



Etude de la survie et de l'adhérence des oocystes de *Cryptosporidium parvum* sur une matrice alimentaire végétale : la mâche

Sophie Kubina

► To cite this version:

Sophie Kubina. Etude de la survie et de l'adhérence des oocystes de *Cryptosporidium parvum* sur une matrice alimentaire végétale : la mâche. Sciences agricoles. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMR070 . tel-03517487

HAL Id: tel-03517487

<https://theses.hal.science/tel-03517487>

Submitted on 7 Jan 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Étude de la survie et de l'adhérence des oocystes de *Cryptosporidium parvum* sur une matrice alimentaire végétale : la mâche

Présentée et soutenue par
Sophie KUBINA

Thèse soutenue le 08/10/2021
devant le jury composé de

M. Philippe JACQUIET	PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS, École nationale vétérinaire de Toulouse	Président
Mme Isabelle BERTRAND	MAÎTRE DE CONFÉRENCES, HDR, Université de Lorraine	Rapporteur
Mme Nathalie KAPEL	PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS, Université Paris 5 Université Paris-Descartes	Rapporteur
Mme Sonia LACROIX-LAMANDÉ	CHARGÉ DE RECHERCHE, Université de Tours	Examineur
Mme Stéphanie LA CARBONA	RESPONSABLE DE PROJETS, Actalia Sécurité des aliments, Saint-Lô	Examineur
M. Romy RAZAKANDRAINIBE	MAÎTRE DE CONFÉRENCES, Université de Rouen Normandie	Examineur
M. Loïc FAVENNEC	PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
Mme Isabelle VILLENA	PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS, Université de Reims Champagne-Ardenne	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par Loïc FAVENNEC et Isabelle VILLENA, EA7510 ESCAPE :
épidémiosurveillance et circulation des parasites dans les environnements

Remerciements

Je souhaite exprimer ici ma profonde gratitude à tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidée à mener à bien ce travail de thèse. Vous avez été à mes côtés, m'avez soutenue dans mon aventure rouennaise et m'avez permis de m'épanouir tant personnellement que professionnellement.

À mes directeurs de thèse :

Loïc, je tiens tout d'abord à te remercier pour ton accueil si chaleureux, ta bienveillance et ton soutien sans faille pendant ces 4 années. Merci pour ta confiance et tout le temps que tu m'as consacré pour nos longues discussions si enrichissantes.

Isabelle, je vous remercie d'avoir toujours été présente et disponible, malgré la distance, lors de nos réunions et de nos entretiens. Il m'a ainsi été permis de bénéficier de vos encouragements et de vos précieux conseils.

À Stéphanie :

Un immense merci pour ton investissement dans ce travail, pour le soutien et les encouragements que tu m'as apportés. Nos nombreux échanges si enrichissants et formateurs m'ont éclairée, guidée et aidée à y arriver. Je tiens à te remercier chaleureusement pour ta confiance, ta disponibilité, ta patience et ta bienveillance.

À Romy et Damien :

Je vous remercie d'avoir été à mes côtés, d'avoir su me conseiller et me guider. Merci pour les super moments que nous avons passés ensemble. J'en garde de merveilleux souvenirs tant personnels que professionnels.

Aux membres de mon jury de thèse :

M. le Professeur Philippe JACQUIET, président ; Mme le Professeur Nathalie KAPEL et Mme Isabelle BERTRAND, rapporteurs ; Mme Sonia LACROIX-LAMANDÉ, M. le Professeur Loïc FAVENNEC, Mme le Professeur Isabelle VILLENA, Mme Stéphanie LA CARBONA, M. Romy RAZAKANDRAINIBE, examinateurs ; vous me faites un très grand honneur d'accepter de juger mon travail. J'en suis très fière et je vous en remercie.

À mon comité de suivi individuel :

Merci à M. le Professeur Alain MANRIQUE, M. Fabrice LAURENT, M. Aurélien DUMETRE et M. David VIENNET pour nos échanges enrichissants. Je souhaite exprimer ici une reconnaissance particulière envers Aurélien pour le partage de données de perméabilité que j'ai intégré dans mes résultats.

À tous mes collègues :

Un grand merci à mes collègues du CHU : Marion, Isabelle, Émilie, Laura, Hélène, José, Anthony, Florence, Denis et Gilles. Merci également à mes collègues de l'EA7510, Marion, Venceslas, Ibrahima, Jean-Jacques, Dominique et Sandie, et à nos stagiaires, notamment, Martin, Charlène, et Théo. Marion, mon binôme, ma collègue de bureau, avec qui j'ai pu partager mes émotions, mes joies, mes tristesses et parfois mon stress, je te remercie pour ton immense soutien. Catherine, merci pour ta bienveillance, pour nos échanges si constructifs et tes précieux conseils, ainsi que ton accueil si chaleureux lors de mes séjours inoubliables chez ACTALIA. Vous m'avez accueilli les bras ouverts et le sourire aux lèvres. C'était si agréable de travailler à vos côtés. Vous allez me manquer !

À mes amis rouennais :

Merci à ma Cassou et son chéri, Jean-Baptiste, pour tous les bons moments passés ensemble. Sans vous, mon séjour à Rouen n'aurait pas été le même...

À mes proches :

Un immense merci à mes parents, à ma sœur, à mon beau-frère et à ma tante, Maryse, Martial, Julie, Julien et Maryline. Merci également à ma meilleure amie, Marine et son chéri, Paul. Je vous remercie tous qui, depuis toujours, êtes à mes côtés, et pour votre énorme soutien qui m'a permis d'aller si loin.

Une pensée particulière :

À Mme Laetitia LE GOFF et M. le Professeur Ermanno CANDOLFI à qui je dois énormément, ainsi qu'à mon grand-père et mon oncle, partis trop tôt. J'aurais tant aimé partager tout ça avec vous.

Le dernier mais pas le moindre :

Je tiens à dédier ce manuscrit à mon chéri, Théo. Merci pour ton soutien inconditionnel, ton courage et ta force, malgré la distance, dans nos projets tant professionnels que personnels.

Avant – propos

Les travaux présentés dans ce manuscrit, sont consacrés à l'étude de la survie, de la persistance et de l'adhérence des oocystes de *Cryptosporidium parvum* à la surface d'une matrice alimentaire végétale : la mâche. L'objectif est de mieux comprendre la circulation de ce parasite dans l'environnement, en particulier, sa transmission alimentaire. Cette thèse s'inscrit dans le programme de l'Unité Mixte Technologique ACTIA PROTORISK, correspondant au partenariat entre ACTALIA Sécurité des aliments, un centre d'expertise en agroalimentaire, et l'unité de recherche universitaire, EA 7510 ESCAPE (Universités de Rouen Normandie et de Reims Champagne-Ardenne). Dans le contexte d'émergence des maladies parasitaires d'origine alimentaire ces dernières années, l'UMT a pour objectifs de proposer des outils d'analyse et étudier l'exposition à *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* et *Toxoplasma gondii* depuis la production primaire (végétaux, mollusques) jusqu'au consommateur.

La première partie de ce manuscrit est dédiée à l'étude bibliographique exposant la problématique de recherche traitée dans cette thèse. Elle présente également les questionnements opérationnels et académiques à l'origine du sujet de recherche. Nous abordons de manière globale le parasite du genre *Cryptosporidium* et ses modes de transmission à l'Homme. Un accent tout particulier est mis sur la transmission alimentaire du parasite et les risques pour l'Homme *via* la consommation d'aliments contaminés. La grande résistance de *Cryptosporidium* dans l'environnement et face aux agents désinfectants utilisés dans l'industrie agroalimentaire, se traduisant par une émergence d'épidémies d'origine alimentaire causées par ce parasite, est également abordée. Des aspects plus techniques sont présentés notamment sur la difficulté de pouvoir détecter *Cryptosporidium* dans les aliments et le manque de méthodes adaptées aux matrices alimentaires pour mettre en évidence la présence de parasites infectieux.

Les travaux expérimentaux sont présentés en deux chapitres. Le premier est axé sur l'évaluation de la survie et de la persistance des oocystes de *Cryptosporidium parvum* à la surface de la mâche en cours de croissance, ainsi qu'après un lavage mimant les conditions industrielles de 4^{ème} gamme. Si le parasite est capable de persister sur la mâche (et de survivre), cela est lié à ses capacités d'adhérence. Ces notions sont totalement inexplorées à l'heure actuelle. Le second chapitre vise à caractériser les interactions impliquées entre les oocystes et les feuilles de mâche et, à évaluer l'impact de certains paramètres environnementaux sur cette

adhérence parasitaire. Enfin, ce manuscrit est clôturé par une conclusion générale et des annexes. En annexe est également présenté un article publié dans le cadre d'une étude collaborative entre l'EA 7510 ESCAPE et *Cryptosporidium* Reference Unit en Angleterre visant à adapter une méthode de détection du parasite présent sur des feuilles d'épinards, à laquelle j'ai pu participer.

Valorisation

- **Articles :**

- **Kubina S.**, Costa D., Favennec L., Gargala G., Rousseau A., Villena I., La Carbona S., Razakandrainibe R. 2021. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts from lamb's lettuce: CC-qPCR's intake. 9, 215. DOI : 10.3390/microorganisms9020215.
→ Revue à comité de lecture : Microorganisms
- La Carbona S., **Kubina S.** Détecter les *Cryptosporidium* infectieux dans les aliments. 2021.
→ Revue de l'industrie agroalimentaire
- **Kubina S.**, Costa D., Favennec L., Gargala G., Rousseau A., Villena I., La Carbona S. & Razakandrainibe R. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts from lamb's lettuce: CC-qPCR's intake. 2021.
→ Newsletter de la Société Française de Microbiologie

- **Autres communications :**

- **Kubina S.**, Costa D., Villena I., Favennec L., Razakandrainibe R. & La Carbona S. Insight into molecular interaction between *Cryptosporidium parvum* and the lamb's lettuce. 2021, Sociétés Françaises de Parasitologie et de Mycologie Médicale.
→ Communication affichée
- **Kubina S.**, Costa D., Villena I., Favennec L., Razakandrainibe R. & La Carbona S. Insight into molecular interaction between *Cryptosporidium parvum* and the lamb's lettuce. 2021, Société Française de Microbiologie.
→ Communication affichée
- **Kubina S.**, Costa D., Picoche B., Villena I., Favennec L., Razakandrainibe R. & La Carbona S. Persistance et survie des oocystes de *Cryptosporidium parvum* à la surface de la mâche. 2020, Journée scientifique de la Fédération de Recherche Régionale « Sécurité Sanitaire, Bien-être et Aliments Durables ».
→ Communication orale

- **Kubina S., Razakandrainibe R., Costa D., Diawara E.H.I., Rousseau A., La Carbona S., Villena I. & Favennec L.** Influence of prior excystation procedures on *Cryptosporidium parvum* proliferation in HCT-8 host cell culture. 2019, 7th International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference.
→ Communication orale et affichée

- **Kubina S., Razakandrainibe R., Costa D., Diawara E.H.I., Rousseau A., La Carbona S., Villena I. & Favennec L.** Influence of prior excystation procedures on *Cryptosporidium parvum* proliferation in HCT-8 host cell culture. 2019, SFP-SFMM « One Health : De l'animal à l'homme en Parasitologie-Mycologie ».
→ Communication orale et affichée

- **Kubina S., Razakandrainibe R., Costa D., Diawara E.H.I., Rousseau A., La Carbona S., Villena I. & Favennec L.** Influence of prior excystation procedures on *Cryptosporidium parvum* proliferation in HCT-8 host cell culture. 2019, Journée Normande de Recherche Biomédicale.
→ Communication affichée

Sommaire



Sommaire

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	23
I. <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP.	23
A. HISTORIQUE	23
B. SYSTEMATIQUE ET TAXONOMIE	24
II. BIOLOGIE DU PARASITE	27
A. CYCLE DE VIE	27
B. MORPHOLOGIE DES DIFFERENTS STADES PARASITAIRES	29
a. L'oocyste	29
b. Le sporozoïte	29
c. Les autres stades parasitaires et leur particularité	30
C. PATHOGENICITE ET VIRULENCE	32
a. Pouvoir pathogène de <i>Cryptosporidium</i>	32
b. Facteurs de virulence	33
III. LA CRYPTOSPORIDIOSE	35
A. PRESENTATION CLINIQUE	35
B. DIAGNOSTIC DE LA CRYPTOSPORIDIOSE	37
C. TRAITEMENTS DE LA CRYPTOSPORIDIOSE	39
D. EPIDEMIOLOGIE	41
a. En Europe	42
b. En France	43
IV. TRANSMISSION DU PARASITE A L'HOMME	43
A. SURVIE DES OOCYSTES	44
B. MODES DE TRANSMISSION	45
C. TRANSMISSION ALIMENTAIRE	46
a. Prévalence dans les aliments	46
b. Cryptosporidiose d'origine alimentaire	48
V. METHODES DE DETECTION DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> DANS LES ALIMENTS	50
A. DETECTION DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>	50
B. DETECTION DE PARASITES VIABLES	51
C. DETECTION DE PARASITES INFECTIEUX	53
VI. LA MACHE : <i>VALERIANELLA LOCUSTA</i>	53
VII. SECURITE SANITAIRE DES ALIMENTS	56
A. IMPACTS SOCIAUX, ECONOMIQUES ET SANITAIRES	56
B. REGLEMENTATION EN AGROALIMENTAIRE	57
OBJECTIFS ET STRATEGIES DE RECHERCHE	60

CHAPITRE 1 : ÉTUDE DE LA PERSISTANCE ET DE LA SURVIE DE <i>CRYPTOSPORIDIUM PARVUM</i> A LA SURFACE DE LA MACHE	63
I. INTRODUCTION	63
II. MATERIEL ET METHODES	65
A. MATERIEL	65
a. Les oocystes de <i>Cryptosporidium parvum</i>	65
b. La mêche	65
c. La lignée cellulaire HCT-8	66
B. METHODES	66
a. Purification des oocystes de <i>C. parvum</i> à partir des selles de veaux	66
b. Dénombrement des oocystes	69
c. Vérification de la qualité de la suspension parasitaire purifiée	70
d. Évaluation de la perméabilité de la paroi de l'oocyste	70
e. Contamination expérimentale de la mêche et purification des oocystes	71
f. Évaluation du dékystement <i>in vitro</i> des oocystes	72
g. Préparation des parasites pour infection de cultures cellulaires HCT-8	73
h. Évaluation de l'infectiosité du parasite par infection de cultures cellulaires et détECTION PAR PCR EN TEMPS RÉEL (CC-qPCR)	74
i. Marquage de <i>C. parvum</i> au cours de l'infection cellulaire	77
j. Évaluation de la persistance et de la survie des oocystes.	77
k. Présentation des résultats	79
l. Analyses statistiques	80
III. RESULTATS	81
A. METHODES DE PURIFICATION DES OOCYSTES DE <i>C. PARVUM</i> A PARTIR DE SELLES DE VEAUX	81
a. Rendement d'extraction	81
b. Qualité de la suspension parasitaire obtenue	82
c. Perméabilité de la paroi des oocystes purifiés	83
B. METHODE D'EXTRACTION DES OOCYSTES DE <i>C. PARVUM</i> A PARTIR DE LA MACHE	83
a. Optimisation du tampon d'élution	84
b. Optimisation du protocole d'extraction des oocystes à partir de la mêche	85
C. DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE <i>IN VITRO</i> POUR L'ÉVALUATION DE L'INFECTION DE <i>C. PARVUM</i>	86
a. Rendement de dékystement des oocystes	86
b. Cinétique d'infection des cellules HCT-8 par inoculation d'oocystes dékystés ou non-	89
c. Limite de détection de la méthode CC-qPCR	91
D. ÉTUDE DE LA PERSISTANCE ET DE LA SURVIE DE <i>C. PARVUM</i> SUR LA MACHE EN COURS DE CROISSANCE	94
E. IMPACT DU PROCÉDE DE 4 ^{EME} GAMME SUR LA PERSISTANCE ET LA SURVIE DE <i>C. PARVUM</i> A LA SURFACE DE LA MACHE	96
IV. DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	99
A. METHODES DE PURIFICATION DE <i>C. PARVUM</i> A PARTIR DE SELLES DE VEAUX	99

B. METHODE D'EXTRACTION DE <i>C. PARVUM</i> A PARTIR DE LA MACHE -----	99
C. DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE <i>IN VITRO</i> POUR L'EVALUATION DE L'INFECTIOSITE DE <i>C. PARVUM</i> -----	101
D. ÉTUDE DE LA PERSISTANCE ET DE LA SURVIE DE <i>C. PARVUM</i> SUR LA MACHE -----	103

CHAPITRE 2 : ÉTUDE DE L'ADHERENCE DE *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* A LA SURFACE DE LA MACHE ----- 117

I. INTRODUCTION-----	117
II. MATERIELS ET METHODES-----	119
A. MATERIEL-----	119
B. METHODES-----	119
a. Préparation des suspensions parasitaires-----	119
b. Inoculation des oocystes et évaluation de l'adhérence du parasite sur la mâche----	120
c. Mise en évidence de la présence de sucres à la surface de l'oocyste par cytométrie en flux-----	121
d. Présentation des résultats et analyses statistiques -----	122
III. RESULTATS -----	123
A. INTERACTIONS NON SPECIFIQUES -----	123
a. Liaisons électrostatiques-----	123
b. Liaisons ioniques -----	124
B. INTERACTIONS SPECIFIQUES -----	125
a. Identification indirecte de sucres potentiellement impliqués dans l'interaction entre l'oocyste et la mâche <i>via</i> leurs récepteurs-----	126
b. Identification directe des sucres impliqués dans l'interaction entre l'oocyste et la mâche-----	128
c. Mise en évidence des sucres impliqués dans l'interaction à la surface des oocystes	131
IV. DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES -----	134
A. INTERACTIONS NON SPECIFIQUES -----	134
B. INTERACTIONS SPECIFIQUES -----	136

