumption. *Journal of Parasitology*, 86, 853-854.

Freire-Santos, F., Oteiza-Lopez, A.M., Vergara-Castiblanco, C.A., Ares-Mazias, M.E., 1999. Effect of salinity, temperature and storage time on mouse experimental infection by *Cryptosporidium parvum*. *Veterinary Parasitology*, 87, 1-7.

Frenkel, J.K., Dubey, J.P., 1973. Effects of freezing on the viability of *Toxoplasma* oocysts. *Journal of Parasitology*, 59, 587-588.

Freyre, A., Falcón, J., 2004. Massive excystation of *Toxoplasma gondii* sporozoites. *Experimental Parasitology*, 107, 72–77.

Fukushima, H., Katsube, K., Hata, Y., Kishi, R., Fujiwara, S., 2007. Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 92-100.

Fulton, M.H., Key, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 37-45.

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. *Epidemiology and Infection*. 141, 9-21.

Garvey, M., Farrell, H., Cormican, M., Rowan, N., 2010. Investigations of the relationship between use of *in vitro* cell culture-quantitative PCR and a mouse-based bioassay for evaluating critical factors affecting the disinfection performance of pulsed UV light for treating *Cryptosporidium parvum* oocysts in saline. *Journal of Microbiological Methods*, 80, 267–273.

Garvey, M., Stocca, A., Rowan, N., 2014. Development of a combined *in vitro* cell culture quantitative PCR assay for evaluating the disinfection performance of pulsed light for treating the waterborne enteroparasite *Giardia lamblia*. *Experimental Parasitology*, 144, 6–13.

Gasser, R.B., Eckert, J., Rohrer, L., 1987. Infectivity of Swiss *Giardia* isolates to jirds and mice, and *in vitro* cultivation of trophozoites originating from sheep. *Parasitology Research*, 74,103-111.

Gattás, V.L., Nunes, E.M., Soares, A.L.B., Pires, M.A., Pinto, P.L.S., de Andrade, H.F., 2000. Acute toxoplasmosis outbreak at campus of the university of Sao Paulo related to food or water oocyst contamination. In: *Annals of the International Conference on Emerging Infectious Diseases*; Georgia, Atlanta, 135.

Gelletlie, R., Stuart, J., Soltanpoor, N., Armstrong, R., Nichols, G., 1997. Cryptosporidiosis associated with school milk. *Lancet*, 350, 1005–1006.

Geurden, T., Levecke, B., Cacció, S.M., Visser, A., De Grootte, G., Casaert, S., Vercruyse, J., Claerebout, E., 2009. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-outbreak related cases of diarrhoea in human patients in Belgium. *Parasitology*, 136, 1161-1168.

Gherasim, A., Lebbad, M., Insulander, M., Decraene, V., Kling, A., Hjertqvist, M., Wallensten, A., 2012. Two geographically separated food-borne outbreaks in Sweden linked by an unusual *Cryptosporidium parvum* subtype, October 2010. Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin, 17.

Ghozzi, K., Marangi, M., Papini, R., Lahmar, I., Challouf, R., Houas, N., Ben Dhiab, R., Normanno, G., Babba, H., Giangaspero, A., 2017. First report of tunisian coastal water contamination by protozoan parasites using mollusk bivalves as biological indicators. Marine Pollution Bulletin, 117, 197-202.

Giangaspero, A., Molini, U., Iorio, R., Traversa, D., Paoletti, B., Giansante, C., 2005. *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater clams (*Chamelea gallina*) in Italy. Preventive Veterinary Medicine, 69, 203-212.

Gomez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., Tabares, E., Lopez-Rodas, V., Costas, E., 2000. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). Applied and Environmental Microbiology, 66, 1866–1870.

Gómez-Couso, H., Freire-Santos, F., Amar, C.F., Grant, K.A., Williamson, K., Ares-Mazás, M.E., McLauchlin, J., 2004. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR. International Journal of Food Microbiology, 91, 279-288.

Gómez-Couso, H., Freire-Santos, F., Martínez-Urtaza, J., García-Martín, O., Ares-Mazás, M.E., 2003. Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standards. International Journal of Food Microbiology, 87, 97–105.

Gómez-Couso, H., Méndez-Hermida, F., Castro-Hermida, J.A., Ares-Mazás, E., 2005a. *Giardia* in shellfish-farming areas: Detection in mussels, river water and waste waters. Veterinary Parasitology, 133, 13-18.

Gómez-Couso, H., Méndez-Hermida, F., Castro-Hermida, J.A., Ares-Mazás, E., 2005b. Occurrence of *Giardia* cysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) destined for human consumption. Journal of Food Protection, 68, 1702-1705.

Gómez-Couso, H., Méndez-Hermida, F., Castro-Hermida, J.A., Ares-Mazás, E., 2006. Cooking mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by steam does not destroy the infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Food Protection*, 69, 948–950.

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. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78, 404–410.

Graczyk, T. K., Fayer, R., Lewis, E.J., Trout, J.M., Farley, C.A., 1999. *Cryptosporidium* oocysts in Bent mussels (*Ischadium recurvum*) in the Chesapeake Bay. *Parasitology Research*, 85, 518-521.

Graczyk, T.K., Conn, D.B., Lucy, F., Minchin, D., Tamang, L., Moura, L.N.S., Da Silva, 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., Conn, D.B., Marcogliese, D.J., Graczyk, H., 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., Lewis, E.J., Glass, G., Dasilva, A.J., Tamang, L., Girouard, A.S., Curriero, F.C., 2007. Quantitative assessment of viable *Cryptosporidium parvum* load in commercial oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Parasitology Research*, 100, 247–253.

Guiguet, L.D.A., Pereira, M.A., Bueno Franco, R.M., Branco, N., Neto, R.C., 2008. First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and cockles (*Tivela mactroides*) in Brazil. *Journal of Water and Health*, 6, 527-532.

Gyürék, L., Finch, G., and Belosevic, M., 1997. Modeling Chlorine Inactivation Requirements of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of Environmental Engineering*, 123, 865–875.

Habtewold, T., Groom, Z., Duchateau, L., Christophides, G.K., 2015. Detection of viable *Plasmodium* ookinetes in the midguts of *Anopheles coluzzi* using PMA-qrtPCR. *Parasites & Vectors*, 8, 455.

Hajdu, A., Vold, L., Østmo, T.A., Helleve, A., Helgebostad, S.R., Krogh, T., Robertson, L., de Jong, B., Nygård, K., 2008. Investigation of Swedish cases reveals an outbreak of

cryptosporidiosis at a Norwegian hotel with possible links to in-house water systems. *BMC infectious diseases*, 8, 152.

Harito, J.B., Campbell, A.T., Prestrud, K.W., Dubey, J.P., and Robertson, L.J., 2016. Surface binding properties of aged and fresh (recently excreted) *Toxoplasma gondii* oocysts. *Experimental Parasitology*, 165, 88–94.

Harito, J.B., Campbell, A.T., Tysnes, K.R., Dubey, J.P., Robertson, L.J., 2017a. Lectin-magnetic separation (LMS) for isolation of *Toxoplasma gondii* oocysts from concentrated water samples prior to detection by microscopy or qPCR. *Water Research*, 114, 228-236.