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES ----- 140

ANNEXES ----- 145

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ----- 156

Figures



Figures

Figure 1 – Cycle de vie de <i>Cryptosporidium</i>.	27
Figure 2 – Structure d'un oocyste, après cryofracture, observé au microscope à transmission.	29
Figure 3 – Structure d'un sporozoïte (coupe longitudinale), observé par microscopie à transmission.	30
Figure 4 – Les différents stades intracellulaires de <i>Cryptosporidium</i> observés par microscopie électronique à transmission.	30
Figure 5 – Représentation schématique de la vacuole parasitophore et l'organelle nourricier de <i>Cryptosporidium</i> spp.	31
Figure 6 – Facteurs de virulence de <i>Cryptosporidium</i> et leurs contributions au cycle de vie parasitaire.	33
Figure 7 – Photographies d'oocystes de <i>Cryptosporidium</i> observés par microscopie optique après différentes colorations (A, B et C) et par microscopie à fluorescence (D).	39
Figure 8 – Distribution du nombre de cas de cryptosporidiose par 100 000 habitants (adultes et enfants compris) en Europe en 2017.	42
Figure 9 – Mode de transmission de <i>Cryptosporidium</i>.	45
Figure 10 – Photographie de bouquets de mâche.	54
Figure 11 – Protocole de récupération et de purification des oocystes à partir de la mâche contaminée.	72
Figure 12 – Photographie de sporozoïtes libres (A) et d'un oocyste (B).	73
Figure 13 – Procédure pour évaluer l'infectiosité du parasite.	76
Figure 14 – Suivi de la croissance d'un plant de mâche.	78
Figure 15 – Protocole mimant le procédé industriel de 4^{ème} gamme.	79
Figure 16 – Représentation des données par « boîte à moustache ».	79
Figure 17 – Rendement d'extraction des oocystes de <i>C. parvum</i> à partir de selles de veaux par différentes méthodes.	81
Figure 18 – Qualité de la suspension parasitaire obtenue après purification des oocystes.	82
Figure 19 – Rendement d'extraction des oocystes récupérés de la mâche en fonction du pH du tampon d'élution.	85
Figure 20 – Rendement d'extraction des oocystes récupérés de la mâche selon le protocole utilisé.	85
Figure 21 – Cinétique de dékystement des oocystes dans différentes conditions.	88

Figure 22 – Cinétiques d’infection des cellules HCT-8 par inoculation d’oocystes dékystés ou non.	89
Figure 23 – Cinétique d’infection des cellules HCT-8 par <i>C. parvum</i> observée par microscopie à fluorescence.	90
Figure 24 – Courbes standards des résultats obtenus par CC-qPCR basée sur l’infection de cellules HCT-8 inoculées avec des oocystes purifiés non dékystés.	92
Figure 25 – Courbes standards des résultats obtenus par CC-qPCR basée sur l’infection de cellules HCT-8 par inoculation d’oocystes récupérés de la mâche et non dékystés.	93
Figure 26 – Persistance de <i>C. parvum</i> à la surface de feuilles de mâche en cours de croissance.	94
Figure 27 – Persistance de <i>C. parvum</i> sur la mâche après le procédé de lavage 4^{ème} gamme.	97
Figure 28 – Sélection de la population étudiée grâce à un témoin négatif	122
Figure 29 – Adhérence des oocystes de <i>C. parvum</i> à la surface de la mâche en fonction du pH de la suspension parasitaire inoculée.	123
Figure 30 – Adhérence des oocystes de <i>C. parvum</i> à la surface de la mâche en fonction de l’enrichissement ionique de la suspension parasitaire inoculée.	124
Figure 31 – Hypothèses sur la localisation d’un sucre potentiellement impliqué dans l’adhérence parasitaire (et de son récepteur).	126
Figure 32 – Schémas des interactions possibles entre le parasite et la mâche après saturation des récepteurs par un sucre impliqué dans l’adhérence selon la localisation des récepteurs.	127
Figure 33 – Adhérence des oocystes de <i>C. parvum</i> à la surface de la mâche en fonction du sucre ajouté.	127
Figure 34 – Schémas des interactions possibles entre le parasite et la mâche après saturation d’un sucre impliqué dans l’adhérence parasitaire selon la localisation du sucre.	129
Figure 35 – Adhérence des oocystes de <i>C. parvum</i> à la surface de la mâche en fonction de la lectine ajoutée.	130
Figure 36 – Hypothèses sur la localisation des sucres potentiellement impliqués dans l’adhérence parasitaire (et de leur récepteur).	131
Figure 37 – Mise en évidence de sucres à la surface des oocystes par cytométrie en flux.	132
Figure 38 – Hypothèse sur la localisation du NANA et du mannose selon l’ensemble des résultats obtenus.	133
Figure 39 – Schémas des interactions possibles entre le parasite et la mâche après saturation des récepteurs sur l’oocyste par un sucre impliqué dans l’adhérence selon la localisation des récepteurs.	137

Tableaux



Tableaux

Tableau 1 – Les différentes espèces valides du genre <i>Cryptosporidium</i>.....	26
Tableau 2 – Sensibilité et spécificité des méthodes de diagnostic de <i>Cryptosporidium</i>. ...	38
Tableau 3 – Thérapeutiques décrites contre la cryptosporidiose.	40
Tableau 4 – Prévalence de <i>Cryptosporidium</i> dans les aliments.....	47
Tableau 5 – Epidémies reportées de cryptosporidiose d’origine alimentaire.....	49
Tableau 6 – Méthodes d’évaluation de la viabilité de <i>Cryptosporidium</i> et leurs applications.	52
Tableau 7 – Variétés de mâche.....	54
Tableau 8 – Pourcentage d’oocystes marqués à l’iodure de propidium après purification.	83
Tableau 9 – Pourcentage de sporozoïtes libérés dans différentes conditions.	87
Tableau 10 – Résultats de la CC-qPCR basée sur l’infection de cellules HCT-8 inoculées avec des oocystes purifiés non dékystés.....	91
Tableau 11 – Résultats de la CC-qPCR basée sur l’infection de cellules HCT-8 inoculées avec des oocystes récupérés de la mâche et non dékystés.	92
Tableau 12 – Survie de <i>C. parvum</i> récupéré des feuilles de mâche en cours de croissance.	95
Tableau 13 – Survie des oocystes de <i>C. parvum</i> récupérés de la mâche après lavage selon le procédé 4^{ème} gamme.	97
Tableau 14 – Liste des lectines utilisées.....	120
Tableau 15 – Liste des lectines fluorescentes utilisées	121
Tableau 16 – Liste des lectines utilisées avec leurs sucres cibles.	128
Tableau 17 – Lectines utilisées avec leurs sucres cibles et leurs fluorochromes.	131

Annexes



Annexes

<u>Annexe 1</u> : Protocole de l'IMS selon le fournisseur du kit.	145
<u>Annexe 2</u> : Publication dans la revue à comité de lecture Food and Waterborne Parasitology.....	147
<u>Annexe 3</u> : Survie des oocystes de <i>C. parvum</i> en condition témoin, lors de la croissance de la mâche.....	154
<u>Annexe 4</u> : Survie des oocystes de <i>C. parvum</i> en suspension et récupérés de la mâche après incubation à température ambiante.	154

Abréviations

Abréviations

ABC : ATP Binding Cassette

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AIA : lectine d'*Artocarpus integrifolia*

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARNm : ARN messenger

ARNr : Acide RiboNucléique ribosomique

ATP : Adénosine TriPhosphate

ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

CaCl₂ : Chlorure de calcium

CNR-LE : Centre National de Référence – Laboratoire Expert

CO₂ : dioxyde de carbone

ConA : Concanavaline A, lectine de *Canavalia ensiformis*

CsCl : Chlorure de Césium

DAPI : Di-Aminido-Phenyl-Indol

DI₅₀ : Dose de parasites provoquant l'Infection de 50% des individus contaminés

ECDC : European Centre for Disease Prevention and Control

EDTA : acide Éthylène-Diamine-Tétra-Acétique

EEE : Espace Economique Européen

EFSA : European Food Safety Authority

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FISH : Fluorescence *In Situ* Hybridization

FITC : Fluorescéine-5-IsoThioCyanate

GalNAc : N-AcétylGalactosamine

GBPH : Guide de Bonnes Pratiques d'Hygiène

GEM : Global Enteric Multicenter

GlcNAc : N-AcétylGlucosamine

GNL : lectine de *Galanthus nivalis*

GP60 : GlycoProtéine de 60 kDa

GSL : lectine de *Griffonia simplicifolia*

HACCP : Hazar Analysis Critical Control Point

HBSS : Hank's Balanced Salt Solution

HCl : Chlorure d'Hydrogène

HCT-8 : cellules d'adénocarcinome iléocecal humain

HEPES : acide 4-(2-HydroxyÉthyl)-1-Pipérazine Éthane Sulfonique

HSP : Heat shock Proteins

IMS : IMmuno-Séparation par des billes magnétiques

INRAE : Institut National de Recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement

IP : Iodure de Propidium

KCl : Chlorure de potassium

MAL : lectine de *Maackia amurensis*

MET : Microscopie Electronique à Transmission

MgCl₂ : Chlorure de magnésium

NaCl : Chlorure de sodium

NANA : N-AcétylNeurAminique

NaOH : Hydroxyde de sodium

NCBI : Centre National d'Information sur la Biotechnologie

NTZ : NiTaZoxanide

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBS : Phosphate-Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

pI : poids Isoélectrique

RT-qPCR : Reverse Transcription -qPCR

SIDA : Syndrome d'Immuno-Déficience Acquise

SVF : Sérum de Veaux Fœtal

TAHA : Traitement Antirétroviral Hautement Actif

UE : Union Européenne

UMR : Unité Mixte de Recherche

UMT : Unité Mixte Technologique

USA : United States of America

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

WGA : Wheat Germ Agglutinin, lectine de *Triticum vulgaris*

Étude bibliographique



Étude bibliographique

I. *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium, un protozoaire cosmopolite unicellulaire, infecte l'épithélium gastro-intestinal de nombreux vertébrés dont l'Homme. Il est l'agent responsable de la cryptosporidiose. Les personnes infectées par *Cryptosporidium* spp. peuvent présenter des symptômes intestinaux variés selon leur statut immunitaire. Des infections respiratoires ont également été observées (Reina *et al.*, 2016 ; Mor *et al.* 2010). Habituellement spontanément résolutive chez les patients immunocompétents, l'infection est très grave, voire mortelle, chez les patients immunodéprimés, en particulier, les personnes transplantées ou infectées par le VIH.

A. Historique

Le genre « *Cryptosporidium* » signifiant « sporocyste caché », a été décrit pour la première fois par Ernest Eduard Tyzzer en 1907. Tyzzer décrivit la présence d'un parasite unicellulaire vivant dans les glandes gastriques de souris de laboratoire (*Mus musculus*) qu'il nomma *Cryptosporidium muris* (Tyzzer, 1907). En 1912, toujours chez la souris mais dans l'épithélium de l'intestin grêle, il observa une autre espèce, de plus petite taille, *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer, 1912). Ce n'est qu'en 1955, avec la description de la nouvelle espèce, *Cryptosporidium meleagridis*, provoquant diarrhées et mortalité chez des dindonneaux, que l'association entre le parasite et des manifestations cliniques est établie (Slavin, 1955). Le parasite est cependant resté ignoré jusque dans les années 70 où il est décrit comme responsable d'épidémies de diarrhées chez les jeunes veaux (Panciera *et al.*, 1971).

En 1976, les premiers cas humains ont été rapportés : un enfant âgé de 3 ans (Nime *et al.*, 1976) et un homme de 39 ans sous immunosuppresseurs (Meisel *et al.*, 1976), tous deux atteints de diarrhées aiguës. Ce n'est qu'à partir des années 80 que la cryptosporidiose humaine devient un problème préoccupant par la gravité des symptômes digestifs qu'elle provoque chez les personnes atteintes du SIDA (Ma, 1984). Puis quelques années plus tard, suite aux épidémies hydriques du Milwaukee, aux États-Unis (Mac Kenzie *et al.*, 1994), et celles survenues en Angleterre et au Pays de Galles (Chalmers *et al.*, 2011a), la cryptosporidiose a été reconnue chez les personnes immunocompétentes, favorisant ainsi les recherches sur ce parasite.

B. Systématique et taxonomie

Selon la taxonomie officielle du Centre National d'Information sur la Biotechnologie (NCBI ; Xiao *et al.*, 2004), *Cryptosporidium* appartient au phylum des Apicomplexa, à la classe des Coccidia et à l'ordre des Eurococcidiorida. Les parasites de ce phylum, tels que *Cryptosporidium*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium* spp. et *Eimeria*, partagent une caractéristique commune : la présence d'un complexe apical (micronèmes, rhoptries, granules denses, conoïde). Ce complexe apical est principalement impliqué dans l'invasion des cellules hôtes et le développement intracellulaire du parasite. Mais, depuis la description du genre *Cryptosporidium*, sa classification taxonomique a fait l'objet de nombreux débats (Xiao *et al.*, 2004). La plupart des parasites apicomplexes possèdent : (i) un apicoplaste, structure plastidique non photosynthétique impliquée dans la production d'acides gras ; et (ii) des mitochondries. Or, des données microscopiques, moléculaires, génomiques et biochimiques montrent que *Cryptosporidium* ne possède ni mitochondries, ni apicoplaste (Lim & McFadden, 2010). Chez *Cryptosporidium*, les mitochondries sont remplacées par un mitosome (dérivé de mitochondrie avec un métabolisme significativement réduit) (Alcock *et al.*, 2012). Il diffère également des autres parasites de ce phylum par des caractéristiques fondamentales telles que la motilité et l'invasion (Wetzel *et al.*, 2005). Depuis peu, par la découverte de similitudes avec les grégaires telles que la capacité du parasite à achever son cycle de développement en absence de cellule hôte (Aldeyarbi & Karanis, 2016), *Cryptosporidium* a été transféré vers une nouvelle sous-classe, dont il est le seul membre, Cryptogregaria, au sein de la classe des Gregarinomorpha (Ryan *et al.*, 2016).

Au sein même du genre *Cryptosporidium*, il est difficile de définir les espèces biologiques. La définition d'une espèce, de manière générale, repose soit sur la différence morphologique, soit sur la distribution géographique et/ou la spécificité d'hôte. Cependant, la taille et la structure des oocystes des différentes espèces sont pratiquement identiques. La simple observation morphologique du parasite au microscope ne permet pas de différencier les espèces (Xiao *et al.*, 2004). De plus, les espèces de *Cryptosporidium* ne sont pas non plus très spécifiques à leurs hôtes ; bien que dans le passé, cette caractéristique a conduit à la création de plusieurs espèces. Des études d'infections croisées ont montré qu'un même isolat est capable d'infecter plusieurs hôtes (Xiao *et al.*, 2004). Actuellement, le recours aux outils de biologie moléculaire tels que le séquençage, permettent de mieux visualiser l'hétérogénéité de cette population de parasites. Les gènes codant pour l'ARNr 18S (Acide RiboNucléique

ribosomique) et la glycoprotéine de 60kDa (kilodalton, GP60) sont les marqueurs génétiques les plus fréquemment utilisés (Sulaiman *et al.*, 2005 ; Xiao *et al.*, 2004).

Par conséquent, la combinaison d'au moins quatre éléments devraient être obligatoire pour accorder la nomination d'une nouvelle espèce de *Cryptosporidium* : (i) la morphologie de l'oocyste, (ii) la spécificité naturelle de l'hôte, (iii) les caractéristiques génétiques et, (iv) le respect du Code International de Nomenclature Zoologique (Xiao *et al.*, 2004). A ce jour, 31 espèces du genre *Cryptosporidium* sont décrites comme valides (**Tableau 1**). Cependant, leur taxonomie est en constante évolution et reste un sujet controversé.

Grâce aux outils moléculaires, et notamment au marqueur *gp60* qui présente un haut degré de polymorphisme, les espèces *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. cuniculus*, *C. ubiquitum*, *C. erinacei*, *C. fayeri*, *C. wrairi*, et *C. tyzzeri* peuvent être classées en plusieurs familles de sous-types (Zahedi *et al.*, 2016). La caractérisation génétique de *gp60* est nécessaire pour mieux comprendre la dynamique de la transmission chez l'Homme et chez l'animal.

Tableau 1 – Les différentes espèces valides du genre *Cryptosporidium*

ESPECES	TAILLES DES OOCYSTES (µM)	HOTES	CAS CHEZ L'HOMME	REFERENCES
<i>C. muris</i>	7,0 x 5,0	M, H, O	Oui	Tyzzzer, 1907
<i>C. parvum</i>	4,85 x 4,39	M, H	Oui	Tyzzzer, 1912
<i>C. meleagridis</i>	4,5 x 4,0	M, O, H	Oui	Slavin, 1955
<i>C. wrairi</i>	5,4 x 4,6	M	Non	Vetterling <i>et al.</i> , 1971
<i>C. xiaoi</i>	3,94 x 3,44	M	Non	Fayer & Santin 2009
<i>C. bovis</i>	4,89 x 4,63	M, H	Oui	Fayer <i>et al.</i> , 2005
<i>C. cuniculus</i>	5,98 x 5,38	M, H	Oui	Inman & Takeuchi, 1979 ; Robinson, 2010
<i>C. felis</i>	5,0 x 4,5	M, H	Oui	Iseki, 1979
<i>C. serpentis</i>	6,2 x 5,3	R, M	Non	Levine, 1980
<i>C. nasoris</i>	3,6	P	Non	Hoover <i>et al.</i> , 1981
<i>C. baileyi</i>	6,3 x 5,2	O	Non	Current <i>et al.</i> , 1986
<i>C. varanii</i>	4,8 x 4,7	R	Non	Pavlassek, 1995
<i>C. cichlidis</i>	4,35 x 3,0	P	Non	Paperna & Vilenkin, 1996
<i>C. reichenbachklinkei</i>	2,79 x 2,7	P	Non	Paperna & Vilenkin, 1996
<i>C. galli</i>	8,25 x 6,3	O	Non	Pavlassek, 1999
<i>C. andersoni</i>	7,4 x 5,5	M, H	Oui	Lindsay <i>et al.</i> , 2000
<i>C. canis</i>	4,95 x 4,71	M, H	Oui	Fayer <i>et al.</i> , 2001
<i>C. hominis</i>	4,91 x 4,28	H	Oui	Ryan <i>et al.</i> , 2002
<i>C. molnari</i>	4,72 x 4,47	P	Non	Alvarez-Pellitero & Sitjà-Bobadilla, 2002
<i>C. suis</i>	4,6 x 4,2	M, H	Oui	Ryan <i>et al.</i> , 2004
<i>C. scophthalmi</i>	4,44 x 3,91	P	Non	Alvarez-Pellitero <i>et al.</i> , 2004
<i>C. pestis</i>	-	M, H	Oui	Šlapeta, 2006
<i>C. fayeri</i>	4,9 x 4,3	M, H	Oui	Ryan <i>et al.</i> , 2008
<i>C. ryanae</i>	3,73 x 3,16	M	Non	Fayer <i>et al.</i> , 2008
<i>C. fragile</i>	6,2 x 5,5	Am	Non	Jirků <i>et al.</i> , 2013
<i>C. macropodom</i>	5,4 x 4,9	M	Non	Power & Ryan, 2008
<i>C. duscimarci</i>	-	R	Non	Traversa, 2010
<i>C. ubiquitum</i>	5,04 x 4,66	M, H	Oui	Fayer <i>et al.</i> , 2010
<i>C. viatorum</i>	5,35 x 4,72	M, H	Oui	Elwin <i>et al.</i> , 2012
<i>C. scorfarum</i>	5,16 x 4,83	M, H	Oui	Kváč <i>et al.</i> , 2013
<i>C. erinacei</i>	4,9 x 4,4	M, H	Oui	Kváč <i>et al.</i> , 2014 ; Zahedi <i>et al.</i> , 2016

M : mammifères, *H* : Homme, *O* : oiseaux, *Am* : amphibiens, *P* : poissons, *R* : reptiles.
(Šlapeta, 2013 ; Xiao *et al.*, 2004)

II. Biologie du parasite

Cryptosporidium est un parasite dont le cycle de vie est monoxène, c'est-à-dire qu'il va réaliser sa reproduction asexuée et sexuée chez le même hôte. Il débute et termine son cycle sous forme d'oocystes sporulés, sphériques et très résistants dans l'environnement. Ces oocystes renferment chacun quatre sporozoïtes et sont excrétés dans les selles de l'hôte infecté. Ils représentent le stade infectieux du parasite.