Harito, J.B., Campbell, A.T., Tysnes, K.R., Robertson, L.J., 2017b. Use of lectin-magnetic separation (LMS) for detecting *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental water samples. *Water Res.* 127, 68-76.

Harp, J.A., Fayer, R., Pesch, B.A., Jackson, G.J., 1996. Effect of pasteurization on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water and milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2866–2868.

Harper, C.M., Cowell, N.A., Adams, B.C., Langley, A.J., Wohlsen, T.D., 2002. Outbreak of *Cryptosporidium* linked to drinking unpasteurised milk. *Communicable Diseases Intelligence Quarterly Report*, 26, 449–450.

Helmi, K., Skraber, S., Burnet, J.B., Leblanc, L., Hoffmann, L., Cauchie, H.M., 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. *Environmental Monitoring and Assessment*. 179, 163-175.

Herwaldt, B.L., 2001. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 659-688.

Hijjawi, N., 2010. *Cryptosporidium*: New developments in cell culture. *Experimental Parasitology*, 124, 54-60.

Hlavsa, M.C., Roberts, V.A., Anderson, A.R., Hill, V.R., Kahler, A.M., Orr, M., Garrison, L.E., Hicks, L.A., Newton, A., Hilborn, E.D., Wade, T.J., 2011. Surveillance for waterborne

disease outbreaks and other health events associated with recreational water United States, 2007-2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries*, 60, 1-32.

Hlavsa, M.C., Roberts, V.A., Kahler, A.M., Hilborn, E.D., Mecher, T.R., Beach, M.J., Wade, T.J., Yoder, J.S., 2015. Outbreaks of illness associated with recreational water United States, 2011-2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 64, 668-672.

Hlavsa, M.C., Roberts, V.A., Kahler, A.M., Hilborn, E.D., Wade, T.J., Backer, L.C., Yoder, J.S., 2014. Recreational water-associated disease outbreaks United States, 2009-2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 63, 6-10.

Ho, A.Y., Lopez, A.S., Eberhart, M.G., Levenson, R., Finkel, B.S., da Silva, A.J., Roberts, J.M., Orlandi, P.A., Johnson, C.C., Herwaldt, B.L., 2002. Outbreak of cyclosporiasis associated with imported raspberries, Philadelphia, Pennsylvania, 2000. *Emerging infectious diseases*, 8, 783–788.

Hoek, M.R., Oliver, I., Barlow, M., Heard, L., Chalmers, R., Paynter, S., 2008. Outbreak of *Cryptosporidium parvum* among children after a school excursion to an adventure farm, south west England. *Journal of Water and Health*, 6, 333-338.

Hohweyer, J., Cazeaux, C., Travaillé, E., Languet, E., Dumètre, A., Aubert, D., Terryn, C., Dubey, J.P., Azas, N., Houssin, M., Favennec, L., Villena, I., La Carbona, S., 2016. Simultaneous detection of the protozoan parasites *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* and *Giardia* in food matrices and their persistence on basil leaves. *Food Microbiology*, 57, 36–44.

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. *Journal of Food Protection*, 76, 1649-57.

Hugas, M., Tsigarida, E., Robinson, T., Calistri, P., 2007. Risk assessment of biological hazards in the European Union. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 131-135.

Hussein, A.S., 2011. *Cryptosporidium parvum* causes gastroenteritis epidemics in the Nablus region of Palestine. *Tropical Medicine & International Health*, 16, 12-17.

Hynds, P.D., Thomas, M.K., Pintar, K.D.M., 2014. Contamination of groundwater systems in the US and Canada by enteric pathogens, 1990-2013: a review and pooled-analysis. *PLOSOne*, 9, e93301.

Institute of Environmental Science and Research Ltd (ESR), 2006. Annual Summary of Outbreaks in New Zealand 2005.

Institute of Environmental Science and Research Ltd, 2008. Annual Summary of Outbreaks in New Zealand 2007.

Insulander, M., de Jong, B., Svenungsson, B., 2008. A food-borne outbreak of cryptosporidiosis among guests and staff at a hotel restaurant in Stockholm county, Sweden, September 2008. *Eurosurveillance*, 13.

Insulander, M., Silverlås, C., Lebbad, M., Karlsson, L., Mattsson, J.G., Svenungsson, B., 2013. Molecular epidemiology and clinical manifestations of human cryptosporidiosis in Sweden. *Epidemiology and infection*, 141, 1009–1020.

INVS, 2005. Focus : présentation d'un évènement phare de 2005. Cas d'école – *Escherichia coli* sous surveillance dans le Sud-Ouest. Rapport annuel.

Isaac-Renton, J., Bowie, W.R., King, A., Irwin, G.S., Ong, C.S., Fung, C.P., Shokeir, M.O., Dubey, J.P., 1998. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2278-2280.

Isaacs, D., Hunt, G. H., Phillips, A. D., Price, E. H., Raafat, F., Walker-Smith, J. A., 1985. Cryptosporidiosis in immunocompetent children. *Journal of Clinical Pathology*, 38, 76-81.

ISO 15216-1:2013. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche des virus de l'hépatite A et norovirus dans les aliments par la technique RT-PCR en temps réel - Partie 1: Méthode de quantification

ISO 15216-2:2013. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche des virus de l'hépatite A et norovirus dans les aliments par la technique RT-PCR en temps réel - Partie 2: Méthode de détection qualitative.

ISO 18744:2016. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Recherche et dénombrement de *Cryptosporidium* et *Giardia* dans les légumes verts frais à feuilles et les fruits à baies

Ito, S., Tsunoda, K., Shimada, K., Taki, T., Matsui, T., 1975. Disinfectant effects of several chemicals against *Toxoplasma* oocysts. *Nippon Juigaku Zasshi*, 37, 229-234.

Iturriaga, R., Zhang, S., Sonek, G.J., Stibbs, H., 2001. Detection of respiratory enzyme activity in *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts using redox dyes and immunofluorescence techniques. *Journal of Microbiological Methods*, 46, 19–28.

Johansen, Ø.H., Hanevik, K., Thrana, F., Carlson, A., Stachurska-Hagen, T., Skaare, D., Robertson, L.J., 2015. Symptomatic and asymptomatic secondary transmission of *Cryptosporidium parvum* following two related outbreaks in schoolchildren. *Epidemiology and Infection*, 143, 1702-1709.

Johnson, H.L., Liu, L., Fischer-Walker, C., Black, R.E., 2010. Estimating the distribution of causes of death among children age 1–59 months in high-mortality countries with incomplete death certification. *International Journal of Epidemiology*, 39, 1103–1114.

Jones, J.L., Dubey, J.P., 2010. Waterborne toxoplasmosis recent developments. *Experimental Parasitology*, 124, 10–25.

Jones, J.L., Parise, M.E., Fiore, A.E., 2014. Neglected Parasitic Infections in the United States: Toxoplasmosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90, 794-799.