A. Cycle de vie

Le cycle de vie de *Cryptosporidium* se divise en six phases majeures (**Figure 1**) : (i) le « dékystement » des oocystes (libération des sporozoïtes infectieux), (ii) la mérogonie (multiplication asexuée), (iii) la gamétogonie (formation de micro- et macrogamètes), (iv) la fécondation (formation d'un zygote), (v) la formation de la paroi de l'oocyste nouvellement formé, et (vi) la sporogonie (formation de sporozoïtes infectieux) (Bouzid *et al.*, 2013).

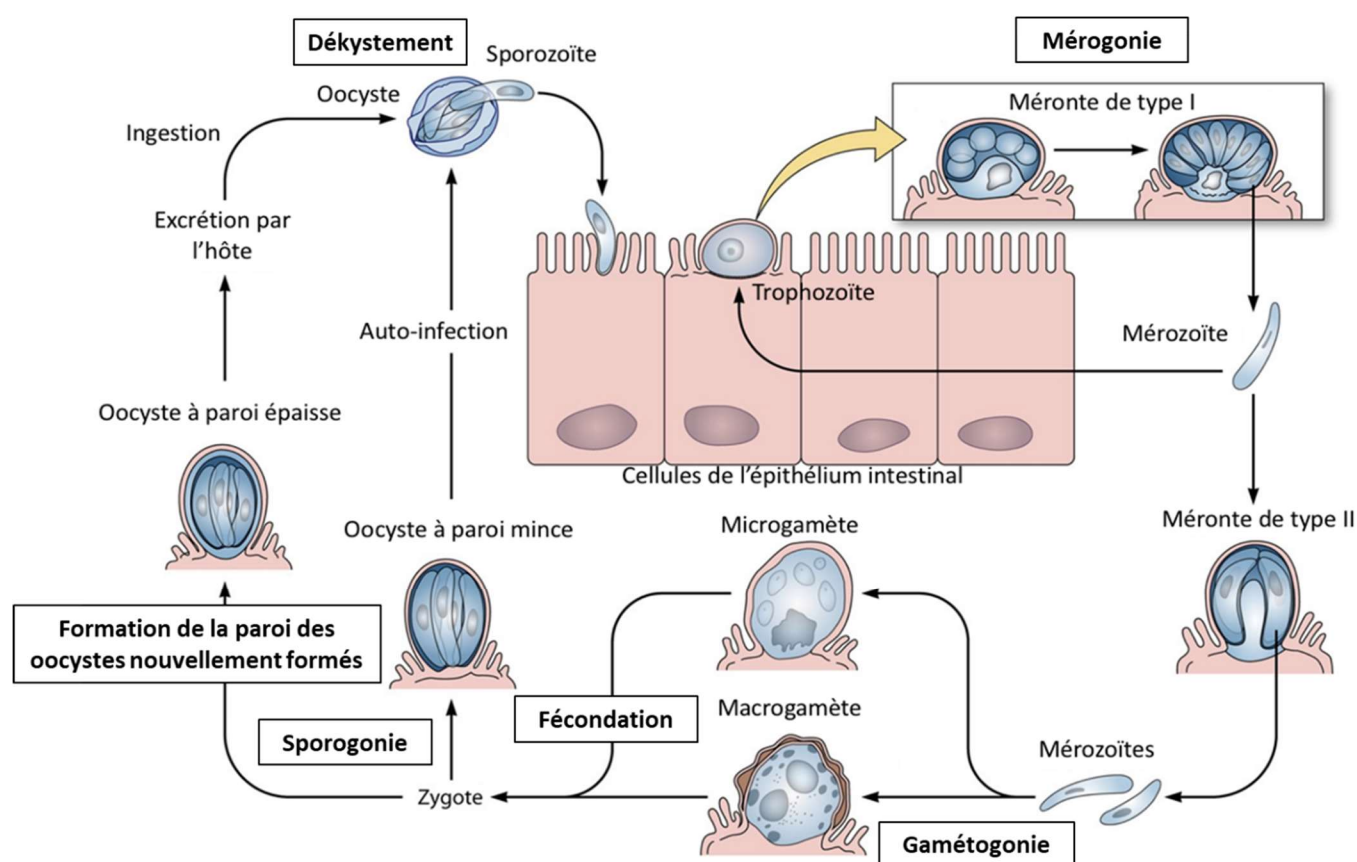


Figure 1 – Cycle de vie de *Cryptosporidium*.

(Bouzid *et al.*, 2013 modifié)

Une fois dans le tractus intestinal de l'hôte, les oocystes subissent un « dékystement », ce qui libère les sporozoïtes infectieux. Lors de ce processus, le parasite va produire un panel de protéases cruciales majoritairement spécifiques à la sérine et à la cystéine, permettant ainsi l'ouverture de l'oocyste. Chez l'hôte, le « dékystement » peut être déclenché par différents facteurs, tels que la température, le CO₂, la présence d'enzymes digestives et de sels biliaires (Lendner & Dauschies, 2014). Les sporozoïtes libérés dans la lumière intestinale de l'hôte, vont entrer en contact avec les cellules de l'épithélium intestinal grâce à des protéines excrétées, produites par leur complexe apical et essentielles à cette étape. Les protéines produites par les rhoptries et les micronèmes permettent au sporozoïte d'interagir avec l'entérocyte. Le parasite s'internalise dans un compartiment issu de l'hôte, « intracellulaire » mais extracytoplasmique, appelé vacuole parasitophore. À l'intérieur de la vacuole parasitophore, le sporozoïte se développe en un trophozoïte sphérique et entre en reproduction asexuée (mérogonie) pour former un merozoïte de type I, composé de huit mérozoïtes. Libéré de la vacuole parasitophore, chaque mérozoïte de type I envahit la cellule épithéliale voisine. Dès lors, ces mérozoïtes peuvent, soit donner naissance à de nouveaux mérozoïtes de type I (recyclage) favorisant l'augmentation du nombre d'oocystes excrétés *in fine* et donc amplifier la pathogénicité ; soit se développer pour former des merozoïtes de type II. Les merozoïtes de type II produisent quatre mérozoïtes de type II et peuvent, à leur tour, envahir les entérocytes avoisinants pour se différencier en microgamétocytes mâles (à l'origine des microgamètes) ou en macrogamétocytes femelles (à l'origine des macrogamètes) (gamétogonie). La différenciation des mérozoïtes en microgamète ou en macrogamète est un mécanisme encore inconnu. Chaque microgamétocyte entre en division nucléaire et se différencie pour former jusqu'à 16 microgamètes (Bouzid *et al.*, 2013). Une fois les microgamètes libérés de la vacuole parasitophore, la fécondation a lieu. Un microgamète féconde un macrogamète pour former un zygote. Ce zygote diploïde subit la sporogonie, processus similaire à la méiose, pour donner naissance aux oocystes composés chacun de quatre sporozoïtes haploïdes. Cette étape donne naissance à deux types d'oocystes : (i) des oocystes à paroi mince, et (ii) des oocystes à paroi épaisse. L'oocyste à paroi mince représente 20% des oocystes nouvellement formés et entraîne une auto-infection qui maintient le parasite chez l'hôte. L'oocyste à paroi épaisse, quant à lui, permettra au parasite de résister dans l'environnement extérieur, après relargage dans les selles de l'hôte infecté, et d'assurer sa survie jusqu'à l'infection de nouveaux hôtes (Leitch & He, 2011).

Par rapport aux autres apicomplexes, les particularités du genre *Cryptosporidium* sont :
 (i) d'être excrété dans les fèces de son hôte sous forme d'oocystes directement infectieux, (ii)

le recyclage des mérozoïtes de type I et (iii) la formation, en fin de cycle, d'oocystes à paroi mince permettant d'entretenir l'infection (Bouzid *et al.*, 2013).

B. Morphologie des différents stades parasitaires

a. L'oocyste

De forme sphérique à ovoïde, l'oocyste de *Cryptosporidium* varie de 3 à 8µm de diamètre selon l'espèce. Il renferme quatre sporozoïtes « nus » et apparaît très réfringent au microscope optique. Sa paroi est composée de deux couches, interne et externe, bien distinctes. Une suture est observée tout le long de l'oocyste (**Figure 2**). Son ouverture, lors du « dékystement », permet la libération des sporozoïtes. Extrêmement résistant, ce stade est crucial pour la survie du parasite dans l'environnement (Jenkins *et al.*, 2010).

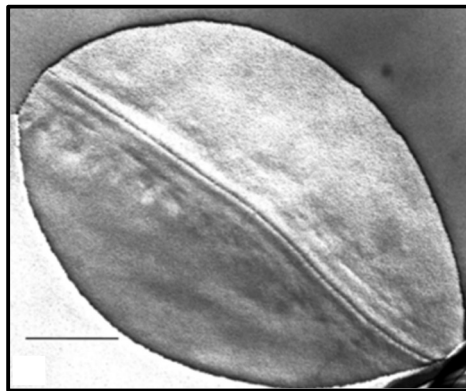


Figure 2 – Structure d'un oocyste, après cryofracture, observé au microscope à transmission.

Échelle = 0,5µm (Jenkins et al., 2010)

b. Le sporozoïte

Le sporozoïte se présente sous forme de virgule, libre et mobile. Son ultrastructure a été observée grâce au microscope électronique à transmission (MET) (**Figure 3**). Il possède un complexe apical, caractéristique commune des apicomplexes. Au niveau de ce pôle apical, de forme conique, se trouvent les petits micronèmes sphériques ainsi qu'une seule rhoptrie plus grosse. Les granules denses apparaissent au niveau de la moitié antérieure du parasite et le

noyau plutôt dans la partie postérieure. Ce complexe joue un rôle essentiel dans la motilité, l'adhérence et l'invasion du parasite dans les cellules hôtes (Tetley *et al.*, 1998).

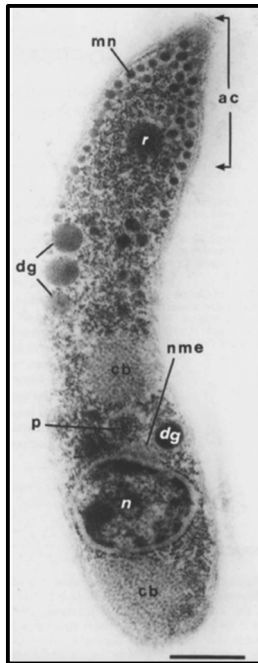


Figure 3 – Structure d'un sporozoïte (coupe longitudinale), observé par microscopie à transmission.

*Le complexe apical (ac) du sporozoïte observé est composé de micronèmes (mn) et d'une rhoptrie (r). Le noyau (n) et les corps cristalloïdes adjacents (cb) se trouvent dans la partie postérieure du parasite qui est plus arrondie. Les granules denses (dg) sont positionnés dans la partie centrale. p : « plastid-like », nme : membrane nucléaire. Échelle = 0,5 μ m (Tetley *et al.*, 1998).*

c. Les autres stades parasitaires et leur particularité

Lors de son cycle de vie, *Cryptosporidium* occupe une position particulière au sein des cellules épithéliales qu'il infecte. Ses formes « intracellulaires » (**Figure 4**) sont extracytoplasmiques, protégées dans une vacuole parasitophore. Il se trouve ainsi à l'abri du milieu intestinal hostile, du cytoplasme de la cellule et de la réponse immunitaire de l'hôte. Ceci pourrait expliquer la difficulté pour trouver un traitement efficace (cf. Partie III. C. Traitement).

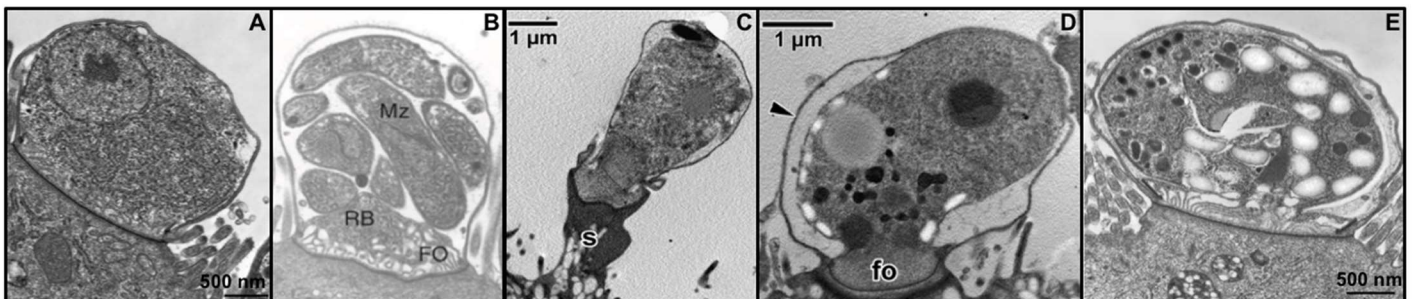


Figure 4 – Les différents stades intracellulaires de *Cryptosporidium* observés par microscopie électronique à transmission.

*(A) Un trophozoïte mature prêt à se diviser en mérozoïtes. (B) Un méronte de type I composé de mérozoïtes (C) Un microgamétocyte mâle et (D) un macrogamétocyte femelle. (E) Un zygote. Mérozoïte (Mz), corps résiduel (RB), organelle nourricier (FO) (Leitch & He, 2012 ; Tzipori & Ward, 2002 ; Valigurivá *et al.*, 2008).*

En réalité, contrairement aux autres apicomplexes mais de même que les grégaires, *Cryptosporidium* n'est pas réellement intracellulaire. En effet, il ne pénètre pas sous la membrane cellulaire et n'entre pas en contact avec le cytoplasme de la cellule hôte. Lorsqu'il entre en interaction avec l'entérocyte hôte, la membrane des cellules de l'épithélium intestinal perd localement sa microvillosité et forme un pli élastique. Ce pli élastique va recouvrir entièrement le parasite pour former la vacuole parasitophore (**Figure 5**). La membrane interne et externe de cette vacuole sont ainsi dérivées de la cellule hôte. Par conséquent, les stades de développement du parasite ne sont pas intracellulaires. Le terme le plus approprié serait de décrire *Cryptosporidium* comme un parasite épicytocytaire (Valigurová *et al.*, 2008). Néanmoins, il apparaît, de manière transitoire, une région de connexion entre la cellule hôte et le parasite qui disparaît lorsque l'organelle dit d'attachement ou nourricier se forme. Cette organelle est formée de repliements membranaires qui constituent la zone d'attachement unique entre le parasite et l'hôte. Elle est essentielle dans la récupération de nutriments nécessaires au développement de *Cryptosporidium*. De plus, dans cette zone, on retrouve des protéines transmembranaires de la famille des transporteurs à cassettes liant l'ATP (Adénosine TriPhosphate) (transporteurs ABC - ATP Binding Cassette) associées à des phénotypes multi-résistants aux traitements (Klokouzas *et al.*, 2003). Ainsi l'étude de ce type de protéines présentes à la limite hôte-parasite, offre une stratégie intéressante dans la conception d'un traitement contre la cryptosporidiose (Perkins *et al.*, 1999).

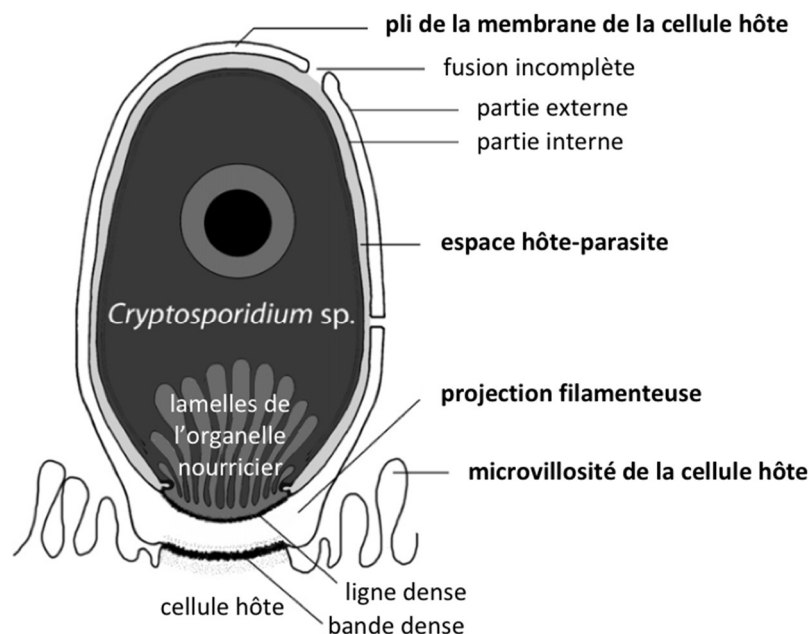


Figure 5 – Représentation schématique de la vacuole parasitophore et l'organelle nourricier de *Cryptosporidium* spp.

(Valigurová *et al.*, 2008)

C. Pathogénicité et virulence

La pathogénicité est généralement définie comme la capacité d'un micro-organisme à entraîner des dommages à son hôte, provoquant des symptômes. La virulence, quant à elle, est utilisée pour décrire la capacité de l'agent pathogène à se multiplier. La pathogénicité et la virulence des parasites du genre *Cryptosporidium* sont complexes et multifactorielles. En effet, elles dépendent de l'espèce et de la souche concernées avec des caractéristiques bien spécifiques, mais également de l'hôte infecté.

a. Pouvoir pathogène de *Cryptosporidium*

Même si *Cryptosporidium* est connu pour infecter les cellules épithéliales, il a des tropismes différents selon l'espèce. *C. baileyi* a un tropisme pour les cellules du système respiratoire (Kopacz *et al.*, 2020), alors que *C. parvum* va infecter les cellules intestinales. La gamme d'hôte est également plus ou moins large selon l'espèce. Par exemple, *C. parvum* est retrouvé chez de nombreux hôtes, tandis que *C. molnari* semble être inféodé uniquement aux poissons (Alvarez-Pellitero & Sitjà-Bobadilla, 2002 ; Bouzid *et al.*, 2013).