Josefsen, M. H., Lofstrom, C., Hansen, T. B., Christensen, L. S., Olsen, J. E., Hoorfar, J., 2010. Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 5097–5104.

Kacprzak, E., Kurczewska, M., Stefaniak, J., 1990. [2 cases of cryptosporidiosis in adults]. *Przegląd Epidemiologiczny* 44, 245-248.

Kar, S., Gawłowska, S., Dauschies, A., Bangoura, B., 2011. Quantitative comparison of different purification and detection methods for *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Veterinary Parasitology*, 177, 366-370.

Karabiber, N., Aktas, F., 1991. Foodborne giardiasis. *Lancet*, 337, 376–377.

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.

Karon, A.E., Hanni, K.D., Mohle-Boetani, J.C., Beretti, R.A., Hill, V.R., Arrowood, M., Johnston, S.P., Xiao, L., Vugia, D.J., 2011. Giardiasis outbreak at a camp after installation of a slow sand filtration water-treatment system. *Epidemiology and Infection*, 139, 713–717.

Kasper, M.R., Lescano, A.G., Lucas, C., Gilles, D., Biese, B.J., Stolovitz, G., Reeves, E.J., 2012. Diarrhea outbreak during U.S. military training in El Salvador. *PloS one*, 7, e40404.

Keegan, A.R., Fanok, S., Monis, P.T., Saint, C.P., 2003. Cell culture-taqman PCR assay for evaluation of *Cryptosporidium parvum* disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2505–2511.

Kerambrun, E., Palos Ladeiro, M., Bigot-Clivot, A., Dedourge-Geffard, O., Dupuis, E., Villena, I., Aubert, D., Geffard, A., 2016. Zebra mussel as a new tool to show evidence of freshwater contamination by waterborne *Toxoplasma gondii*. *Journal of Applied Microbiology*, 120, 498-508.

Khan, A., Jordan, C., Muccioli, C., Vallochi, A.L., Rizzo, L.V., Belfort, R., Jr, Vitor, R.W.A., Silveira, C., Sibley, L.D., 2006. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 12, 942–949.

Kniel, K.E., Lindsay, D.S., Sumner, S.S., Hackney, C.R., Pierson, M.D., Dubey, J.P., 2002. Examination of attachment and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts on raspberries and blueberries. *Journal of Parasitology*, 88, 790–793.

Korich, D.G., Mead, J.R., Madore, M.S., Sinclair, N.A., Sterling, C.R., 1990. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Applied and environmental microbiology*, 56, 1423–1428.

Kotloff, K.L., Nataro, J.P., Blackwelder, W.C., Nasrin, D., Farag, T.H., Panchalingam, S., Wu, Y., Sow, S.O., Sur, D., Breiman, R.F., Faruque, A.S., Zaidi, A.K.M., Saha, D., Alonso, P.L., Tamboura, B., Sanogo, D., Onwuchekwa, U., Manna, B., Ramamurthy, T., Kanungo, S., Ochieng, J.B., Omere, R., Oundo, J.O., Hossain, A., Das, S.K., Ahmed, S., Qureshi, S., Quadri, F., Adegbola, R.A., Antonio, M., Hossain, M.J., Akinsola, A., Mandomando, I., Nhampossa, T., Acácio, S., Biswas, K., O'Reilly, C.E., Mintz, E.D., Berkeley, L.Y., Muhsen,

K., Sommerfelt, H., Robins-Browne, R.M., Levine, M.M., 2013. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*, 382, 209–222.

Kourenti, C., Heckerroth, A., Tenter, A., Karanis, P., 2003. Development and application of different methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 102-106.

Kramer, M.H., Herwaldt, B.L., Craun, G.F., Calderon, R.L., Juranek, D.D., 1996. Surveillance for waterborne-disease outbreaks-United States, 1993-1994. *MMWR. CDC surveillance summaries: Morbidity and mortality weekly report. CDC surveillance summaries / Centers for Disease Control*, 45, 1–33.

Lalonde, L.F., Gajadhar, A.A., 2016. Optimization and Validation of Methods for Isolation and Real-Time PCR Identification of Protozoan Oocysts on Leafy Green Vegetables and Berry Fruits. *Food and Waterborne Parasitology*, 2, 1-7.

Lass, A., Pietkiewicz, H., Szostakowska, B., Myjak, P., 2012. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31, 1101-1108.

Laxer, M.A., Timblin, B.K., Patel, R.J., 1991. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 45, 688–694.

Le Goff, J., Gallois, J., Pelhuet, L., Devier, M., 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.

LeChevallier, M.W., Di Giovanni, G.D., Clancy, J.L., Bukhari, Z., Bukhari, S., Rosan, J.S., Sobrinho, J., Frey, M.M., 2003. Comparison of method 1623 and cell culture-PCR for detection of *Cryptosporidium* spp. in source waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 971–979.

Lélu, M., Villena, I., Dardé, M.-L., Aubert, D., Geers, R., Dupuis, E., Marnef, F., Poulle, M.-L., Gotteland, C., Dumètre, A., Gilot-Fromont, E., 2012. Quantitative estimation of the viability of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 5127–5132.

Leoni, F., Gómez-Couso, H., Ares-Mazas, M.E., McLauchlin, J., 2007. Multilocus genetic analysis of *Cryptosporidium* in naturally contaminated bivalve molluscs. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2430-2437.

Lévesque, B., Barthe, C., Dixon, B. R., Parrington, L. J., Martin, D., Doidge, B., Proulx, J-F., Murphy, D., 2010. Microbiological quality of blue mussels (*Mytilus edulis*) in Nunavik, Quebec: a pilot study. *Canadian Journal of Microbiology*, 56, 968-977.

Lewis, J.M., Clifford, S., Nsutebu, E., 2015. Toxoplasmosis in immunosuppressed patients. *Rheumatology (Oxford)*, 54, 1939-1940.

Li, X., Atwill, E.R., Dunbar, L.A. et Tate, K.W., 2010. Effect of daily temperature fluctuation during the cool season on the infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 989-993.

Li, X., Guyot, K., Dei-Cas, E., Mallard, J.P., Ballet, J.J., Brasseur, P., 2006. *Cryptosporidium* oocysts in mussels (*Mytilus edulis*) from Normandy (France). *International Journal of Food Microbiology*, 108, 321–325.

Liang, Z., Keeley, A., 2011. Detection of viable *Cryptosporidium parvum* in soil by reverse transcription-real-time PCR targeting hsp70 mRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 6476-6485.

Liang, Z., Keeley, A., 2012. Comparison of propidium monoazide-quantitative PCR and reverse transcription quantitative PCR for viability detection of fresh *Cryptosporidium* oocysts following disinfection and after long-term storage in water samples. *Water Research*, 46, 5941– 5953.

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.

Lindsay, D.S., Holliman, D., Flick, G.J., Goodwin, D.G., Mitchell, S.M., Dubey, J.P., 2008. Effects of high pressure processing on *Toxoplasma gondii* oocysts on raspberries. *Journal of Parasitology*, 94, 757–758.

Lowery, C. J., Nugent, P., Moore, J.E., Millar, B.C., Xiru, X., Dooley, J.S., 2001. PCR-IMS detection and molecular typing of *Cryptosporidium parvum* recovered from a recreational river source and an associated mussel (*Mytilus edulis*) bed in Northern Ireland. *Epidemiology Infection*, 127, 545-553.

Lucy, F.E., Connolly, M., Graczyk, T.K., Tamang, L., Sullivan, M., Mastitsky, S., 2010. Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) are effective sentinels of water quality irrespective of their size. *Aquatic Invasions*, 5, 49–57.

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.

Madeira, A., Búrigo, M.J., 2012. Surto de toxoplasmose no município de Agronômica em Santa Catarina. *Estudos e Avaliação*.

http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/articulacao_tecnica/toxoplasmose-boletim-epidemiológico.pdf

Mahdy, A. K. M., Surin, J., Wan, K. L., Mohd-Adnan, A., Al-Mekhlafi, M. S., Lim, Y. A., 2009. *Giardia intestinalis* genotypes: risk factors and correlation with clinical symptoms. *Acta Tropica*, 112, 67-70.

Mahon, M., Doyle, S., 2017. Waterborne outbreak of cryptosporidiosis in the South East of Ireland: weighing up the evidence. *Irish Journal of Medical Science*, 186, 989-994.

Marangi, M., Giangaspero, A., Lacasella, V., Lonigro, A., Gasser, R.B., 2015. Multiplex PCR for the detection and quantification of zoonotic taxa of *Giardia*, *Cryptosporidium* and *Toxoplasma* in wastewater and mussels. *Molecular and Cellular Probes*, 29, 122-125.

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.

Mattsson, J.G., Insulander, M., Labbad, M., Björkman, C., Svenungsson, B., 2008. Molecular typing of *Cryptosporidium parvum* associated with a diarrhoea outbreak identifies two sources of exposure. *Epidemiology Infectiology*, 136, 1147–1152.

McAuley, J.B., 2014. Congenital Toxoplasmosis. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 3, 30-35.

McKenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *The New England Journal of Medicine*, 331, 161–167.

McKerr, C., Adak, G.K., Nichols, G., Gorton, R., Chalmers, R.M., Kafatos, G., Cosford, P., Charlett, A., Reacher, M., Pollock, K.G., Alexander, C.L., Morton, S., 2015. An outbreak of *Cryptosporidium parvum* across England & Scotland associated with consumption of fresh pre-cut salad leaves, May 2012. *PLoS One*, 10, e0125955.

Meireles, L.R., Ekman, C.C.J., de Andrade, E.F., de Albuquerque Luna, E.J., 2015. Human toxoplasmosis outbreaks and the agent infectious form. Findings from a systematic review. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57, 369–376.

Melicherová, J., Mazourová, V., Valigurová, A., 2016. *In vitro* excystation of *Cryptosporidium muris* oocysts and viability of released sporozoites in different incubation media. *Parasitology Research*, 115, 1113–1121.

Metro Vancouver, 2009. The Greater Vancouver Water District quality control annual report 2009, 1.

Millard, P.S., Gensheimer, K.F., Addiss, D.G., Sosin, D.M., Beckett, G.A., Houck-Jankoski, A., Hudson, A., 1994. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. *Journal of the American Medical Association*, 272, 1592–1596.

Miller, M.A., Miller, W.A., Conrad, P.A., James, E.R., Melli, A.C., Leutenegger, C.M., Dabritz, H.A., Packham, A.E., Paradies, D., Harris, M., Ames, J., Jessup, D.A., 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. *International Journal for Parasitology*, 38, 1319–1328.

Miller, W.A., Atwill, E.R., Gardner, I.A., Miller, M.A., Fritz, H.M., Hedrick, R.P., Melli, A.C., Barnes, N.M., Conrad, P.A., 2005. Clams (*Corbicula fluminea*) as bioindicators of fecal contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in freshwater ecosystems in California. *International Journal for Parasitology*, 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. *Environmental Research*, 109, 843–850.

Mintz, E.D., Hudson-Wragg, M., Mshar, P., Cartter, M.L., Hadler, J.L., 1993. Foodborne giardiasis in a corporate office setting. *The Journal of infectious diseases*, 167, 250–253.

Mohamed, M.A., Siddig, E.E., Elaagip, A.H., Adris, A.M., Nasr, A.A., 2016. Parasitic contamination of fresh vegetables sold at central markets in Khartoum state, Sudan. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 15-17.

Molini, U., Traversa, D., Ceschia, G., Iorio, R., Boffo, L., Zentilin, A., Capelli, G., Giangaspero, A., 2007. Temporal occurrence of *Cryptosporidium* in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in northern Adriatic Italian lagoons. *Journal of Food Protection*, 70, 494-499.

Monis, P.T., Mayrhofer, G., Andrews, R.H., Homan, W.L., Limper, L., Ey, P.L., 1996. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase gene. *Parasitology*, 112, 1–12.

Moon, S., Kwak, W., Lee, S., Kim, W., Oh, J., Youn, S. K., 2013. Epidemiological characteristics of the first water-borne outbreak of cryptosporidiosis in seoul, Korea. *Journal of Korean medical science*, 28, 983–989.

Moriarty, E. M., Duffy, G., Mcevoy, J. M., Cacciò, S., Sheridan, J. J., McDowell, D., Blair, I. S., 2005. The effect of thermal treatments on the viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* on beef surfaces. *Journal of Applied Microbiology* 98, 618–623.

Nam, S., Lee, G., 2010. A new duplex reverse transcription PCR for simultaneous detection of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia duodenalis* cysts. *Biomedical and Environmental Sciences*, 23, 146–150.

Negm, A. Y., 2003. Human pathogenic protozoa in bivalves collected from local markets in Alexandria. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 33, 991-998.

Nelson, J.C., Kauffmann, D.J., Ciavarella, D., Senis, W.J., 1989. Acquired toxoplasmic retinochoroiditis after platelet transfusions. *Annals of Ophthalmology*, 21, 253-254.

Niagara, 2013. Jordan pool reopened after Giardia outbreak [online]. Available from: <http://www.niagarathisweek.com/news-story/3270860-jordan-pool-reopened-after-giardia-outbreak/>

Nikolić, A., Klun, I., Bobić, B., Ivović, V., Vujanić, M., Živković, T., Djurković-Djaković, O., 2011. Human giardiasis in Serbia: asymptomatic vs symptomatic infection. *Parasite*, 18, 197-201.

Nkuipou-Kenfack, E., Engel, H., Fakih, S., Nocker, A., 2013. Improving efficacy of viability-PCR for selective detection of live cells. *Journal of Microbiological Methods*, 93, 20-24.

Nocker, A., Cheung, C-Y., Camper, A.K., 2006. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*, 67, 310-320.

Nova Scotia Environment, 2013. Assessing protozoan risks for surface drinking water supplies in Nova Scotia. Prepared by: Centre for Water Resources Studies, Dalhousie University, Nova Scotia.

Olyaei, A., Hajivandi, L., 2013, Parasitological contamination of markets and farms in vegetables consumed in southern Iran, *Global Veterinaria* 10, 327-331.