Afin d'étudier l'infectiosité et la virulence du parasite, des adultes volontaires en bonne santé, ont été infectés expérimentalement par trois isolats de *C. parvum* (IOWA, TAMU et UCP) et un isolat de *C. hominis* (TU502). La dose infectante conduisant à l'infection de 50% des individus exposés (DI₅₀) à *C. hominis* est estimée entre 10 et 83 oocystes. La diarrhée est survenue chez 40% des individus recevant 10 oocystes, et chez 75% de ceux recevant 500 oocystes (Chappell *et al.*, 2006). Pour *C. parvum*, la DI₅₀ est de : 1 042 oocystes pour la souche UCP, 87 oocystes pour la souche IOWA et 9 oocystes pour la souche TAMU. Des épisodes diarrhéiques ont touché 59% des individus après une infection par la souche UCP, 52% par IOWA et 86% par TAMU (Okhuysen *et al.*, 1999). Ainsi, selon l'espèce et la souche de *Cryptosporidium* ingérées, la DI₅₀ ainsi que la proportion d'individus présentant des symptômes varient.

La sensibilité à la réinfection après une première contamination par *Cryptosporidium*, a été étudiée expérimentalement. Des volontaires ayant eu une primo-infection ont été ré-infectés par la même souche un an plus tard. Lors de la seconde contamination, les individus ont excrété moins de parasites par rapport à leur première infection mais les taux d'épisodes diarrhéiques

ainsi que l'apparition et la durée de ces diarrhées étaient similaires. Ceci indique qu'une primo-infection ne suffit pas à protéger l'individu d'une nouvelle contamination par *Cryptosporidium* (Chalmers & Davies, 2010 ; Okhuysen *et al.*, 1999).

Toutes ces données illustrent une pathogénicité et une virulence variables au sein même du genre *Cryptosporidium*. De faibles doses d'oocystes peuvent induire la maladie et une première infection ne protège pas l'hôte d'une nouvelle contamination. Ceci confirme le fort pouvoir infectieux de ce parasite.

b. Facteurs de virulence

Cryptosporidium possède des caractéristiques spécifiques afin d'assurer sa survie au sein de son hôte, qui peuvent être caractérisées de facteurs de virulence. Ces facteurs peuvent affecter l'hôte à tout moment au cours de son cycle de vie, à partir du moment où le parasite entre dans l'organisme jusqu'à ce qu'il soit tué ; ou termine son cycle et quitte l'hôte (Bouzig *et al.*, 2013). A l'heure actuelle, ils sont encore peu connus. Néanmoins, certains gènes candidats ont été identifiés. Ils interviennent à différents niveaux lors du cycle de vie du parasite : (i) le dékystement des oocystes, (ii) la motilité, (iii) l'attachement, (iv) l'invasion, (v) la prolifération parasitaire, et (vi) la survie chez l'hôte (**Figure 6**) (Bouzig *et al.*, 2013 ; Fayer *et al.*, 2009).

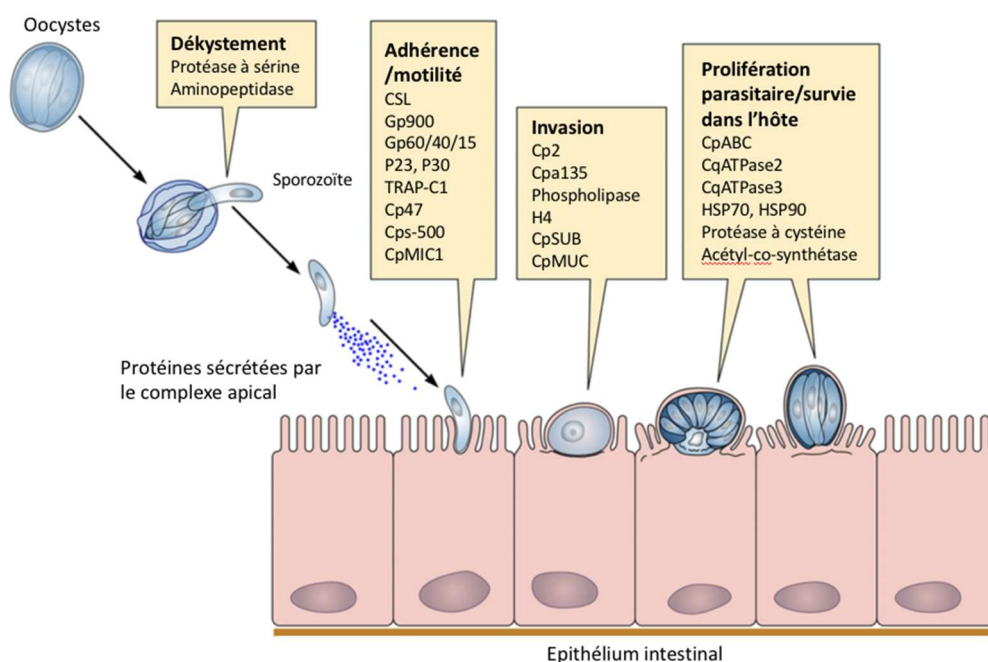


Figure 6 – Facteurs de virulence de *Cryptosporidium* et leurs contributions au cycle de vie parasitaire.

(Bouzig *et al.*, 2013 modifié)

Facteurs d'adhérence et d'invasion : l'attachement des sporozoïtes aux cellules hôtes est une des étapes cruciales pour garantir la prolifération parasitaire. La plupart des protéines impliquées dans cette adhérence sont présentes en surface ou sécrétées à l'extérieur du parasite, et sont associées au complexe apical (micronèmes, rhoptries et granules denses). Deux classes de protéines ont été caractérisées et se sont révélées médier l'attachement et l'invasion du parasite à la cellule cible : les glycoprotéines de type mucine et les protéines liées à la thrombospondine (Naitza *et al.*, 1998). Les mucines et les glycoprotéines de type mucine sont fortement O-glycosylées. Plus de 30 gènes codant pour des mucines ou des glycoprotéines de types mucine ont été décrits chez *Cryptosporidium* (Wanyiri & Ward, 2006). La première à avoir été découverte est la GP900, elle est localisée au niveau des micronèmes et elle est excrétée à la surface des sporozoïtes. Elle est impliquée dans l'attachement et/ou l'invasion du parasite puisqu'il a été démontré que son blocage par des anticorps spécifiques, inhibe l'infection *in vitro*. D'autres glycoprotéines présentant ce type de modification post-traductionnelle, comme la CSL (glycoprotéine de type circumsporozoïte), le complexe GP40/15, la CPA135, la CP2, la P23 et la TRAP-C1 (protéine adhésive liée à la thrombospondine *Cryptosporidium* 1) ont également été décrites comme étant impliquée dans l'attachement et l'invasion du parasite. L'utilisation d'une lectine bloquant le galactose/N-acétylgalactosamine a induit une diminution de l'adhérence des sporozoïtes aux cellules d'adénocarcinome iléocecal humain (HCT-8) (Hashim *et al.*, 2006). Ceci révèle l'importance de la présence de ces O-glycanes pour l'attachement et l'invasion du parasite à la cellule hôte (Bouزيد *et al.*, 2013 ; Wanyiri & Ward, 2006).

Facteurs de survie : le parasite a acquis des outils essentiels pour assurer sa survie au sein de son hôte. Notamment, des enzymes présentant des activités de protection du parasite, comme l'aminopeptidase, la protéase à cystéine et à sérine, sont impliquées dans le « dékystement ». Elles sont essentielles dans les étapes initiales de l'infection. Leur capacité à perturber les membranes cellulaires est cruciale lors de l'invasion du parasite dans la cellule hôte mais aussi lors de la libération des mérozoïtes de la vacuole parasitophore pour se propager aux cellules avoisinantes (Bouزيد *et al.*, 2013). Les protéines de types HSP (Heat Shock Proteins) sont des protéines hautement conservées et universelles. Elles sont retrouvées aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes. La fonction commune des HSP est caractérisée par le terme de « chaperon moléculaire ». Ces protéines jouent un rôle important dans l'interaction protéine-protéine, facilitent le transport, le pliage, l'assemblage, la biosynthèse et la sécrétion de protéines nouvellement formées. Elles aident également au repliement des protéines endommagées dans des conditions de stress. Elles sont divisées en

familles selon leur masse moléculaire (HSP25, 40, 70, 90, 105) (Wirth *et al.*, 2002). Les deux protéines HSP70 et HSP90 ont été décrites chez *Cryptosporidium* (Khramtsov *et al.*, 1995 ; Woods *et al.*, 1999). Le haut degré de polymorphisme du gène *hsp70* a été identifié et utilisé pour le génotypage. Cependant, ces protéines sont soumises à une pression sélective ne permettant pas d'établir de relations génétiques entre les différentes familles de sous-type (Bouzig *et al.*, 2013). Chez *Toxoplasma gondii*, des expériences de chocs thermiques ont mis en évidence un niveau élevé d'expression de HSP70 dans des souches virulentes et inversement dans des souches avirulentes (Lyons & Johnson, 1995). Ainsi, il serait intéressant de mener cette étude chez *Cryptosporidium* afin de savoir s'il y a également une corrélation entre le niveau d'expression de la HSP et la virulence du parasite.

La liste des facteurs de virulence et des mécanismes impliqués dans la pathogénicité de *Cryptosporidium* n'est pas encore complètement connue. Des recherches incluant le facteur hôte doivent être entreprises pour faire progresser notre compréhension de la physiopathologie, de la spécificité d'hôte, de l'évolution et de l'épidémiologie des espèces et des génotypes de ce parasite. La pathogénicité et la virulence de *Cryptosporidium* ne sont pas que dépendantes du parasite mais aussi de l'hôte. Le système immunitaire de l'individu infecté est le facteur le plus important, mais également le statut nutritionnel ainsi que les facteurs comportementaux. Ces facteurs vont influencer à la fois la probabilité d'infection et la sévérité de la maladie.

III. La cryptosporidiose

A. Présentation clinique

La cryptosporidiose est une protozoonose cosmopolite dont l'agent responsable est *Cryptosporidium*. Les signes cliniques apparaissent en moyenne après 2 à 14 jours d'infection, principalement, sous forme de diarrhées aqueuses, souvent abondantes et parfois prolongées (Garcia & Current, 1989 ; Hunter & Nichols, 2002). Elles peuvent également être accompagnées de crampes abdominales, de nausées, de vomissements, de pertes de poids et de fièvres légères. *Cryptosporidium* provoque une altération significative des fonctions d'absorption et de sécrétion de l'intestin entraînant les symptômes chez l'hôte infecté. De nombreuses infections par *Cryptosporidium* sont bénignes, spontanément résolutives et souvent pas reconnues (Shirley *et al.*, 2012). La clinique et la sévérité des symptômes sont multifactorielles, dépendantes de l'état du système immunitaire, de l'état nutritionnel et de l'âge

de l'hôte ; mais aussi de l'espèce et du sous-type de *Cryptosporidium* concernés et de la dose infectante.

Chez les individus immunocompétents : l'infection peut être asymptomatique ou se traduire par une diarrhée aiguë spontanément résolutive, contribuant ainsi à une sous-estimation du nombre de cas de cryptosporidiose chez les personnes immunocompétentes (Chen *et al.*, 2002).

Chez les enfants : la diarrhée peut être sévère et associée à une mortalité importante, en particulier chez les enfants malnutris. D'après l'étude de la GEM (Global Enteric Multicenter), *Cryptosporidium* apparaît comme la deuxième cause de mortalité (après les Rotavirus) par diarrhées chez les enfants de moins de 5 ans dans les pays en développement (Kotloff *et al.*, 2013). Cette sensibilité qu'ont les enfants à la maladie, est très certainement liée à une hygiène de vie difficile dans ces pays. Néanmoins, une étude menée chez des enfants de 2 écoles de Tripoli au Liban, a montré que seule la moitié des enfants contaminés ont signalé des symptômes digestifs, et 27% de ces enfants présentaient une infection asymptomatique (Osman *et al.*, 2016).

Chez les individus immunodéficients : la cryptosporidiose se traduit fréquemment par une diarrhée sévère susceptible d'engager leur pronostic vital. Pour les personnes VIH⁺, l'infection implique une diarrhée chronique avec un risque élevé de mortalité. La fréquence de la diarrhée est corrélée au nombre de lymphocytes T CD4⁺ ($< 249 \text{ CD4}^+/\text{mm}^3$) chez le patient (Dellamonica, 2003). La prise du traitement antirétroviral hautement actif (TAHA) a diminué la fréquence des diarrhées (Call *et al.*, 2000). Ainsi la restauration du statut immunitaire (augmentation de taux de lymphocytes T CD4⁺) peut permettre le contrôle de l'infection. Concernant le déficit en lymphocytes B, une étude réalisée en modèle animal a montré aucune différence des résultats obtenus chez des souris normales porteuses de la cryptosporidiose et ceux dépourvus de lymphocytes B. Ce qui suggère que les lymphocytes B ne sont probablement pas nécessaires dans l'élimination de *Cryptosporidium* (Chen *et al.*, 2003). La cryptosporidiose est également une cause significative et possiblement sous-estimée de diarrhées chez le patient transplanté d'organe solide (Lanternier *et al.*, 2017 ; Costa *et al.*, 2018). La prise d'immunosuppresseurs peut favoriser l'infection par *Cryptosporidium* mais cela dépend du traitement administré. En effet, une étude s'est intéressée à déterminer l'incidence, la manifestation, la gestion et la prise en charge de la cryptosporidiose chez les patients transplantés d'organe solide. Bhaduria *et al.* (2015) ont montré que le risque relatif de

développer une infection à *Cryptosporidium* est plus faible chez les patients sous cyclosporine que ceux sous tacrolimus.

Les réponses immunitaires jouent un rôle essentiel dans la protection et résolution de l'infection par *Cryptosporidium*. Cependant, la nature de ces réponses, particulièrement chez l'Homme, n'est pas complètement comprise.

Différence de gravité de la maladie selon l'espèce et le sous-type de *Cryptosporidium* : dans une étude menée de septembre 2000 à décembre 2002 impliquant des patients infectés par le VIH (moyenne de lymphocytes T CD4⁺ = 131/mm³), Cama *et al.* (2007) ont montré que les différentes familles et génotypes de *Cryptosporidium* sont liés à différentes manifestations cliniques. En effet, une contamination par *C. hominis*, *C. canis* et *C. felis* était uniquement associée à des diarrhées ; alors qu'avec *C. parvum*, elle était associée à une diarrhée chronique et des vomissements (Cama *et al.*, 2007). Des séquelles à long terme, comme des douleurs oculaires et articulaires, ou des maux de tête et de la fatigue, ont également été observées lors d'infection par *C. hominis* mais pas par *C. parvum*. De plus, les symptômes variaient selon la famille du sous-type de *C. hominis* retrouvé. Les diarrhées étaient plus importantes chez les personnes infectées par la famille Id par rapport à la famille Ib ; et absente chez celles contaminées par la famille Ia (Cama *et al.*, 2007). L'analyse génomique comparative entre *C. parvum* et *C. hominis* a révélé la présence de gènes codant la protéine COPS-1 pour *C. parvum* et CHOS-1 pour *C. hominis* au niveau des télomères. Ces gènes codent pour des glycoprotéines de 50kDa, fortement glycosylées qui jouent certainement un rôle dans les interactions hôte-parasite (Bouزيد *et al.*, 2013). Cette localisation télomérique (région hautement répétitive et hypervariable) pourrait expliquer en partie la différence de spécificité de l'hôte, et des symptômes observés selon l'espèce impliquée dans l'infection.

B. Diagnostic de la cryptosporidiose

A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode standard internationale pour le diagnostic biologique de la cryptosporidiose. Selon le contexte, plusieurs techniques sont utilisées : la microscopie, les tests immunologiques et la biologie moléculaire (Abd-Ella, 2014).

La méthode de diagnostic la plus couramment utilisée est l'examen microscopique des selles (**Figure 7**). Cependant, elle nécessite un opérateur qualifié et sa limite de détection est

élevée (4 000 oocystes par gramme de selles) (Chartier *et al.*, 2002). La sensibilité de la microscopie est améliorée par l'utilisation d'anticorps spécifiques à *Cryptosporidium* spp. couplés à des fluorochromes. La détection de *Cryptosporidium* se fait également par d'autres méthodes décrites dans le **Tableau 2**. Des études, utilisant la PCR comme technique de référence, ont montré qu'elle est la méthode la plus adaptée pour ce diagnostic avec 100% de sensibilité et de spécificité (Calderaro *et al.*, 2011 ; Chalmers *et al.*, 2011b ; Kaushik *et al.*, 2008 ; Morgan *et al.*, 1998).

Tableau 2 – Sensibilité et spécificité des méthodes de diagnostic de *Cryptosporidium*

METHODE	SENSIBILITE (%)	SPECIFICITE (%)	REMARQUES
Microscopie			
Ziehl-Neelsen modifié / Coloration de Heine ¹	84	99	+ Peu cher, réactifs largement disponibles - Mauvaise sensibilité, chronophage
Auramine-phénol ²	92	100	+ Bonne sensibilité - Microscopie à fluorescence
Immuno-fluorescence (utilisation d'anticorps) ²	97	100	+ Meilleure sensibilité que l'auramine-phénol - Microscope à fluorescence, plus chronophage que l'auramine-phénol
Détection d'antigènes			
Immuno-enzymatique ELISA ³	99	94	+ Facile d'utilisation, pas besoin d'opérateur qualifié - Besoin d'être confirmé
Immuno-chromatographie ⁴	98	100	+ Facile d'utilisation, peu chronophage - Moins sensible que l'ELISA
Biologie moléculaire			
PCR ^{1,5,6}	100	100	+ Meilleures performances, spéciation et génotypage - Plus coûteuse que les autres techniques et chronophage

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay. PCR : Polymerase Chain Reaction. ¹Morgan *et al.*, 1998 ;

²Chalmers *et al.*, 2011b ; ³Razakandrainibe *et al.*, 2021 ; ⁴Llorente *et al.*, 2002 ; ⁵Calderaro *et al.*, 2011 ;

⁶Kaushik *et al.*, 2008.

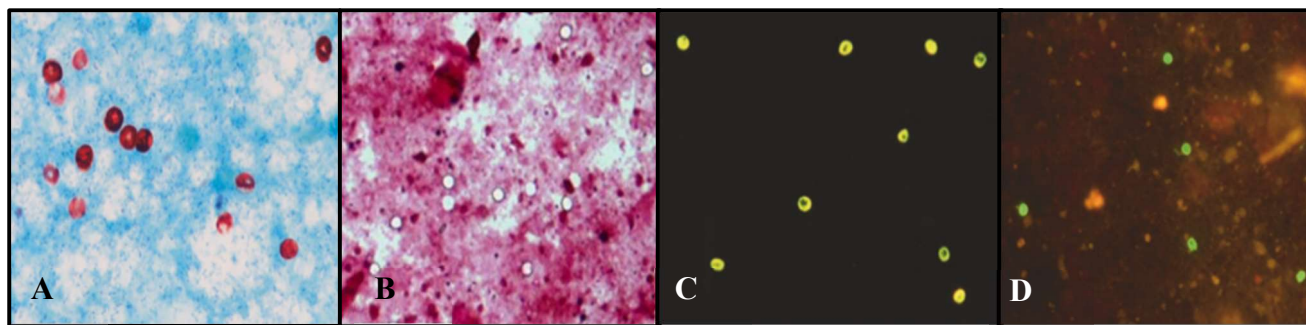


Figure 7 – Photographies d’oocystes de *Cryptosporidium* observés par microscopie optique après différentes colorations (A, B et C) et par microscopie à fluorescence (D).

(A) Coloration de Ziehl-Neelsen modifiée (Robinson & Chalmers, 2020). (B) Coloration négative de Heine (Kar et al., 2011). (C) Coloration à l’auramine-phénol (Robinson & Chalmers, 2020). (D) Immuno-marquage (Robinson & Chalmers, 2020). Les oocystes ont un diamètre d’environ 5µm.

L’utilisation de la PCR est de plus en plus répandue. Elle apporte un avantage supplémentaire, l’identification des espèces du genre *Cryptosporidium*. La PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), la PCR quantitative en temps réel (qPCR) ou le séquençage sont utilisés afin d’identifier le sous-type de *Cryptosporidium* détecté. Le gène de l’ARNr 18S est largement utilisé pour l’identification de l’espèce. Ce qui s’explique par la nature multi-copie du gène et par la présence de régions conservées qui facilitent la conception d’amorces spécifiques au genre (Xiao, 2010). Actuellement, il n’existe pas de méthode de sous-typage standardisée. Cependant, l’analyse de la séquence du gène *gp60* est principalement utilisée pour caractériser la famille de sous-type de *C. parvum* et *C. hominis* détecté (Bouzig et al., 2013).

C. Traitements de la cryptosporidiose

Chez le patient immunocompétent atteint de cryptosporidiose, l’infection étant spontanément résolutive et le diagnostic étant porté souvent tardivement, seul le traitement des symptômes est réalisé (réhydratation, prise d’antidiarrhéiques). En revanche, devant des signes de gravité ou chez le patient immunodéprimé, un traitement médicamenteux spécifique peut être nécessaire. Ce traitement spécifique de la cryptosporidiose comprend : (i) une prise de médicaments anti-parasitaires (nitazoxanide, rifaximine, ...), et/ou (ii) une diminution de l’immunosuppression (baisse des doses d’immunosuppresseurs, traitement anti-rétroviral ; Checkley et al., 2015). Chez un patient atteint du SIDA, souffrant de diarrhées sévères, le volume de selles peut dépasser 10l/jour. L’apport d’une solution électrolytique par voie orale et

d'une alimentation entérale est alors indiqué. En cas d'immunosuppression sévère, la multi-thérapie (TAHA) avec une restauration immunitaire à un taux de lymphocytes T CD4⁺ >100 cellules/mm³ conduit habituellement à la résolution de la cryptosporidiose clinique. Plusieurs molécules, dont le nitazoxanide, la paromomycine et la rifaximine ont été étudiées et ont fait l'objet pour certaines d'entre elles, d'essais cliniques randomisés et contrôlés chez des personnes atteintes du SIDA (**Tableau 3**). Malheureusement, elles ne garantissent pas une bonne efficacité de traitement.

Tableau 3 – Thérapeutiques décrites contre la cryptosporidiose.

AGENTS THERAPEUTIQUES	STATUTS	LIMITES
Nitazoxanide	Approuvé pour le traitement de la cryptosporidiose du patient immunocompétent	• Efficacité de 56 à 96 % chez l'hôte immunocompétent • Pas efficace chez les patients atteints du SIDA à un stade avancé (moins de 50 lymphocytes T CD4⁺/mm³) • Coût élevé et disponibilité limitée (ATU nominative)
Paromomycine	Utilisation approuvée pour d'autres infections	• Efficacité limitée chez les patients atteints du SIDA • Aucune donnée contrôlée dans les autres groupes
Azithromycine	Utilisation approuvée pour d'autres infections	• Pas efficace chez les patients atteints du SIDA à un stade avancé • Peu de données d'efficacité chez les patients atteints du SIDA
Rifaximine	Utilisation approuvée pour d'autres infections	• Quelques cas rapportés de guérison chez des patients atteints du SIDA
Rifabutine	Utilisation approuvée pour d'autres infections	• Efficace en prévention dans les études sur la prophylaxie à <i>Mycobacterium avium</i>
Inhibiteurs de protéase du VIH	Approuvé pour le traitement d'une infection par le VIH	• Résolution de la cryptosporidiose observée chez les patients atteints du SIDA • Efficacité partielle dans les modèles murins

(Checkley et al., 2015)

Un seul médicament, le nitazoxanide (NTZ), chef de file de la famille des thiazolides, a été validé aux États-Unis par la Food and Drug Administration, avec comme indication, le traitement de la cryptosporidiose uniquement chez la personne immunocompétente. Il apparaît très efficace dans cette indication sans effets secondaires notables (Amadi *et al.*, 2002). En France, le nitazoxanide peut être prescrit sous Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU) nominative (Divoux *et al.*, 2016).

A l'heure actuelle, aucun traitement universel et efficace n'est disponible pour lutter contre la cryptosporidiose, en particulier chez la personne immunodéficiente. Une meilleure compréhension des stratégies utilisées par *Cryptosporidium* pour assurer son développement et sa survie, est cruciale pour concevoir et produire un traitement mais également un vaccin. Actuellement, la seule thérapie envisageable est de traiter les symptômes, d'optimiser le traitement antirétroviral chez le patient VIH⁺, et peut-être, inclure du NTZ ou de la paromomycine, selon l'état immunitaire de l'hôte. Afin de limiter au mieux la maladie, les mesures de prévention et d'hygiène, particulièrement chez les personnes à risque, restent le meilleur moyen de lutter contre cette parasitose.

D. Epidémiologie

Cryptosporidium est l'un des parasites intestinaux les plus répandus dans le monde. Actuellement, plus de 95 pays du monde entier ont déclaré une infection à *Cryptosporidium*. La prévalence mondiale est estimée à 7,6%. La plus forte prévalence est observée au Mexique (69,9%), au Nigéria (34%), au Bangladesh (43%) et en Corée (8%) (Dong *et al.*, 2020). Dans les pays industrialisés en particulier, la prévalence est estimée entre 0,5 et 2% (Guyot *et al.*, 2012). Les enfants sont beaucoup touchés par la maladie : 30,7% des écoliers en Zambie ont été détectés positifs à *Cryptosporidium* (Dong *et al.*, 2020), 10,4% des enfants au Liban (Osman *et al.*, 2016) et 77% chez les enfants bangladais vivants dans des bidonvilles (Dong *et al.*, 2020). A Lima, au Pérou, une étude a été menée sur 2 490 individus infectés par le VIH dont 230 étaient positifs à *Cryptosporidium*. Sur les 193 personnes pour lesquelles le génotypage des espèces responsables de l'infection a pu être réalisé : 141 personnes ont été contaminées par *C. hominis*, 22 par *C. parvum*, 17 par *C. meleagridis*, 6 par *C. canis*, 6 par *C. felis* et 1 par *C. suis* (Cama *et al.*, 2007). De manière générale, *C. parvum* et *C. hominis*, sont responsables de la majorité des infections humaines dans le monde (plus de 90% des cas). A l'exception du Pérou et de la Thaïlande, où le taux d'infection à *C. meleagridis* est aussi élevé que celui à *C. parvum*.

Aux Etats-Unis, au Canada, en Australie et au Japon, *C. hominis* est responsable d'un plus grand nombre d'infections que *C. parvum*. L'inverse est observé en Europe (Guyot *et al.*, 2012).

a. En Europe

Depuis 2012, L'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) signale une augmentation des infections à *Cryptosporidium* au Royaume-Uni, aux Pays-Bas, en France et en Allemagne (Fournet *et al.*, 2013). Toutefois, la cryptosporidiose demeure sous-diagnostiquée et sous-déclarée malgré qu'elle soit l'une des maladies transmissibles pour lesquelles la surveillance est obligatoire dans 21 des 31 pays de l'Union Européenne (UE) et de l'Espace Economique Européen (EEE) (Koutsoumanis *et al.*, 2018). Les déclarations des cas de cryptosporidiose présentent une forte saisonnalité en Europe, avec une augmentation saisonnière prononcée surtout en été (Cacciò & Chalmers, 2016). Les données recueillies en 2017, dans le rapport de l'ECDC publié en 2019 (ECDC, 2019), rapportent 11 449 cas de cryptosporidiose confirmés (**Figure 8**). L'Europe du Nord a l'incidence la plus élevée. L'Allemagne, les Pays-Bas et le Royaume-Uni représentent 71% des cas. Les patients les plus touchés sont les enfants de 0 à 4 ans. Treize des 22 pays où ce calcul a pu se faire, ont déclaré moins de 1 cas pour 100 000 habitants se trouvant dans cette tranche d'âge (ECDC, 2019).

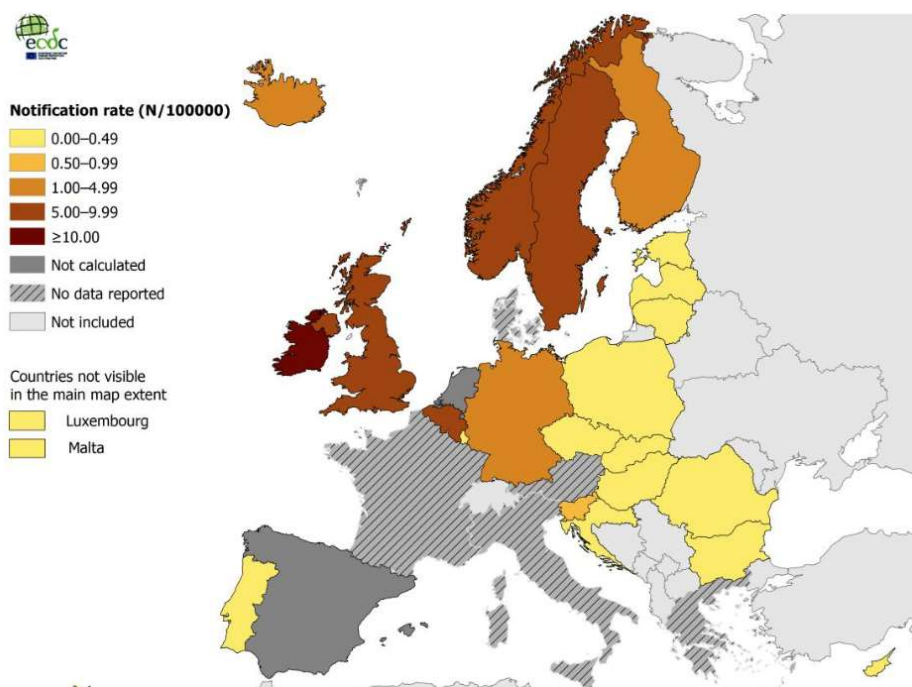


Figure 8 – Distribution du nombre de cas de cryptosporidiose par 100 000 habitants (adultes et enfants compris) en Europe en 2017.

(ECDC, 2019)

b. En France

De 2017 à 2019, 750 cas de cryptosporidiose ont été déclarés au niveau du Centre National de Référence – Laboratoire Expert Cryptosporidiose (CNR-LE Cryptosporidiose). La déclaration de cas de cryptosporidiose n'étant pas obligatoire en France, le nombre de cas rapporté au CNR-LE Cryptosporidiose est probablement largement sous-estimé par rapport au nombre de cas réels. *C. parvum* et *C. hominis* sont les espèces les plus fréquemment retrouvées avec 70% et 24% des cas, respectivement. Le pic d'infection est observé en été, entre juillet et octobre ; 71% des patients atteints de cryptosporidiose étaient des personnes immunocompétentes et 29% des personnes immunocompromises. Parmi ces patients atteints d'immunodéficience, 53% d'entre eux sont des personnes transplantées d'organes. La distribution des cas de cryptosporidiose liée à la saison estivale pourrait s'expliquer par : (i) les loisirs, notamment par la fréquentation accrue des piscines et parcs aquatiques, (ii) la consommation d'eau plus importante en été liée aux fortes chaleurs, ainsi que (iii) les préférences alimentaires pour des produits frais, consommés crus ou peu cuits (salades, fruits et légumes crus) (Costa *et al.*, 2020). Deux pics de prévalence ont également été observés selon l'âge : un concernant les enfants de moins de 5 ans et l'autre, les femmes âgées entre 20 et 34 ans (Costa *et al.*, 2020). La distribution de ces cas de cryptosporidiose est probablement liée au fait que les enfants en bas âge ne sont pas encore immunisés contre la cryptosporidiose. En effet, il a été montré que la dose infectante est multipliée par 20 après une primo-infection (Chappell *et al.*, 1999). Pour le second pic observé, il s'agirait probablement des jeunes parents qui sont directement en contact avec des enfants primo-infectés (production importante de *Cryptosporidium* lors de la première contamination). Une étude visant à déterminer les facteurs responsables de ces infections a pu être menée dans 40% des cas. Le mode de transmission le plus courant en France est d'origine hydrique avec la consommation d'eau non embouteillée (60% des cas décrits) et la fréquentation d'eau de baignade (48%). Vingt-trois pour cent des cas de cryptosporidiose ont été décrits comme probablement d'origine alimentaire : 12% associés à la consommation de fruits de mer, 9% à celle de lait cru et 2% à celle de cidre fermier (Costa *et al.*, 2020).

IV. Transmission du parasite à l'Homme

Cryptosporidium spp. est un pathogène omniprésent aussi bien chez l'Homme que chez les animaux de compagnie, de rente, et sauvages. Les oocystes, excrétés *via* les selles de l'hôte

infecté, sont retrouvés dans l'environnement et sont responsables d'un nombre important d'épidémies d'origine hydrique et alimentaire dans le monde.

A. Survie des oocystes

Une fois les oocystes de *Cryptosporidium* excrétés dans l'environnement, leur paroi épaisse leur confère une réelle protection. L'oocyste est reconnu comme étant particulièrement résistant à différents stress environnementaux qui sont létaux pour la plupart des agents pathogènes. Il est en effet capable de survivre pendant 6 mois dans les eaux de rivières et les excréments conservés à +4°C (Robertson *et al.*, 1992) et jusqu'à un an dans l'eau de mer de +6 à +8°C (Tamburrini & Pozio, 1999). Il persiste aussi dans les fumiers et les pâturages après épandage de fumier contaminé (Smith *et al.*, 2014).

En revanche, dans des conditions extrêmes, les oocystes de *Cryptosporidium* demeurent sensibles. La congélation à -70°C induit une perte totale d'infectiosité du parasite, mais partielle entre -15 et -20°C (Fayer & Nerad, 1996 ; Robertson *et al.*, 1992). Le parasite est aussi sensible à des hautes températures : un traitement de l'eau ou du lait contaminé à +71°C pendant 5, 10 et 15 secondes rend le parasite non-infectieux (Harp *et al.*, 1996). Cette inactivation est également observée dès un traitement à +64°C pendant 2 minutes (Fayer, 1994). La dessiccation est décrite comme pouvant être létale pour *Cryptosporidium*. Un séchage pendant 4h à température ambiante, diminue drastiquement la viabilité parasitaire (Dawson, 2005).

De nombreux désinfectants utilisés dans le traitement de l'eau ou des aliments n'inhibent pas ou très peu l'infectiosité des oocystes. En revanche, l'ozone et le dioxyde de chlore inactivent les oocystes plus efficacement que les chloramines (Korich *et al.*, 1990 ; Peeters *et al.*, 1989). L'inactivation de 90% des parasites est observée lors d'exposition à 1ppm d'ozone pendant 5 minutes ; à 1,3ppm de dioxyde de chlore pendant 1h ou à 80ppm de chloramines pendant 90 minutes (Korich *et al.*, 1990). Les ultraviolets (UVs) sont connus pour engendrer une inactivation totale des oocystes présents à la surface de framboises (Le Goff *et al.*, 2015). La concentration et le temps d'exposition des différents agents désinfectants utilisés a un réel impact sur la survie du parasite. Or, les concentrations et les temps de traitement utilisés en industrie ne permettent pas une telle inactivation (Castro-Hermida *et al.*, 2006 ; Duhain *et al.*, 2012).

B. Modes de transmission

Vermeulen *et al.* (2017) ont estimé la charge d'oocystes de *Cryptosporidium* dans le fumier de bétail au niveau mondial à $3,2 \cdot 10^{23}$ oocystes/an, et ont prédit qu'il s'agissait de la principale source de contamination environnementale en Europe et en Amérique du Nord. Sans contrôle adéquat, cette contamination représente un risque pour la santé humaine, car les animaux infectés par *C. parvum* pourraient excréter jusqu'à 10^7 oocystes par gramme de matières fécales (Fayer & Santín, 2009). Les oocystes sont déjà infectieux lors de leur excrétion, ce qui permet une transmission féco-orale avec un risque d'infection directe et immédiate. La contamination d'un hôte se fait à différents niveaux (Figure 9).

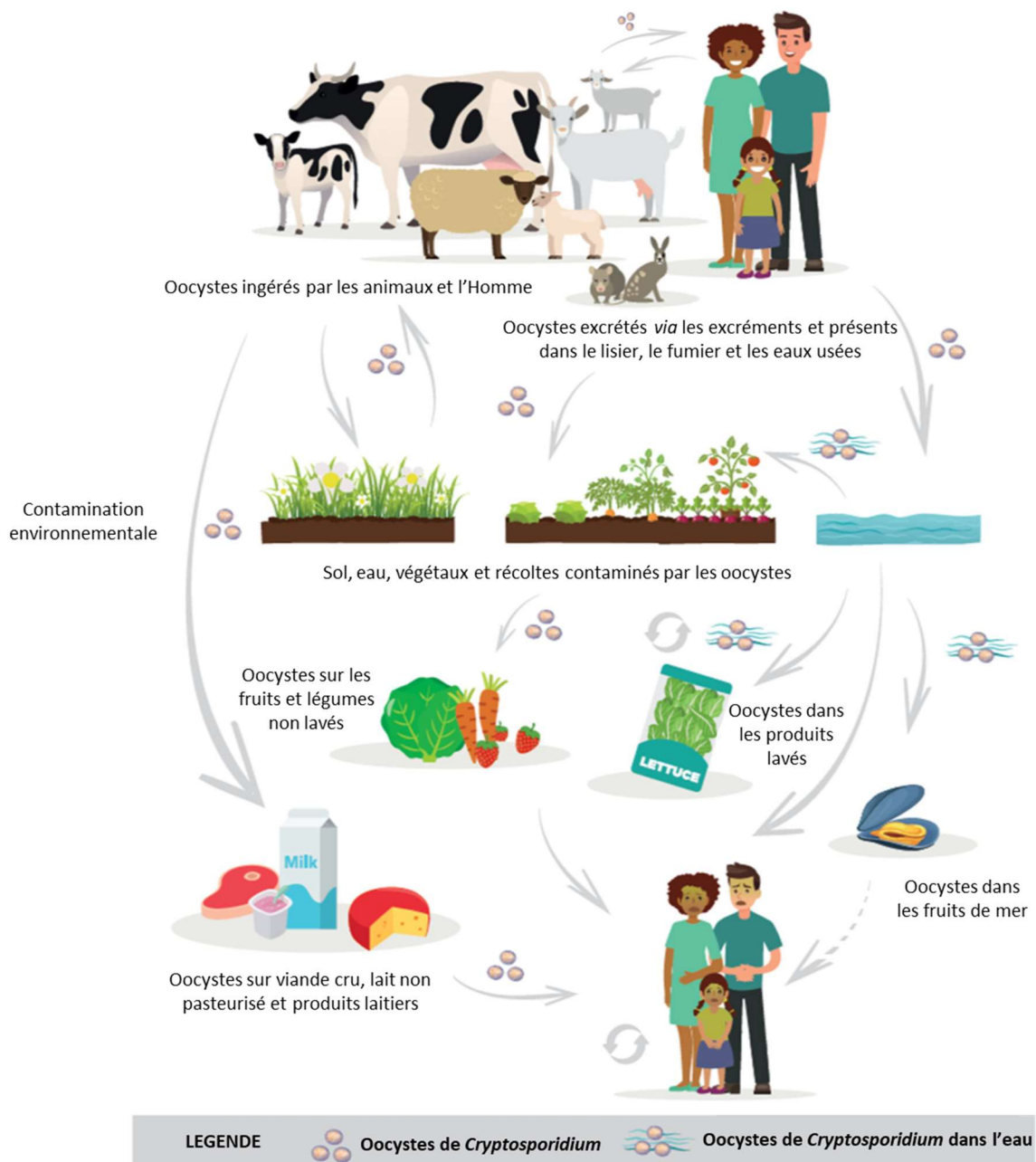


Figure 9 – Mode de transmission de *Cryptosporidium*.