Omata, Y., Kawano, T., Ohsawa, T., Sugaya, S., Satake, M., Isamida, T., Koyama, T., Taka, A., Miyazawa, K., Takagi, M., Saito, A., Toyoda, Y., 1999. Infectivity of feline enteroepithelial stages of *Toxoplasma gondii* isolated by Percoll-density gradient centrifugation. *Veterinary Parasitology*, 82, 211-215.

Omowaye, O.S., Audu, P.A., 2012, Incidence and detection of parasitic infections by cyst and ova on fruits and vegetables from different major markets in Kogi, Nigeria, *Journal of Applied and Natural Science* 4, 42-46.

Onbasi, K., Gunsar, F., Sin, A.Z., Ardeniz, O., Kokuludag, A., Sebik, F., 2005. Common variable immunodeficiency (CVID) presenting with malabsorption due to giardiasis. *Turkish Journal of Gastroenterology*, 16, 111-113.

Oosterveer, P., 2002. Reinventing risk politics: Reflective modernity and European BSE crisis. *Journal of Environmental Policy and Planning*, 4, 215-229.

Orlandi, P.A., Chu, D-M. T., Bier, J.W., Jackson, G.J., 2002. Parasites and the Food Supply. *Food Technology*, 56, 72-81.

Ortega, Y.R., Roxas, C.C., Gilman, R.H., Miller, N.J., Cabrera, L., Taquiri, C., Sterling, C.R., 1997. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru. *American Journal of tropical Medicine and hygiene*, 57, 683-686.

Ossani, R.A., Borges, H.A.T., Souza, A.P., Sartor, A.A., Miletti, L.C., Federle, M., Moura, A.B., 2017. *Toxoplasma gondii* in milk of naturally infected dairy ewes on west mesoregion of Santa Catarina state, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 69, 1294-1300.

Osterholm, M.T., Forfang, J.C., Ristinen, T.L., Dean, A.G., Washburn, J.W., Godes, J.R., Rude, R.A., McCullough, J.G., 1981. An outbreak of foodborne giardiasis. *The New England journal of medicine*, 304, 24–28.

Pal, M., Alem, B., Gari, G., Tuli, G., 2014. Toxoplasmosis in animals and humans its diagnosis, epidemiology and control. *International Journal of Livestock Research*, 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.

Palanisamy, M., Madhavan, B., Balasundaram, M., Andavar, R., Venkatapathy, N., 2006. Outbreak of ocular toxoplasmosis in Coimbatore, India. *Indian Journal of Ophthalmology*, 54, 129-131.

Palos Ladeiro, M., Dominique, A., Bigot-Clivot, A., Durand, L., Favennec, L., Gargala, G., Géba, E., La Carbona, S., Le Foll, F., Le Guernic, A., Leprête, M., Pierre, S., Villena, I., Geffard, A., 2018. Mollusc bivalves as indicators of contamination of water bodies by protozoan parasites. In *Encyclopedia of environmental health*.

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.

Peeters, J.E., Mazas, E.A., Masschelein, W.J., Villacorta Martiez de Maturana, I., and Debacker, E., 1989. Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1519–1522.

Pelly, H., Cormican, M., O'Donovan, D., Chalmers, R.M., Hanahoe, B., Cloughley, R., McKeown, P., Corbett-Feeney, G., 2007. A large outbreak of cryptosporidiosis in western Ireland linked to public water supply: a preliminary report. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 12, E070503.3.

Pokorny, N.J., Weir, S.C., Carreno, R.A., Trevors, J.T., Lee, H., 2002. Influence of temperature on *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in river water samples as detected by tissue culture assay. *Journal of Parasitology*, 88, 641-643.

Pönkä, A., Kotilainen, H., Rimhanen-Finne, R., Hokkanen, P., Hänninen, M.L., Kaarna, A., Meri, T., Kuusi, M., 2009. A foodborne outbreak due to *Cryptosporidium parvum* in Helsinki, November 2008. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 14, pii 19269.

Porte, C., Janer, G., Lorusso, L.C., Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., Fossi, M.C., Canesi, L., 2006. Endocrine disruptors in marine organisms: approaches and perspectives.

Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology, 143, 303-315.

Porter, J.D., Gaffney, C., Heymann, D., Parkin, W., 1990. Food-borne outbreak of *Giardia lamblia*. American journal of public health, 80, 1259–1260.

Pozio, E., Morales, M.A., 2005. The impact of HIV-protease inhibitors on opportunistic parasites. Trends in Parasitology, 21, 58-63.

Prado, M.S., Cairncross, S., Strina, A., Barreto, M.L., Oliveira-Assis, A.M., Rego, S., 2005. Asymptomatic giardiasis and growth in young children; a longitudinal study in Salvador, Brazil. Parasitology, 131, 51-56.

Prystajecy, N., Huck, P.M., Schreier, H., Isaac-Renton, J.L., 2014. Assessment of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. as a microbial source tracking tool for surface water: application in a mixed-use watershed. Applied and Environmental Microbiology, 80, 2328-2336.

Public Health Agency of Canada, 2007. C-EnterNet Annual Report 2007.

Putignani, L., Mancinelli, L., Del Chierico, F., Menichella, D., Adlerstein, D., Angelici, M. C., Marangi, M., Berrilli, F., Caffara, M., di Regalbono, D. A. F. Giangaspero, A., 2011. Investigation of *Toxoplasma gondii* presence in farmed shellfish by nested-PCR and real time PCR fluorescent amplicon generation assay (FLAG). Experimental Parasitology, 127, 409-417.

Quick, R., Paugh, K., Addiss, D., Kobayashi, J., Baron, R., 1992. Restaurant-associated outbreak of giardiasis. The Journal of infectious diseases, 166, 673–676.

Quihui-Cota, L., Astiazaran-Garcia, H., Valencia, M.E., Morales-Figueroa, G.G., Lopez-Mata, M.A., Vazquez Ortiz, F., 2008. Impact of *Giardia intestinalis* on vitamin A status in schoolchildren from northwest Mexico. International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 78, 51– 56.

Quiroz, E.S., Bern, C., MacArthur, J.R., Xiao, L., Fletcher, M., Arrowood, M.J., Shay, D.K., Levy, M.E., Glass, R.I., Lal, A., 2000. An outbreak of cryptosporidiosis linked to a foodhandler. The Journal of Infectious Diseases, 181, 695-700.

Rahmati, K., Fallah, M., Hossein Maghsood, A., Shamsi-Ehsan, T., Matini, M., 2017. The prevalence of parasitic contamination of vegetables consumed in Malayer City, west of Iran, during year 2014. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, In press: e42380.

Rawsthorne, H., Dock, C.N., Jaykus, L.A., 2009. PCR-based method using propidium monoazide to distinguish viable from nonviable *Bacillus subtilis* spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 2936-2939.

Reduker, D.W., Speer, C.A., 1985. Factors influencing excystation in *Cryptosporidium* oocysts from cattle. *Journal of Parasitology*. 71, 112–115.

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, 7.