(Koutsoumanis *et al.*, 2018 modifié)

• **La transmission directe**, par voie féco-orale, est de type zoonotique lorsqu'un animal contamine un autre animal ou l'Homme ; de type anthroponotique, d'Homme à Homme ; ou anthropozoonotique, d'Homme à animaux. La contamination se fait *via* les oocystes excrétés par l'animal malade (cas d'infection très courante chez les éleveurs et les vétérinaires) ou par des porteurs asymptomatiques (cas des animaux domestiques ou d'élevage). La transmission d'Homme à Homme peut être directe, en particulier dans les familles, les garderies ou encore les hôpitaux (Pumipuntu & Piratae, 2018).

• **La transmission indirecte** se produit en raison de la contamination environnementale. Elle implique les denrées alimentaires, l'eau, le contact avec du matériel contaminé tel que les vêtements et les chaussures utilisés par exemple dans la ferme d'élevage ou le parc animalier. Les matières fécales contaminées peuvent directement propager les oocystes de *Cryptosporidium* dans de nombreux réservoirs d'eau, en particulier dans les eaux potables et eaux d'irrigation ; ainsi que dans les eaux récréatives (Pumipuntu & Piratae, 2018 ; Craun *et al.*, 2005 ; Hlavsa *et al.*, 2015). La contamination des matières premières alimentaires peut se faire, soit directement à partir de fumiers insuffisamment thermisés et utilisés comme engrais, soit *via* les eaux d'irrigation, les eaux de lavage et de traitement des aliments. La manipulation des aliments par des personnes infectées dont l'hygiène est insuffisante peut également être impliquée dans la propagation du parasite. Pour le lait cru et les produits laitiers crus en particulier, la contamination par contact direct avec les matières fécales des animaux peut également être possible. Les fruits de mer sont considérés comme des vecteurs alimentaires possibles de transmission de *Cryptosporidium* mais aucun cas documenté d'infection humaine n'a été rapporté après consommation de coquillages infectés (Koutsoumanis *et al.*, 2018).

C. Transmission alimentaire

a. Prévalence dans les aliments

En raison de la forte capacité de résistance dans l'environnement et des modes de transmission de ce parasite, les matrices alimentaires vulnérables vis-à-vis du danger *Cryptosporidium* sont principalement les légumes, les herbes aromatiques, les fruits et les mollusques bivalves. Ainsi, des prévalences moyennes de 0 à 53% ont été rapportées dans ces matrices (**Tableau 4**). De grandes variabilités ont parfois été observées pour une même matrice

alimentaire, pouvant être attribuées à la zone géographique d'échantillonnage et également à l'utilisation de méthodes de détection souvent différentes.

Tableau 4 – Prévalence de *Cryptosporidium* dans les aliments.

ALIMENT	PRÉVALENCE MOYENNE (%) [min-max]	PAYS (NOMBRE D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)
Légumes		
Laitue	24,2 [0-78]	Costa-Rica (80) ¹ , Norvège (125) ² , Ghana (72) ³ (168) ⁶ , République tchèque (129) ⁴ , Espagne (13) ⁵ , Canada (446) ⁷ , Égypte (73) ⁸ (80) ¹² , Éthiopie (23) ⁹ , Iran (80) ¹⁰ , Vietnam (9) ¹¹ , Nigéria (25) ¹³ , Chine (98) ¹⁴
Epinard	10,4 [0-40]	Canada (59) ¹⁵ (387) ⁷ , Nigéria (25) ¹³ , Chine (60) ¹⁴
Cresson	23,0 [9-44]	Iran (90) ¹⁶ , Égypte (116) ¹² , Vietnam (9) ¹¹
Chou	13,3 [0-75]	Espagne (6) ⁵ , Chine (62) ¹⁴ , Corée (3) ¹⁸ (70) ¹⁹ , Ghana (168) ⁶ , Inde (47) ²⁰ , Canada (44) ⁷ , Éthiopie (96) ⁹ , Égypte (10) ¹² , Nigéria (25) ¹³
Poivron	9,9 [3-22]	Éthiopie (66) ⁹ , Ghana (168) ⁶ , Égypte (30) ¹²
Poireau	10,4 [3-22]	Iran (90) ¹⁶ , Irak (80) ²¹ , Égypte (100) ¹²
Oignon	8,7 [0-19]	Iran (54) ¹⁶ , Égypte (94) ⁸ (100) ¹² , Chine (16) ¹⁴ , Irak (80) ²¹ , Ghana (72) ³
Carotte	14,4 [0-78]	Égypte (20) ¹² , Corée (3) ¹⁸ , Nigéria (25) ¹³ , Éthiopie (62) ⁹ , Inde (25) ²⁰ , Bangladesh ²² , Ghana (72) ³ , République tchèque (138) ⁴
Tomate	21,9 [1-75]	Corée (73) ¹⁹ , Inde (56) ²⁰ , Ghana (72) ³ , Éthiopie (100) ⁹ , Égypte (87) ⁸ (12) ¹² , Nigéria (25) ¹³ , Bangladesh ²²
Céleri	13,7 [0-33]	Vietnam (9) ¹¹ , Irak (80) ²¹ , Chine (17) ¹⁴
Concombre	26,5 [2-75]	Inde (52) ²⁰ , Égypte (93) ⁸ , Bangladesh ²² , République tchèque (129) ⁴
Radis	53,0 [6-100]	Inde (14) ²⁰ , Canada ²¹
Salade (4 ^{ème} gamme)	3,4 [1-6]	Canada ²⁵ , Italie (72) ²⁴
Herbes aromatiques		
Coriandre	20,5 [4-40]	Iran (90) ¹⁶ , Costa-Rica (80) ¹ , Inde (28) ²⁰ , Vietnam (9) ¹¹
Persil	6,8 [0-21]	Norvège (7) ² , Égypte (65) ⁸ (88) ¹² , Irak (80) ²¹
Basilic	28,6 [1-56]	Iran (90) ¹⁶ , Vietnam (9) ¹¹
Menthe	15,8 [9-23]	Iran (82) ¹⁶ , Bangladesh ²²
Fruits		
Fraise	2 [0-5]	Norvège (62) ² , République tchèque (156) ²³
Myrtille	20,1 [7-33]	Corée (3) ¹⁸ (44) ¹⁹
Framboise	0	Norvège (10) ²
Mollusques bivalves		
Moules	40,6 [12-80]	Brésil (179) ²⁷ , États-Unis (159) ²⁸ (15) ³⁰ , Italie (60) ³¹ , Canada ³² , Norvège (56) ³³ , Hollande (14) ³⁴
Huître	35,0 [6-89]	Brésil (120) ²⁶ , États-Unis (265) ²⁹ , Hollande (46) ³⁵

¹Monge & Arias, 1996 ; ²Robertson & Gjerde, 2001 ; ³Kudah et al., 2018 ; ⁴Huvarova et al., 2018 ; ⁵Amorós et al., 2010 ; ⁶Duedu et al., 2014 ; ⁷Lalonde & Gajadhar, 2016 ; ⁸Ahmad et al., 2016 ; ⁹Alemu et al., 2019 ; ¹⁰Avazpoor et al., 2015 ; ¹¹Chau et al., 2014 ; ¹²El-Sherbini et al., 2016 ; ¹³Maikai et al., 2013 ; ¹⁴Li et al., 2020 ; ¹⁵Bohaychuck et al., 2009 ; ¹⁶Ranjbar-Bahadori et al., 2013 ; ¹⁷Robertson et al., 2001 ; ¹⁸Hong et al., 2014 ; ¹⁹Sim et al., 2017 ; ²⁰Utaaker et al., 2017a ; ²¹Sleman Ali et al., 2018 ; ²²Rahman et al., 2014 ; ²³Dziedzinska et al., 2018 ; ²⁴Caradonna et al., 2017 ; ²⁵Dixon et al., 2013 ; ²⁶Guiguet Leal et al., 2008 ; ²⁷Santos et al., 2018 ; ²⁸Tei et al., 2016 ; ²⁹Graczyk et al., 2007 ; ³⁰Staggs et al., 2015 ; ³¹Marangi et al., 2015 ; ³²Lévesque et al., 2010 ; ³³Srisuphanunt et al., 2009 ; ³⁴Robertson & Gjerde, 2008 ; ³⁵Schets et al., 2007.

b. Cryptosporidiose d'origine alimentaire

Parmi les parasites transmis par l'alimentation, *Cryptosporidium* spp. et *Cyclospora cayetanensis* ont été la cause d'épidémies importantes en Amérique du Nord suite aux importations de légumes contaminés (salade, coriandre, basilic, ail, cresson, herbes à feuilles, laitue) et des fruits (framboises, jus de baie, desserts à base de baies) provenant de régions tropicales. Dans ces régions, les conditions d'hygiène sont défavorables, les eaux usées traitées peuvent être réutilisées pour arroser les légumes et les fruits ; et l'hygiène personnelle des manipulateurs est parfois médiocre (Dawson, 2005 ; Robertson & Chalmers, 2013).

En 2010, sur les 600 millions de cas d'infection d'origine alimentaire, les agents infectieux entériques représentaient la grande majorité, avec 550 millions de cas et 230 000 décès enregistrés. *Cryptosporidium* a été responsable de 8,6 millions de cas avec 3 759 décès cette année-là (Ryan *et al.*, 2018). En Europe, depuis 2010, 310 épidémies d'origine alimentaire causées par les parasites chez l'Homme (représentant 41 036 cas) ont été rapportées par l'EFSA (European Food Safety Authority) et l'ECDC. Parmi ces épidémies, *Cryptosporidium* a été responsable de 69 d'entre elles, avec 33 954 cas humains (EFSA & ECDC, 2012, 2013, 2014, 2015a, 2015b, 2016, 2017, 2018, 2019, 2021). Les épidémies de cryptosporidiose d'origine alimentaire sont peu reconnues et celles qui le sont, sont souvent mal étudiées, et surtout peu déclarées. Deux des raisons à cela : (i) la difficulté de remonter jusqu'à l'aliment responsable, surtout s'il s'agit d'un aliment frais (à consommer rapidement), étant donné que la période d'incubation de la maladie est relativement longue ; et, (ii) l'absence de réglementations nationales et internationales concernant le danger *Cryptosporidium* dans les aliments (Ryan *et al.*, 2018).

Parmi les épidémies mondiales d'origine alimentaire causées par *Cryptosporidium* décrites jusqu'à présent, les sources de contamination sont variées (**Tableau 5**). On retrouve principalement : les fruits, les légumes et les produits laitiers. En se focalisant uniquement sur les légumes consommés crus, dans 58% des cas la consommation de salade est la source de contamination (Ryan *et al.*, 2018 ; Zahedi & Ryan, 2020 ; Loury *et al.*, 2018).

Tableau 5 – Epidémies reportées de cryptosporidiose d’origine alimentaire.

ANNEE	PAYS	NOMBRE DE CAS	ALIMENT RESPONSABLE	ESPECE DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> IMPLIQUEE
2020	Irlande	40	Salade servie en restaurant	<i>C. parvum</i>
2019	Suède	122	Epinard (jus de légumes)	<i>C. parvum</i>
2018	Norvège	6	Jus de pomme pressé	<i>C. parvum</i>
2017	France	150	Fromage blanc au lait non pasteurisé	<i>C. parvum</i>
2016	Etats-Unis	10	Lait de vache cru	<i>C. parvum</i>
2015	Angleterre	424	Salade servie dans un coffee shop	<i>C. parvum</i>
2015	Etats-Unis	103	Lait cru	<i>C. parvum</i>
2014	Etats-Unis	11	Lait de chèvre non pasteurisé	<i>C. parvum</i>
2013	Angleterre	11	Lait provenant d’une ferme laitière avec des problèmes de pasteurisation	<i>C. parvum</i>
2013	Etats-Unis	21	Inconnu	<i>C. hominis</i> et <i>C. parvum</i>
2012	Finlande	> 250	Salade frisée	<i>C. parvum</i>
2012	Norvège	40	Inconnu	<i>C. parvum</i>
2012	Angleterre	648	Mélange de salades « prêt à l’emploi »	<i>C. parvum</i>
2010	Suède	89	Salade garnie	<i>C. parvum</i>
2010	Suède	16	Non identifié, possibilité de transmission par le manipulateur des aliments	<i>C. parvum</i>
2009	Etats-Unis	46	Inconnu	<i>C. parvum</i>
2009	Norvège	74	Carottes	<i>C. parvum</i>
2008	Suède	18	Roquette	<i>C. parvum</i>
2008	Suède	21	Sauce béarnaise contenant du persil frais (ajouté au plat avant d’être servi)	<i>C. parvum</i>
2006	Japon	4	Yukke : plat de viande cru coréen et/ou foie cru	<i>C. parvum</i>
2006	Allemagne		Lait et produits laitiers	Inconnu
2005	Danemark	99	Salade servie à la cantine (carotte et poivron rouge)	<i>C. hominis</i>
2003	Etats-Unis	144	Cidre ozoné	<i>C. parvum</i>
2001	Australie	8	Lait non-pasteurisé	Non déterminé
1998	Etats-Unis	152	Légumes et fruits crus servis à une cantine universitaire	<i>C. hominis</i>
1997	Etats-Unis	54	Plat avec des oignons crus lors d’un banquet	Non déterminé
1996	Etats-Unis	31	Cidre	Non déterminé
1995	Angleterre	50	Lait de vache	Non déterminé
1995	Etats-Unis	15	Salade de poulet	Non déterminé
1993	Etats-Unis	160	Cidre frais	Non déterminé
1990	Russie	13	Kéfir de lait	Non déterminé
1986	Mexique	1	Salade	Non déterminé
1984	Angleterre	24	Saucisse insuffisamment cuite ou lait	Non déterminé

(Ryan et al., 2018 ; Zahedi & Ryan, 2020 ; Naughton et al., 2021 ; Louri et al., 2018)

V. Méthodes de détection de *Cryptosporidium* dans les aliments

Outre le sous-diagnostic clinique et l'absence de déclaration, le nombre de cryptosporidioses alimentaires est probablement sous-estimé en raison du manque de méthodes de détection standardisées et applicables en routine en laboratoire permettant de retrouver l'aliment responsable. Une norme ISO est désormais disponible pour détecter les oocystes de *Cryptosporidium* dans les légumes à feuilles vertes et fruits à baies (ISO 18744 : 2016). Elle reste peu appliquée en laboratoire et ne fait pas consensus au niveau européen. Par ailleurs, cette méthode ne fait pas la distinction entre la détection d'un oocyste mort, vivant et non infectieux, ou vivant et infectieux. Ce ne sont en revanche que les parasites infectieux qui représentent un risque pour le consommateur.

A. Détection de *Cryptosporidium*

La présence de *Cryptosporidium* dans les aliments peut être mise en évidence soit directement par visualisation du parasite en microscopie, soit indirectement par amplification de son ADN par des méthodes de biologie moléculaire telles que la qPCR.

La norme (ISO 18744 : 2016) est basée sur la récupération des parasites à partir de la matrice alimentaire couplée à une détection par microscopie. Elle se compose de plusieurs étapes : une élution, une concentration, puis une purification des parasites grâce à une immuno-séparation par des billes magnétiques (IMS) couplées à des anticorps dirigés contre *Cryptosporidium* spp. Les parasites sont ensuite détectés et quantifiés par marquage immuno-fluorescent spécifique de *Cryptosporidium* spp. (NF EN ISO 18744, 2016). L'utilisation d'anticorps lors de la microscopie et de la purification, permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la technique, et réduit la présence de débris. Afin de réduire les coûts de la méthode, Utaaker *et al.*, (2015) a réduit la quantité de réactifs à utiliser lors de la purification (IMS) avec un rendement de récupération équivalant à celui de la norme. Cette méthode a été validée sur une seule matrice, la laitue. Or, une autre étude a pu montrer que le rendement de récupération variait selon la matrice étudiée (Razakandrainibe *et al.*, 2020).

Les techniques moléculaires telles que la PCR sont de plus en plus utilisées pour la détection de *Cryptosporidium* dans les aliments (Hohweyer *et al.*, 2016). Elles offrent une

sensibilité et une spécificité plus élevées que la microscopie, et la possibilité d'utiliser des tests PCR multiplex. Ce type de PCR permet la détection simultanée de plusieurs types de parasites (ainsi que des bactéries et/ou des virus). De plus, la détection du parasite peut être couplée directement à un sous-typage. Cette information est essentielle pour mieux comprendre la dynamique de transmission de la cryptosporidiose chez l'Homme (Ryan *et al.*, 2018).

Quelle que soit la méthode utilisée (microscopie ou moléculaire), aucune ne fournit l'information en termes de viabilité et/ou d'infectiosité des oocystes de *Cryptosporidium*. Or, étant donné que seul un parasite infectieux représente un danger pour l'Homme, il est nécessaire de disposer de méthodes permettant la détection de ces formes.

B. Détection de parasites viables

Un oocyste dit viable est défini comme étant vivant, intact et métaboliquement fonctionnel mais pas forcément capable d'infecter son hôte et de s'y multiplier. Plusieurs méthodes ont été décrites pour évaluer la viabilité de *Cryptosporidium* (**Tableau 6**).