Remington, J.S., McLeod, R., Thulliez, P., Desmonts, G., 2001. Toxoplasmosis. In: Remington, J.S., Klein, J.O. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. Philadelphia, WB Saunders, 205-346.

Remington, J.S., McLeod, R., Thulliez, P., Desmonts, G., 2006. Toxoplasmosis. In: Remington, J.S., Klein, J.O., Wilson, C.B., Baker, C., eds. *Infectious diseases of the foetus and newborn infant*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 947–1091.

Ribeiro, L.A., Santos, L.K.N.S.S., Brito, P.A., Maciel, B.M., Da Silva, A.V., Albuquerque, G.R., 2015. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in brazilian oysters (*Crassostrea rhizophorae*). *Genetics and Molecular Research*, 14, 4658-4665.

Rimhanen-Finne, R., Hänninen, M.-L., Vuento, R., Laine, J., Jokiranta, T.S., Snellman, M., Pitkänen, T., Miettinen, I., Kuusi, M., 2010. Contaminated water caused the first outbreak of giardiasis in Finland, 2007: a descriptive study. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 42, 613–619.

Rimšeliene, G., Vold, L., Robertson, L., Nelke, C., Soli, K., Johansen, O.H., Thrana, F.S., Nygard, K., 2011. An outbreak of gastroenteritis among schoolchildren staying in a wildlife reserve: thorough investigation reveals Norway's largest cryptosporidiosis outbreak. *Scand J Public Health* 39, 287–295.

Ripert, C., Guyot, K., 2003. Cryptosporidiose. In: Epidémiologie des maladies parasitaires. Edition Médicales Internationales, 3, 269-297.

Robertson, L.J., Campbell, A.T., Smith, A.V., 1992. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. Applied and Environmental Microbiology, 58, 3494-3500.

Robertson, L.J., Chalmers, R.M., 2013. Foodborne cryptosporidiosis: is there really more in Nordic countries? Trends in parasitology, 29, 3–9.

Robertson, L.J., Gjerde, B., 2008. Development and use of a pepsin digestion method for analysis of shellfish for *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. Journal of Food Protection, 71, 959-966.

Robertson, L.J., van der Giessen, J.W., Batz, M.B., Kojima, M., Cahill, S., 2013. Have foodborne parasites finally become a global concern. Trends in Parasitology, 29, 101– 103.

Rochelle, P.A., Marshall, M.M., Mead, J.R., Johnson, A.M., Korish, D.G., Rosen, J.S., De Leon, R., 2002. Comparison of *in vitro* cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium parvum*. Applied and Environmental Microbiology, 68, 3809–3817.

Romanova, T.V., Shkarin, V.V., Khazenson, L.B., 1992. Group cryptosporidiosis morbidity in children. Meditsinskaia parazitologiya i parazitarnye bolezni, 3, 50–52.

Rosenthal, M., Pederson, R., Leibsle, S., Hill, V., Carter, K., Roellig, D.M., 2014. Notes from the Field: Cryptosporidiosis associated with consumption of unpasteurized goat milk-Idaho, 2014. Morbidity and Mortality Weekly Report, 64, 194-195.

Rousseau, A., La Carbona, S., Dumètre, A., Robertson, L.J., Gargala, G., Escotte-Binet, S., Favennec, L., Villena, I., Gérard C., Aubert, D., 2018. Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne stages (cysts/oocysts) of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii*: a review of methods. Parasites, 25, 14.

Ryan, U., Fayer, R., Xiao, L., 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. Parasitology 141, 1667–1685.

Ryan, U., Hijjawi, N., Xiao, L., 2018. Foodborne cryptosporidiosis. *International Journal for Parasitology*, 48, 1-12.

Ryan, U., Paparini, A., Tong, K., Yang, R., Gibson-Keuh, S., O'Hara, A., Lymbery, A., Xiao, L., 2015. *Cryptosporidium huwin*. sp. (Apicomplexa: *Eimeriidae*) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Experimental Parasitology*, 150C, 31–35.

Sabin, A.B., 1939. Biological and immunological identity of *Toxoplasma* of animal and human origin. *Proceedings of the Society of Experimental Biology*, 41, 75- 80.

Sagebiel, D., Weitzel, T., Stark, K., Leitmeyer, K., 2009. Giardiasis in kindergartens: prevalence study in Berlin, Germany, 2006. *Parasitology Research*, 105, 681-687.

Saida, L.A., Nooraldeen, N., 2014, Prevalence of parasitic stages in six leafy vegetables in markets of Erbil City, Kurdistan Region-Iraq, *Zanco Journal of Pure and Applied Sciences*, 26, 25-30.

Santos, A.L., de Oliveira, L.T.F., Souza, A.L.A., Hauser-Davis, R.A., De Simone, S.G., 2018. *Cryptosporidium* spp. Contamination in *Perna perna* Mussels Destined for Human Consumption in Southeastern Rio de Janeiro, Brazil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100, 240-244.

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S. L., Griffin, P. M., 2011. Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 7-15.

Schets, F.M., Engels, G.B., During, M., De Roda Husman, A.M., 2005. Detection of infectious *Cryptosporidium* oocysts by cell culture immunofluorescence assay: applicability to environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6793–6798.

Schets, F.M., van den Berg, H.H.J.L., Engels, G.B., Lodder, W.J., de Roda Husman, A.M., 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* in commercial and non-commercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from the Oosterschelde, the Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 189–194.

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., Johne, R., 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 1014-1026.

Shafa-ul-Haq, Azhar Maqbool, Umbreen Javed Khan, Ghazalah Yasmin and Razia Sultana, 2014. Parasitic Contamination of vegetables eaten raw in Lahore. *Zoological Society of Pakistan*, 46, 1303-1309.

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.

Shapiro, K., VanWormer, E., Agullar, B., Conrad, P.A., 2015. Surveillance for *Toxoplasma gondii* in California mussels (*Mytilus californianus*) reveals transmission of atypical genotypes from land to sea. *Environmental Microbiology*, 17, 4177-4188.

Sharley, R., Craven, B., 2001. The 2001 food and mouth crisis – Rural economy and tourism policy complications: A comment. *Current Issues in Tourism*, 4, 527-537.

Simon, A., Rousseau, A.N., 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. *Journal of Environmental Management*, 127, 150–161.

Skinner, L.J., Timperley, A.C., Wightman, D., Chatterton, J.M., Ho-Yen, D.O., 1990. Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goatowner's family. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 22, 359-361.

Slifko, T. R., Huffman, D. E., Rose, J.B., 1999. A most-probable-number assay for enumeration of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3936-3941.

Slifko, T.R., Huffman, D.E., Dussert, B., Owens, J.H., Jakubowski, W., Haas, C.N., Rose, J.B., 2002. Comparison of tissue culture and animal models for assessment of *Cryptosporidium parvum* infection. *Experimental Parasitology*, 101, 97–106.

Slifko, T.R., Smith, H.V., Rose, J.B., 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International journal for parasitology*, 30, 1379–1393.

Smith, A., Reacher, M., Smerdon, W., Adak, G.K., Nichols, G., Chalmers, R.M., 2006. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992- 2003. *Epidemiology & Infection*, 134, 1141-1149.

Smith, J.J., Gunasekera, T.S., Barardi, C.R.M., Veal, D., Vesey, G., 2004. Determination of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability by fluorescence in situ hybridization using a ribosomal RNA-directed probe. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 409–417.

Soave, R., Ruiz, J., Garcia-Saucedo, V., Garrocho, C., and Kean, B.H., 1989. Cryptosporidiosis in a rural community in central Mexico. *The Journal of infectious diseases*, 159, 1160–1162.

Souza, D.S., Piazza, R.S., Pilotto, M.R., do Nascimento Mde, A., Moresco, V., Taniguchi, S., Leal, D.A., Schmidt Éd, Cargin-Ferreira, E., Bicego, M.C., Sasaki, S.T., Montone, R.C., de Araujo, R.A., Franco, R.M., Bouzon, Z.L., Bainy, A.C., Barardi, C.R., 2013. Virus, protozoa and organic compounds decay in deperated oysters. *International Journal of Food Microbiology*. 167, 337-345.

Speer, C.A., Clark, S., Dubey, J.P., 1998. Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology*, 84, 505-12.

Srisuphanunt. M., Wiwanitkit, V., Saksirisampant, W., Karanis, P., 2009. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in green mussels (*Perna viridis*) from shell-fish markets of Thailand. *Parasite*, 16, 235-239.

Sroka, J., Wójcik-Fatla, A., Dutkiewicz, J., 2006. Occurrence of *Toxoplasma gondii* in water from wells located on farms. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 13, 169-175.

Staggs, S.E., Keely, S.P., Ware, M.W., Schable, N., See, M.J., Gregorio, D., Zou, X., Su, C., Dubey, J.P., Villegas, E.N., 2015. The development and implementation of a method using blue mussels (*Mytilus* spp.) as biosentinels of *Cryptosporidium* spp. and *Toxoplasma gondii* contamination in marine aquatic environments. *Parasitology Research*, 114, 4655-4667.

Sterling, R., Seegar, K., Sinclair, N.A., 1986. *Cryptosporidium* as a causative agent of a traveller's diarrhea. *Journal of Infectious Diseases*, 153, 380-381.

Striepen, B., 2013. Parasitic infections: Time to tackle cryptosporidiosis. *Nature*, 503, 189-191.

Sung, K., Hiett, K.L., Stern, N.J., 2005. Heat-treated *Campylobacter* spp. and mRNA stability as determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2, 130-137.

Suresh, P., Rehg, J.E., 1996. Comparative evaluation of several techniques for purification of *Cryptosporidium parvum* oocysts from rat feces. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 38-40.

Taverne, J., 2002. Toxoplasmosis in Brazil (In brief). *Trends in Parasitology*, 18, 203-204.

TDH, 2015. Disease investigations linked to increased raw milk consumption. TDH Investigating Cases Gastrointestinal Disease.

Tebbe, C. C., Vahjen. W., 1993. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 2657-2665.

Tefera, T., Biruksew, A., Mekonnen, Z., Eshetu., T., 2014, Parasitic contamination of fruits and vegetables collected from selected local markets of Jimma Town, southwest Ethiopia, *International Scholarly Research Notices*, 2014.

Tei, F.F., Kowalyk, S., Reid, J.A., Presta, M.A., Yesudas, R., Mayer, D.C., 2016. Assessment and molecular characterization of human intestinal parasites in bivalves from orchard beach, NY, USA. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13, 381.

Ten Winkel, E.H., Davids, C., 1982. Food selection by *Dreissena polymorpha* Pallas (Mollusca: Bivalvia). *Freshwater Biology* 12, 553-558.

Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animal to humans. *International Journal for Parasitology*, 30, 1217-1258.

Theroux, R.B., Wigler, R.L., 1983. Distribution and abundance of east coast bivalve molluscs based on specimen in the National Marine Fisheries Services Woods Hole collection n° SSRF, 768.

Thompson R.C.A., 2008. Giardiasis: modern concepts in control and management. *Annales Nestlé* (English ed.), 66, 23–29.

Thompson, R.C.A., 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and *Giardiasis*. *Veterinary Parasitology*, 126, 15–35.

Thompson, R.C.A., Olson, M.E., Zhu, G., Enomoto, S., Abrahamsen, M.S., Hijjawi, N.S., 2005. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology*, 59, 77–158.

Torgerson, P.R., Devleeschauwer, B., Praet, N., Speybroeck, N., Lee Willingham, A., Kasuga, F., Rokni, M.B., Zhou, X-N., Fèvre, E.M., Sripa, B., Gargouri, N., Fürst, T., Budke, C.M., Carabin, H., Kirk, M.D., Angulo, F.J., Havelaar, A., de Silva N., 2015. World health organization estimates of the global and regional disease burden of 11 foodborne parasitic diseases, 2010: a data synthesis. *PLoS Medicine*, 12, e1001920.

Torgerson, P.R., Mastroiacovo, P., 2013. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bulletin of the World Health Organization*, 91, 501-508.

Tourdjman, M., Tchéandjieu, C., De Valk, H., Goulet, V., Le Strat, Y., 2015. Toxoplasmose chez les femmes enceintes en France : évolution de la séroprévalence et des facteurs associés entre 1995 et 2010, à partir des Enquêtes nationales périnatales. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, 264-272.

Tram, N.T., Dalsgaard, A., 2014. Water used to moisten vegetables is a source of *Escherichia coli* and protozoan parasite contamination at markets in Hanoi, Vietnam. *Journal of Water and Health*, 12, 896–900.

Travaillé, E., La Carbona, S., Gargala, G., Aubert, D., Guyot, K., Dumètre, A., Villena, I., Houssin, M., 2016. Development of a qRT-PCR method to assess the viability of *Giardia intestinalis* cysts, *Cryptosporidium* spp. and *Toxoplasma gondii* oocysts. *Food Control*, 59, 359–365.

Van Dyke, M.I., Ong, C.S.L., Prystajecy, N.A., Isaac-Renton, J.L., Huck, P.M., 2012. Identifying host sources, human health risk and indicators of *Cryptosporidium* and *Giardia* in a Canadian watershed influenced by urban and rural activities. *Journal of Water and Health*, 10, 311-323.

Van Enter, B.J.D., Lau, Y-L., Ling, C.L., Watthanaworawit, W., Sukthana, Y., Lee, W-C., Nosten, F., McGready, R., 2017. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Refugee and Migrant Pregnant Women along the Thailand–Myanmar Border. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97, 232–235.

Vargas-Villarreal, J., Mata-Cárdenas, B.D., Hernández-García, M.E., Garza-González, J.N., De La Garza-Salinas, L.H., González-Salazar, F., 2014. Modified PEHPS medium as an alternative for the *in vitro* culture of *Giardia lamblia*. *BioMed Research International*, 2014, 714173.

Vaudaux, J.D., Muccioli, C., James, E.R., Silveira, C., Magargal, S.L., Jung, C., Dubey, J.P., Jones, J.L., Doymaz, M.Z., Bruckner, D.A., Belfort, R., Jr, Holland, G.N., Grigg, M.E., 2010. Identification of an atypical strain of *toxoplasma gondii* as the cause of a waterborne outbreak of toxoplasmosis in Santa. *Journal of Infectious Diseases*, 202, 1226-1233.