Le dékystement *in vitro* et les marqueurs de viabilités sont largement utilisés pour étudier la viabilité de *Cryptosporidium* dans des conditions de stress ou face à des agents désinfectants. Le dékystement *in vitro* est basé sur la capacité des oocystes à libérer les sporozoïtes, première étape de son cycle de multiplication. Cependant, il nécessite une certaine expertise de la part du microscopiste, et malheureusement, aucune corrélation n'a été observée avec l'infectiosité du parasite (Rousseau *et al.*, 2018). L'inclusion/exclusion de marqueurs vitaux, quant à elle, est basée sur la perméabilité de la paroi de l'oocyste. Un oocyste viable possède une paroi intacte et imperméable, ainsi l'iodure de propidium ne peut y pénétrer et se lier à l'ADN parasitaire. Néanmoins, elle peut présenter de faux positifs puisqu'une cellule non viable peut avoir une membrane intacte empêchant le marqueur d'y entrer (Rousseau *et al.*, 2018). Des méthodes de biologie moléculaire ont été décrites et sont également utilisées pour évaluer la viabilité du parasite. La plus couramment utilisée est la RT-qPCR qui est basée sur la capacité du parasite viable à produire de l'ARNm en conditions de stress. Le principal problème de cette technique est la stabilité de l'ARN qui peut être indétectable même issu de parasites dits viables.

Le point commun de ces méthodes est le manque de corrélation avec l'infectiosité du parasite. Bien qu'elles soient rapides et faciles à mettre en œuvre, la présence de faux positifs et de faux négatifs engendrent un biais non négligeable. Ainsi, elles peuvent sous- ou surestimer l'exposition de l'Homme face au danger *Cryptosporidium*.

Tableau 6 – Méthodes d'évaluation de la viabilité de *Cryptosporidium* et leurs applications.

METHODE	EN CONDITION ENVIRONNEMENTALE	EN CONDITION EXPERIMENTALE
Dékystement <i>in vitro</i>	Matrice simple^a : eaux de boisson	Matrice simple^a : désinfectant à base de peroxyde d'hydrogène, chlore, dioxyde de chlore, chloramine, ozone, ammoniac, UV, congélation, stockage à +4 et +10°C, dessiccation
Inclusion/exclusion (iodure de propidium)	Matrice simple^a : eaux de mer, de surface et de boisson Matrice complexe : coques, moules, palourdes, huîtres	Matrice simple^a : désinfectant à base de peroxyde d'hydrogène, chlore, ozone, ammoniac, UV, congélation/décongélation, stockage à +4 et +20°C, dessiccation Matrice complexe : - laitue ¹ : stockage à température ambiante à l'obscurité ou non, et à +4°C ; - poivron vert ² : chlore, eau de javel à +96°C, congélation, chauffage au micro-onde
RT-qPCR	/	Matrice simple^a : désinfectant à base de peroxyde d'hydrogène, chlore, dioxyde de chlore, ozone, ammoniac, chaleur (+60°C à +95°C), congélation, stockage à température ambiante, à +4 et +15°C Matrice complexe : stockage à +4°C (basilic)
FISH (capacité à produire de l'ARNr)	Matrice simple^a : eaux Matrice complexe : huîtres	Matrice simple^a : irradiation gamma, stockage à +15°C
PMA-PCR (capacité à exclure le PMA qui, dans le cas contraire, bloque la PCR)	Matrice simple^a : eaux	Matrice simple^a : désinfectant à base de peroxyde d'hydrogène, ammoniac, chaleur (+70°C), stockage à température ambiante et à +4°C

^a : parasites en suspension dans de l'eau ou du tampon. ¹Utaaker et al., 2017b. ²Duhain et al., 2012. UV : UltraViolet. ARNr : ARN ribosomique. PMA : Propidium MonoAzide. PCR : Polymerase Chain Reaction (Rousseau et al., 2018 modifié).

C. Détection de parasites infectieux

Un oocyste infectieux est défini comme un oocyste viable capable de dékyster pour libérer ses sporozoïtes. Ces sporozoïtes libérés pourront ainsi infecter les cellules hôtes et proliférer. La méthode de référence garantissant la détection de parasites infectieux est le modèle animal (Baishanbo et al, 2005 ; Delaunay *et al.*, 2000). Une fois l'animal infecté, l'infectiosité du parasite est évaluée par dénombrement d'oocystes présents dans l'intestin ou dans les fèces. Cette méthode a été utilisée dans de nombreuses études visant à évaluer l'efficacité de traitement sur la survie de *Cryptosporidium* dans différents types d'aliments : cidre, framboises, huîtres, moules, lait, pommes (Hanes *et al.*, 2002 ; Le Goff *et al.*, 2015 ; Collins *et al.*, 2005a ; Collins *et al.*, 2005b ; Gomez-Couso *et al.*, 2006 ; Harp *et al.*, 1996 ; Macarisin *et al.*, 2010a). Cependant, elle est longue, coûteuse et pose de réels problèmes d'éthique vis-à-vis de l'expérimentation animale.

Une méthode alternative aux essais *in vivo* est l'infection de cultures cellulaires par *Cryptosporidium*. Elle est plus facile à mettre en œuvre et donne des réponses plus rapidement, par rapport au modèle animal. Elle a été utilisée avec succès pour évaluer l'infectiosité du parasite dans l'eau mais seulement une étude l'a utilisée pour évaluer l'impact des traitements de jus de fruits contaminés (Kniel *et al.*, 2003). A l'heure actuelle, aucune méthode de ce type n'a été proposée pour détecter des parasites infectieux dans les matières premières alimentaires. Or, en termes de sécurité, il est crucial de disposer d'une telle méthode pour évaluer le danger *Cryptosporidium* dans tous types d'aliments.

VI. La mâche : *Valerianella locusta*

La mâche (*Valerianella locusta*), également connue sous le nom de doucette, est une petite plante annuelle appartenant à la famille des Caprifolicaceae (anciennement Valerianaceae). Elle pousse en forme de rosette et croît par paires de feuilles, chaque paire étant perpendiculaire à la précédente (Peron & Rees, 1998). Ses feuilles vertes foncées, en forme de cuillère, sont tendres avec une saveur caractéristique de noisette (**Figure 10**).



Figure 10 – Photographie de bouquets de mâche.

(L'académie du goût)

La mâche est plus couramment consommée en salade dans de nombreux pays. Elle pousse à l'état sauvage dans certaines régions d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie occidentale. Dans les terres cultivées, elle est considérée comme mauvaise herbe (Verdin *et al.*, 2018). Il existe différentes variétés de mâche, chacune avec ses propres caractéristiques (**Tableau 7**). La variété la plus utilisée est la Gala mais la Princess est de plus en plus cultivée. L'avantage de la Gala est qu'elle peut être produite tout au long de l'année (HM.Clause, 2015).

Tableau 7 – Variétés de mâche.

VARIETE	CARACTERISTIQUES
Gala	La référence qualité ! + Rendement et qualité pour le marché frais comme pour la 4 ^{ème} gamme + Qualité des cotylédons reconnue de tous ; s'utilise toute l'année
Princess	Souplesse et fermeté, l'équilibre royale ! + Variété rustique, souple d'utilisation ; feuille large, épaisse et ferme, de couleur vert foncé + Fort potentiel de rendement ; qualité et tenue des cotylédons de très bon niveau
CLX 3440	Fermeté et rendement ! + Feuille ronde et large d'un vert soutenu ; port érigé + Plante ferme, feuille peu pétiolée
Agathe	Puissance et couleur ! + Croissance rapide + Port dressé ; feuille large, légèrement veinée, vert soutenu
Audace	Compacité et fermeté ! + Pour les productions de printemps
Trophy	Rendement et précocité pour l'hiver ! + Croissance rapide ; très bon potentiel de rendement + Feuille large et ronde
Palace	Une typologie unique ! + Plante restant compacte à feuille très ronde et épaisse ; pétiole court de couleur vert foncé + Très belle présentation tant en barquettes qu'en sachets 4 ^{ème} gamme

(HM. Clause, 2015)

La France est le premier producteur mondial de mâche, avec environ 43 000 tonnes produites sur un peu moins de 8 000 ha en 2014 (Verdin *et al.*, 2018). Plus particulièrement, la culture de mâche est intense dans la région nantaise, dans l'Ouest de la France puisqu'elle passe d'une production de 9 000 tonnes en 1992 à plus de 30 000 tonnes en 2006, soit 3 fois plus en 15 ans (Verdin *et al.*, 2018 ; Jousseau & Margetic, 2007). La Loire-Atlantique produit 83% de la mâche française, la région Provence-Alpes Côte-d'Azur comme la région Rhône-Alpes représentant chacune 2% de la production (Interfel). Ainsi, la région Pays de la Loire représente à elle seule, la moitié de la production européenne (Chambres d'agriculture Pays de la Loire, 2016).

La mâche est une plante rustique, surnommée salade d'hiver puisqu'elle est adaptée au froid. Néanmoins, elle est cultivée toute l'année, en plein champ ou sous tunnel de forçage. Sa culture est plus efficace sur un sol plutôt sableux, bien drainé avec un pH compris entre 6,5 et 7,5. Bien que peu exigeante, l'utilisation d'un engrais riche en potassium, magnésium et calcium est conseillée. Une irrigation régulière est appréciée pour maintenir un sol humide, en raison de la petite taille de la plante qui peut sécher rapidement l'été (Peron & Rees, 1998). La mâche a un pic de production de septembre à avril. Les graines sont semées généralement de septembre à début octobre, pour être récoltée tout l'hiver. La germination prend 8 à 15 jours en fonction du temps (+12 à +15°C, zone ombragée). Concernant la récolte, il faut compter 40 à 110 jours après semis : en été 35 à 40 jours et en hiver 8 à 10 semaines. Quelle que soit la saison, la récolte est toujours basée sur le stade de développement de la plante : 6 à 8 feuilles pour la vente en sachet de 4^{ème} gamme, et 8 à 10 feuilles pour la vente en barquette (Peron & Rees, 1998).

L'industrie de 4^{ème} gamme propose aux consommateurs des salades prêtes-à-l'emploi. Ces salades nécessitent un parfait état visuel et sanitaire afin d'obtenir des lots de production irréprochables. Ainsi la récolte, le lavage et le conditionnement des salades en sachet sont hautement mécanisés et soumis à de nombreux contrôles qualités (Verdin *et al.*, 2018). A l'heure actuelle, la mâche comme l'épinard, étant produite tout au long de l'année, est de plus en plus cultivée dans des systèmes hors-sols. Ces systèmes permettent de : (i) diminuer la contamination des sols avec des pesticides, (ii) d'utiliser moins d'eau, (iii) de contrôler et d'ajuster directement l'apport en nutriments et (iv) de produire des cultures plus uniformes (Gullino *et al.*, 2019).

VII. Sécurité sanitaire des aliments

A. Impacts sociaux, économiques et sanitaires

La mondialisation du commerce alimentaire, l'évolution des pratiques agricoles, et l'augmentation du nombre de personnes à risques (séniors, immunodéficients), sont des facteurs qui contribuent à l'émergence de nouvelles maladies d'origine alimentaire. De même, l'augmentation de la population sur la planète nécessite d'accroître les rendements de production pour subvenir aux besoins alimentaires, engendrant des pratiques favorables à l'émergence de certains pathogènes. Mais aussi, le changement climatique généré par l'activité humaine, entraînant une augmentation des gaz à effet de serre ainsi qu'une augmentation de la température et des changements dans les régimes pluviométriques, influence le développement et la propagation des pathogènes, notamment dans les aliments (Gullino *et al.*, 2019).

L'arrivée d'un agent pathogène dans un nouvel environnement peut perturber l'équilibre biologique présent et être responsable de nouvelles épidémies humaines comme végétales. Par exemple, des maladies fongiques à *Fusarium*, sont apparues et sont de plus en plus décrites chez les légumes à feuilles vertes dont la contamination peut se produire dès la graine. La présence de ces micro-organismes, vient perturber le développement des végétaux conduisant à une perte importante de la culture, induisant un impact économique conséquent pour l'agriculteur. En effet, si plus de 5% des feuilles sont touchées, l'aliment devient invendable (Gullino *et al.*, 2019).

La contamination des aliments par des micro-organismes pathogènes peut survenir à n'importe quel stade entre sa production et sa consommation. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que 600 millions de personnes dans le monde (une personne sur 10) sont malades après avoir mangé des aliments contaminés, dont 420 000 meurent chaque année. Cette infection d'origine alimentaire représente 110 milliards de dollars, en Amérique, perdus chaque année en productivité et en dépenses médicales en raison de la nourriture insalubre. La population la plus touchée concerne les enfants de moins de 5 ans qui représente 40% des patients atteints de maladies d'origine alimentaire, avec 125 000 décès chaque année. Les épisodes diarrhéiques sont les symptômes les plus courants, ils représentent 550 millions de personnes et plus de la moitié des décès chaque année (World Health Organization, 2015).

Une épidémie d'origine alimentaire est définie par l'apparition d'au moins deux cas groupés présentant des symptômes similaires, en général gastro-intestinaux, dont on peut rapporter la cause à un même aliment contaminé par un micro-organisme donné. En 2019, 5 175 épidémies d'origine alimentaire et hydrique ont été signalées en Europe, affectant 49 463 personnes, dont 3 859 hospitalisations et 60 décès. Parmi les agents pathogènes humains impliqués, les bactéries représentent la principale cause d'infection (26%) avec *Salmonella* (18%) et *Campylobacter* (6%), suivies par les Norovirus avec 11% des cas. En revanche, les parasites ne bénéficient pas du même niveau d'attention et sont souvent négligés. En 2019, les parasites ont été responsables de 0,6% des épidémies d'origine alimentaire dont 0,2% dû à *Cryptosporidium*. Or, ce nombre est très probablement sous-estimé, étant donné que les parasites ne sont pas recherchés et que pour un très grand nombre d'épidémies d'origine alimentaire (40%), l'agent pathogène n'est pas identifié (EFSA & ECDC, 2021). Cependant, depuis quelques années, le risque lié à la présence de parasites dans les aliments suscite un intérêt croissant de la part des autorités sanitaires.

B. Réglementation en agroalimentaire

Afin d'assurer une alimentation saine et de bonne qualité aux consommateurs, les aliments sont régis par des normes sanitaires. Le « Paquet hygiène » rassemble les règlements appliqués à tous les Etats membres de l'Union européenne. Il régit la filière agroalimentaire allant de la production primaire, animale et végétale jusqu'à la distribution au consommateur, en passant par l'industrie et le transport de l'aliment. Après une succession de crises alimentaires, cette législation trouve son origine dans le Livre blanc de la Commission sur la sécurité alimentaire, et entre en application le 1^{er} janvier 2006 (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, 2020). Le « Paquet hygiène » permet d'harmoniser le niveau de sécurité sanitaire, impliquant l'ensemble des acteurs de la chaîne alimentaire, soumis aux mêmes exigences. Il a pour objectif d'officialiser la responsabilité des professionnels, notamment par l'obligation de traçabilité des aliments, mais aussi par le retrait de produits susceptibles de présenter un risque pour la santé publique. De nombreux contrôles sanitaires sont réalisés en France. Ils sont obligatoires et rigoureux afin d'assurer que seules les denrées de qualité sont mises sur le marché (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, 2020). Les différents acteurs de la filière alimentaire sont encouragés à utiliser les Guides de Bonnes Pratiques d'Hygiène (GBPH) et sont dans l'obligation de mettre en place des procédures basées sur les principes de l'HACCP (Hazard Analysis Critical Control). Ces guides, rédigés par des

professionnels et validés par l'administration, ont pour objectifs d'aider les professionnels à maîtriser la sécurité sanitaire des aliments et à respecter la législation (ANSES, 2020).

Le règlement (CE) n°2073/2005 est un texte d'application du « Paquet hygiène » qui définit deux types de critères microbiologiques : la sécurité et l'hygiène des procédés. La sécurité microbiologique des aliments est principalement assurée par une approche préventive et définit « l'acceptabilité d'un produit ou d'un lot qui est applicable aux produits mis sur le marché » jusqu'à la fin de leur durée de vie. Les critères d'hygiène caractérisent « l'acceptabilité du fonctionnement du procédé de production ». S'il y a un non-respect de ces critères d'hygiène, des mesures correctives seront mises en place pour maintenir l'hygiène du procédé. Le « Paquet d'hygiène » recommande de prendre en considération tous les micro-organismes présents et potentiellement capables d'affecter la santé des consommateurs. Actuellement, il concerne certaines bactéries et virus pathogènes et des toxines. Aucun critère n'est établi pour les parasites protozoaires dans les aliments et aucune réglementation n'impose donc leur recherche. L'absence de méthode standardisée pour extraire et détecter ce type de micro-organismes jusqu'en 2016 contribue probablement à cette absence de réglementation (ANSES, 2020 ; Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, 2020).

Objectifs et stratégies de recherche

Objectifs et stratégies de recherche

Les maladies infectieuses d'origine alimentaire résultent de la consommation d'aliments contaminés par un agent pathogène, et dépendent de nombreux facteurs. L'agent pathogène doit survivre jusqu'au moment de la consommation de l'aliment à des concentrations suffisantes pour provoquer la maladie. La dose nécessaire provoquant l'infection de son hôte et sa survie est, dans de nombreux cas, très faible. Le micro-organisme doit pouvoir contaminer l'aliment, persister à sa surface, sans nécessairement se reproduire. C'est le cas pour *Cryptosporidium*. Ce parasite n'est pas capable de se multiplier en dehors de son hôte, et doit survivre et persister en nombre suffisant à la surface de l'aliment pour assurer sa transmission.

La prévalence de *Cryptosporidium* peut atteindre les 53% dans certains aliments (cf. **Tableau 4**). L'évaluation du danger lié à la présence de ce parasite dans les denrées alimentaires apparaît cruciale. Cette transmission alimentaire du parasite à l'Homme est étroitement liée à la capacité des oocystes à survivre, c'est-à-dire à conserver leur potentiel infectieux dans des conditions difficiles, et à se maintenir sur les matrices alimentaires. Cependant, ces données de survie, de persistance et d'adhérence sont rares. La mâche a été retenue comme modèle d'étude car elle présente une plus forte probabilité de contamination (cultivée près du sol). Elle n'est pas parée lors du processus de 4^{ème} gamme, est soumise à un lavage plus doux en raison de sa fragilité, et est intégralement consommée. La mâche Gala a été sélectionnée car il s'agit de la variété la plus cultivée. Elle est peu exigeante en termes de culture. La production de mâche est très présente sur le territoire français et d'importance économique pour le pays. Une étude de prévalence réalisée dans le bassin nantais a mis en évidence que la mâche « matière première » (au champ) et la mâche « prête à l'emploi » (après transformation, procédé 4^{ème} gamme) pouvaient être contaminées (données ACTALIA, projet PARALENCE, 2014-2017, CRPL-CRBN). Cette matrice est donc concernée par le danger *Cryptosporidium*. Dans la mesure où, pour les parasites, l'efficacité des procédés de transformation est limitée, contrôler la contamination en amont est essentiel pour réduire la transmission et assurer la sécurité des produits. Par conséquent, les industriels s'interrogent sur l'exposition de leurs cultures végétales à ce pathogène émergent et sur sa capacité à persister et survivre lors de la production primaire.