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.

Villegas, E.N., Augustine, S.A.J., Villegas, L.F., Ware, M.W., See, M.J., Lindquist, H.D.A., Schaefer III, F.W., Dubey, J.P., 2010. Using quantitative reverse transcriptase PCR and cell culture plaque assays to determine resistance of *Toxoplasma gondii* oocysts to chemical sanitizers. *Journal of Microbiological Methods*, 81, 219–225.

Villena, I., Aubert, D., Gomis, P., Ferte, H., Ingland, J.C., Denis-Bisiaux, H., Dondon, J.M., Pisano, E., Ortis, N., Pinon, J.M., 2004. Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocysts detection in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4035-4039.

Voets, J., Talloen, W., de Tender, T., Dongen, S., Covaci, A., Blust, R., Bervoets, L., 2006. Microcontaminant accumulation, physiological condition and bilateral asymmetry in zebra

mussels (*Dreissena polymorpha*) from clean and contaminated surface waters. *Aquatic Toxicology*, 79, 213–225.

Vojdani, J.D., Beuchat, L.R., Tauxe, R.V., 2008. Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. *Journal of Food Protection*, 71, 356–364.

Vrtacnik, P., Kos, S., Bustin, S.A., Marc, J., Ostanek, B., 2014. Influence of trypsinization and alternative procedures for cell preparation before RNA extraction on RNA integrity. *Analytical Biochemistry*, 463, 38-44.

Wainwright, K.E., Lagunas-Solar, M., Miller, M.A., Barr, B.C., Gardner, I.A., Pina, C., Melli, A.C., Packham, A.E., Zeng, N., Truong, T., Conrad, P.A., 2007a. Physical inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5663–5666.

Wainwright, K.E., Lagunas-Solar, M., Miller, M.A., Barr, B.C., Melli, A.C., Packham, A.E., Zeng, N., Truong, T., Conrad, P.A., 2010. Radiofrequency-induced thermal inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. *Zoonoses Public Health*, 57, 74–81.

Wainwright, K.E., Miller, M.A., Barr, B.C., Gardner, I.A., Melli, A.C., Essert, T., Packham, A.E., Truong, T., Lagunas-Solar, M., Conrad, P.A., 2007b. Chemical inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. *Journal of Parasitology*, 93, 925–931.

Waldron, L.S., Ferrari, B.C., Cheung-Kwok-Sang, C., Beggs, P.J., Stephens, N., Power, M.L., 2011. Molecular epidemiology and spatial distribution of a waterborne cryptosporidiosis outbreak in Australia. *Applied and environmental microbiology*, 77, 7766–7771.

Wam, E.C., Sama, L.F., Ali, I.M., Ebile, W.A., Aghangu, L.A., Tume, C.B., 2016. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* IgG and IgM antibodies and associated risk factors in women of child-bearing age in Njinikom, NW Cameroon. *BMC research notes*, 9, 406.

Ware, M.W., Augustine, S.A.J., Erisman, D.O., See, M.J., Wymer, L., Hayes, S.L., Dubey, J.P., Villegas, E.N., 2010. Determining UV inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts by using cell culture and a mouse bioassay. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 5140–5147.

Watts, E.A., Dhara, A., Sinai, A.P., 2017. Purification *Toxoplasma gondii* tissue cysts using percoll gradients. *Current Protocols in Microbiology*, 45, 20C.2.1–20C.2.19.

White, K.E., Hedberg, C.W., Edmonson, L.M., Jones, D.B., Osterholm, M.T., MacDonald, K.L., 1989. An outbreak of giardiasis in a nursing home with evidence for multiple modes of transmission. *Journal of infectious diseases*, 160, 298– 304.

WHO, 2015. WHO estimates of the global burden of foodborn diseases. Foodborn diseases burden epidemiology reference group 2007-2015. World Health Organization. http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/

Widmer, G., Sullivan, S., 2012. Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. *Parasite immunology*, 34, 61–71.

Wilking, H., Thamm, M., Stark, K., Aebischer, T., Seeber, F., 2016. Prevalence, incidence estimations, and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. *Scientific Reports*, 6, 22551.

Willis, J.E., McClure, J.T., McClure, C., Spears, J., Davidson, J., Greenwood, S.J. 2014. Bioaccumulation and elimination of *Cryptosporidium parvum* oocysts in experimentally exposed Eastern oysters (*Crassostrea virginica*) held in static tank aquaria. *International Journal of Food Microbiology*, 173, 72-80.

Winter, J.E., 1973. The filtration rate of *Mytilus Edulis* and its dependence on algal concentration, measured by a continuous automatic recording apparatus. *Marine Biology*, 22, 317-328.

Xiao, L., Zhang, L., Wang, H.H., 2012. Critical issues in detecting viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time reverse transcriptase PCR. *Journal of Food Protection*, 75, 512-517.

Xiao, S., Yin, P., Zhang, Y., Zhao, X., Sun, L., Yuan, H., Lu, J., Hu, S., 2018. Occurrence, genotyping, and health risk of *Cryptosporidium* and *Giardia* in recreational lakes in Tianjin, China. *Water Research*, 141, 46-56.

Yang, J., Lee, D., Afaisen, S., Gadi, R., 2013. Inactivation by lemon juice of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytogenes* in beef marinating for the ethnic food kelaguen. *International Journal of Food Microbiology*, 160, 353–359.

Yielding, L.W., Yielding, K.L., Donoghue, J.E., 1984. Ethidium binding to deoxyribonucleic acid: spectrophotometric analysis of analogs with amino, azido, and hydrogen substituents. *Biopolymers*, 23, 83–110.

Yilmaz, S.M., Hopkins, S.H., 1972. Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. *Journal of Parasitology*, 58, 938-939.

Yoder, J.S., Hlavsa, M.C., Craun, G.F., Hill, V., Roberts, V., Yu, P.A., Hicks, L.A., Alexander, N.T., Calderon, R.L., Roy, S.L., Beach, M.J., Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2008. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water use and other aquatic facility-associated health events-United States, 2005-2006. *Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries* (Washington, D.C.: 2002), 57, 1–29.

Yoshida, H., Matsuo, M., Miyoshi, T., Uchino, K., Nakaguchi, H., Fukumoto, T., Teranaka, Y., Tanaka, T., 2007. An outbreak of cryptosporidiosis suspected to be related to contaminated food, October 2006, Sakai City, Japan. *Japanese journal of infectious diseases*, 60, 405–407.

Younas, M., Shah, S., Talaat, A., 2008. Frequency of *Giardia lamblia* infection in children with recurrent abdominal pain. *Journal of the Pakistan Medical Association*, 58, 171-174.

Zhao, Z., Wang, R., Zhao, W., Qi, M., Zhao, J., Zhang, L., Li, J., Liu, A., 2015. Genotyping and subtyping of *Giardia* and *Cryptosporidium* isolates from commensal rodents in China. *Parasitology*, 142, 800–806.