L'objectif général de ce projet est d'accroître les connaissances sur la survie et le comportement des oocystes de *Cryptosporidium parvum* à la surface de la mâche. Cette thèse se décompose en deux chapitres principaux :

- Le premier chapitre est axé sur l'évaluation de la persistance et de la survie des oocystes de *C. parvum* à la surface de la mâche, dans les conditions de croissance de ce végétal et en industrie agroalimentaire (procédé de transformation).

- Le second chapitre vise à évaluer l'impact de certains paramètres environnementaux sur l'adhérence des oocystes sur la mâche, ainsi qu'à caractériser certaines interactions impliquées dans cette adhérence.

Chapitre 1



Chapitre 1 : Étude de la persistance et de la survie de *Cryptosporidium parvum* à la surface de la mâche

I. Introduction

La transmission des oocystes de *Cryptosporidium*, via les aliments, est directement dépendante de leur capacité à survivre sur ces matrices. Pour cela, les oocystes doivent être capables : i) de résister aux stress rencontrés lors de la croissance de la mâche ainsi qu'au cours du procédé industriel et ii) d'interagir durablement avec la matrice.

La survie des oocystes sur les aliments, exposés aux agents stressants extérieurs, est très peu documentée. La présence d'une paroi robuste ainsi que sa composition moléculaire contribuent fortement à la résistance du parasite dans différentes conditions (Belli *et al.*, 2006). Bien que les oocystes soient résistants dans un milieu plutôt frais et humide, ils sont tout de même sensibles à la dessiccation (Dawson, 2005). Une unique étude a démontré que les oocystes de *C. parvum* sont internalisés au niveau des stomates des feuilles d'épinards leur conférant ainsi une protection vis-à-vis d'agents stressants extérieurs et donc probablement favorisant leur survie (Macarisin *et al.*, 2010b).

Concernant l'impact du procédé industriel de 4^{ème} gamme, une seule équipe s'est intéressée à la survie des oocystes de *C. parvum* à la surface de poivrons verts après un traitement au chlore. Après exposition des poivrons contaminés à 100ppm de chlore, 90% des oocystes récupérés étaient viables (Duhain *et al.*, 2012). Une étude a pu montrer que les oocystes persistent à la surface de feuilles de basilic et restent viables après 8 jours au réfrigérateur (Hohweyer *et al.*, 2016). Ceci a également été mis en évidence à la surface de feuilles de laitue après 14 jours d'incubation (Utaaker *et al.*, 2017b). Ces données concernent l'aval de la production (procédés de décontamination et stockage de l'aliment). La persistance et la survie du parasite au moment de la production primaire demeurent inexplorées à l'heure actuelle. Des études similaires ont été appréciées chez d'autres types de pathogènes humains. La survie du Poliovirus à la surface de légumes en cours de croissance a été évaluée. Ce type de virus partage des caractéristiques communes avec *Cryptosporidium* en termes de mode de contamination et de spécificité d'hôte. Il ne peut se multiplier qu'au sein de son hôte, et son mode de transmission peut se faire via l'ingestion d'aliments contaminés. Dans cette étude, du céleri, des épinards, de la laitue et des tomates ont été cultivés, puis irrigués avec de l'eau

contaminée par le virus. Les résultats ont montré que le virus persiste et survit 4 jours sur le céleri, 13 jours sur les épinards, moins de 2 jours sur la laitue et 6 jours sur les tomates (Ward & Irving, 1987).

La survie de *Cryptosporidium* est généralement évaluée grâce à des méthodes mesurant la viabilité des oocystes et non leur infectiosité. La Reverse Transcription suivie d'une PCR en temps réel (RT-qPCR) et l'inclusion/exclusion de l'iodure de propidium, ont été utilisées dans les expérimentations sur les feuilles de basilic et de laitue, respectivement (Hohweyer *et al.*, 2016 ; Utaaker *et al.*, 2017b). Cependant, un oocyste viable n'est pas forcément infectieux. Deux types de méthodes permettent une telle mesure :

- les essais en modèles animaux, qui restent la technique la plus utilisée mais qui est lourde et coûteuse, et surtout, elle pose des problèmes d'éthique ;
- l'infection de cellules en culture *in vitro*, plus accessible et permettant de produire des résultats plus rapidement (Rousseau *et al.*, 2018).

L'alternative *in vitro* a été retenue dans le cadre de cette étude afin de suivre la survie des oocystes à la surface de la mâche en cours de croissance, mais aussi après lavage de la matrice végétale contaminée selon le procédé industriel de 4^{ème} gamme. Cette étude permettra ainsi de documenter l'exposition au danger *Cryptosporidium* pour les consommateurs.

Sur la base de travaux existants, une méthode standardisée a été développée. Elle est basée sur la capacité des oocystes de *Cryptosporidium* à libérer spontanément leurs sporozoïtes, et sur la mesure de l'infection et la prolifération des sporozoïtes au sein de cellules humaines en culture par PCR en temps réel (CC-qPCR).

L'évaluation de la survie (mais aussi l'adhérence, chapitre 2) nécessite d'avoir à disposition des suspensions d'oocystes aux caractéristiques définies et standardisées. Ainsi, des travaux ont été menés pour définir les conditions permettant d'obtenir des suspensions d'oocystes dont l'intégrité, la surface et les propriétés adhésives ne sont pas affectées.

II. Matériel et méthodes

A. Matériel

a. Les oocystes de *Cryptosporidium parvum*

La souche de *C. parvum* dite « Nouzilly » est utilisée dans cette étude. Elle a été initialement isolée chez un enfant infecté et est maintenue par infections expérimentales de veaux nouveau-nés, par l'Institut Nationale de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) de Nouzilly (France). Les oocystes sont purifiés par IMS (kit Isolate® for IMmunoSeparation of *Cryptosporidium* oocysts ; TCS Biosciences, Royaume-Uni), excepté lorsque cela est précisé. Ils sont ensuite conservés à +4°C dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS ; Gibco™ Thermo Fisher Scientific, France), et utilisés dans les 3 mois qui suivent leur purification. Chaque suspension parasitaire est systématiquement vortexée (30sec) avant utilisation.

b. La mâche

La variété de mâche utilisée dans cette étude est la Gala (Hubert, France). Des graines de mâche Gala sont germées à température ambiante, avec un arrosage tous les jours. Après germination, les stades 2 feuilles sont incubés dans une étuve thermostatée à $+10 \pm 0,27^{\circ}\text{C}$ avec une humidité moyenne de $95 \pm 5,51\%$ mimant une culture d'hiver réalisée en jours courts sous lumière artificielle (10h d'exposition/24h ; LED spéciale croissance (spectre complet) ; Agrolight, Hydrozone, France). L'arrosage des plants par les racines est espacé à une fois par semaine jusqu'au stade de récolte. Du terreau universel est utilisé pour réaliser la croissance de la mâche (Truffaut, Isneauville). De la mâche commerciale de 1^{ère} gamme (barquette avec la notion « à laver avant consommation » ; Nantial, France), achetée dans des grandes surfaces locales (Intermarché ou E. Leclerc, Rouen), est également utilisée afin d'obtenir un poids total de 30g / échantillon (cf. partie B. e. Contamination expérimentale de la mâche et purification des oocystes).

c. La lignée cellulaire HCT-8

La lignée cellulaire choisie est issue d'adénocarcinome iléocal humain (HCT-8 ; ATCC CCL-224) car elle s'avère très sensible au développement du parasite *C. parvum* (Upton *et al.*, 1994). Les cellules HCT-8 sont conservées dans une solution composée de 90% de sérum de veau fœtal (SVF, Eurobio, France) décomplémenté et de 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO ; Corning™ ; Thermo Fisher Scientific, France) dans de l'azote liquide. La culture cellulaire s'effectue dans un milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco ; Thermo Fisher Scientific, France) supplémenté avec 5% de SVF décomplémenté, 1mM de L-glutamine, 100 UI/mL de pénicilline (Corning™ ; Thermo Fisher Scientific, France) et 100 pg/mL de streptomycine (Corning™ ; Thermo Fisher Scientific, France). Les supports de culture sont des flasques ventilées de 75cm² contenant 15ml de milieu RPMI 1640, placées dans un incubateur à +37°C avec 5% (vol/vol) de dioxyde de carbone (CO₂) dont l'atmosphère est saturée en eau.

Les cellules sont repiquées tous les 2 à 3 jours lorsqu'elles atteignent 80 à 90% de confluence. Toutes les manipulations de cellules sont effectuées sous une hotte à flux laminaire et après stérilisation du matériel. Le repiquage des cellules consiste à retirer le surnageant et à rincer les cellules avec du milieu de culture, avant d'ajouter 2ml de trypsine-EDTA (0,05% ; Gibco ; Thermo Fisher Scientific, France). Les cellules sont ensuite incubées pendant 10min à +37°C afin de détacher complètement le tapis cellulaire. La trypsine permet de dégrader le système protéique de fixation des cellules aboutissant à leur séparation et leur détachement du support de culture. Huit millilitres de milieu sont ensuite ajoutés et un soin particulier est accordé pour dissocier les cellules les unes des autres et les remettre en suspension. Après une étape de centrifugation (800rpm – 10min à température ambiante), le surnageant contenant la trypsine, est retiré et est remplacé par du milieu frais préalablement chauffé à +37°C. Enfin le volume de cellules nécessaire pour un repiquage est prélevé et ajouté à du milieu de culture frais dans une nouvelle flasque de culture.

B. Méthodes

a. Purification des oocystes de *C. parvum* à partir des selles de veaux

Pour la comparaison des méthodes de purification, l'extraction des oocystes est réalisée à partir d'1ml de selle/condition testée. Une fois la méthode sélectionnée, la purification est

effectuée à partir de 5ml de selle. La selle de veaux est centrifugée à 3 000g pendant 30min à +4°C avant toute purification. Le surnageant est retiré et le culot est conservé pour isolement des oocystes selon différentes procédures décrites ci-dessous.

- Immuno-séparation par des billes magnétiques (IMS)

L'IMS permet de purifier le parasite grâce à des anticorps monoclonaux spécifiques de la paroi des oocystes de *Cryptosporidium* spp. conjugués à des billes magnétiques (cf. **Annexe 1**). Les oocystes sont séparés des débris à l'aide d'un aimant. Après incubation et une série de lavages, les oocystes sont libérés des billes par dissociation acide (HCl à 0,1N ; Sigma, France) et mécanique par vortex. La suspension d'oocystes purifiés est ensuite neutralisée avec de la soude (NaOH à 1N ; Sigma, France) et une solution tamponnée stérile (PBS) est ajoutée. La suspension parasitaire est conservée à +4°C jusqu'à utilisation.

- Éther suivi d'un gradient de saccharose

Après re-suspension du culot dans du PBS, un volume de diéthyl-éther (dilution 1/3 ; Sigma, France) est ajouté. Le mélange est ensuite vigoureusement homogénéisé puis centrifugé (3 000g pendant 30min à +4°C). Après élimination du gâteau lipidique et du surnageant, le culot est remis en suspension dans du PBS puis déposé sur un gradient de saccharose (densités de 1,09 et de 1,045 ; Sigma, France). Une solution mère de saccharose est utilisée (densité = 1,4) puis diluée dans de l'eau distillée au ¼ pour obtenir une densité de 1,09 puis au ½ pour une densité de 1,045. Après centrifugation, les oocystes sont récupérés au niveau de l'interface entre les deux solutions de saccharose. La suspension parasitaire est ensuite lavée (PBS), une fois, par centrifugation. Le culot est repris dans du PBS puis conservée à +4°C jusqu'à utilisation (Le Goff *et al.*, 2015).

- Gradients de saccharose et de chlorure de césium (CsCl)

Le culot remis en suspension dans du PBS est déposé sur un gradient de saccharose comme décrit précédemment. Après centrifugations (3 000g pendant 30min à +4°C) et lavage des oocystes récupérés au niveau de l'interface entre les deux solutions de saccharose, le culot

est remis en suspension dans du PBS puis déposé sur un gradient de CsCl (densités de 1,1 et 1,05 ; AlfaAesar, France). Ce gradient est effectué à partir d'une solution mère de CsCl (densité de 1,4) et du tampon Tris (50mM Tris, BioRad, France ; 10mM d'EDTA, Sigma, France ; pH=7,2). Des dilutions de cette solution mère sont réalisées au $\frac{1}{4}$ pour obtenir une densité de 1,1 puis au $\frac{1}{2}$ pour une densité de 1,05. Après centrifugation, l'interface entre les deux solutions de CsCl est récupérée puis lavée (PBS), une fois, par centrifugation. Enfin, le culot est resuspendu dans du PBS puis conservée à +4°C jusqu'à utilisation (Le Goff *et al.*, 2015 ; Kuczynska & Shelton, 1999).

- Gradients de saccharose et de Percoll™

Le culot remis en suspension dans du PBS est déposé sur un gradient de saccharose préparé comme indiqué précédemment. Les parasites récupérés au niveau de l'interface entre les deux densités de saccharose sont lavés par centrifugation à 3 000g pendant 30min à +4°C dans du PBS. Le culot est ensuite mis en suspension dans du PBS et soumis à une centrifugation (2 200g pendant 20min à +4°C) en gradient de Percoll™ (densité = 1,066). La solution mère de Percoll™ (densité de 1,131 ; VWR, France) est diluée au $\frac{1}{2}$ dans du tampon HBSS (Hank's Balanced Salt Solution ; VWR, France). Les parasites récupérés en surface sont ensuite lavés (PBS), une fois, par centrifugation (2 200g pendant 20min à +4°C). Enfin, le culot est conservé dans du PBS à +4°C jusqu'à utilisation (Le Goff *et al.*, 2015 ; Arrowood & Sterling, 1987).

- Gradients de CsCl et de Percoll™

Le culot est remis en suspension dans du PBS, déposé sur un gradient de CsCl (comme préparé ci-dessus), puis centrifugé (3 000g pendant 30min à +4°C). Les parasites sont ensuite récupérés au niveau de l'interface des deux densités de CsCl. Après centrifugation, le culot est remis en suspension (PBS), soumis à un gradient de Percoll™ (préparée comme indiqué ci-dessus) puis centrifugé à 2 200g pendant 20min à +4°C. Les parasites récupérés sont lavés (PBS), une fois, par centrifugation (2 200g pendant 20min à +4°C) puis le culot est conservé dans du PBS à +4°C jusqu'à utilisation (Kuczynska & Shelton, 1999 ; Arrowood & Sterling, 1987).

- Floculation par le sulfate ferrique

Le culot est remis en suspension dans du tampon de sulfate ferrique (9,37g de sulfate ferrique/l d'eau distillée ; Sigma, France). Après incubation à température ambiante toute la nuit, le surnageant est retiré et le culot récupéré. Le culot est remis en suspension dans du tampon d'acide citrique (8,4g d'acide monohydrate (Sigma, France) + 17,64g de citrate de sodium (Sigma, France) / 100ml d'eau distillée). Après 1 heure d'incubation, le surnageant est retiré puis le culot est lavé à l'eau distillée par centrifugation à 2 000g pendant 10min à +4°C (Karanis & Kimura, 2002). Le culot récupéré est conservé à +4°C dans du PBS.

- Solution Bailenger, éther et sulfate de zinc

Le culot resuspendu dans de l'eau distillée est centrifugé à 1 000g pendant 4min à +4°C. Le culot récupéré est remis en suspension dans de la solution Bailenger (15g d'acétate de sodium (Sigma, France) + 3,6ml d'acide acétique (99-100% ; Sigma, France) / l d'eau distillée). Après 1min de sédimentation, de l'éther est ajouté dans le surnageant. Après vortex (30sec), la suspension est centrifugée à 1 000g pendant 4min à +4°C. Le culot est ensuite déposé sur une solution de sulfate de zinc (densité à 1,09 ; Sigma, France), puis centrifugé pendant 5min à 2 500g à +4°C. Les parasites sont récupérés en surface puis lavés (PBS) par centrifugation (1 000g pendant 4min à +4°C). Le culot final est conservé dans du PBS à +4°C (ANOFEL *et al.*, 2018 ; Bailenger, 1966).

b. Dénombrement des oocystes

Le dénombrement des oocystes est réalisé soit après immunomarquage, soit par dépôt sur lame Kova[®] (Dutscher, France). L'immunomarquage des oocystes est effectué avec un anticorps spécifique de la paroi de *Cryptosporidium* Crypto-Cel – FITC (TCS Biosciences, Royaume-Uni) selon le protocole du fournisseur. Dix microlitres de la suspension parasitaire sont déposés sur une lame, séchés, puis fixés avec 20µl de méthanol. Après séchage, 25µl de Crypto-Cel sont rajoutés puis la lame est incubée pendant 15min à +37°C dans une chambre humide et à l'obscurité. La lame est lavée par ajout de PBS (20µl) puis un liquide de montage est déposé. La lame est ensuite recouverte d'une lamelle avant observation. Les observations sont effectuées au grossissement x400, en utilisant les longueurs d'onde d'excitation de filtres

associés et appropriés sur le microscope Diaplan (Leitz, Suisse). Les oocystes apparaissent vert brillant. Le rendement d'extraction est calculé pour chaque méthode de purification et correspond au (nombre d'oocystes purifiés / nombre d'oocystes initialement présents dans la selle) x 100. Le nombre d'oocystes initial est établi par comptage des oocystes directement dans la selle non purifiée, diluée au 1/100^{ème}. Lors de l'évaluation du dékystement du parasite à +37°C, les oocystes sont nombrés par dépôt de 10µl sur lame Kova[®]. Cette lame permet de réaliser une numération à l'aide d'une grille de comptage, en microscopie optique (grossissement x400 ; Olympus CH30, France). Les parasites présents dans 10 carreaux sont dénombrés, une moyenne par carreau est calculée x 90 (facteur multiplicateur) = quantité de parasites/µl de la suspension utilisée.

c. Vérification de la qualité de la suspension parasitaire purifiée

La présence d'impuretés, issues de la selle, de la suspension parasitaire extraite par les différentes méthodes de purification est appréciée sur lame Kova[®] par microscopie optique au grossissement x400.

d. Évaluation de la perméabilité de la paroi de l'oocyste

L'impact des méthodes de purification, permettant d'obtenir des suspensions de qualité, sur la perméabilité de la paroi des oocystes est évalué. Une perturbation de l'organisation structurale de la paroi qui est normalement imperméable peut faciliter le passage de soluté. Au cours de cette étude et en collaboration avec M. Aurélien DUMETRE de l'UMR VITROME d'Aix-Marseille université, la perméabilité des oocystes a été évaluée par mesure de l'incorporation de l'iodure de propidium. L'IP ne peut pénétrer et marquer les acides nucléiques que si la paroi des oocystes est endommagée. Ainsi, l'intégrité de la paroi parasitaire peut être quantifiée en suivant le rapport (nombre IP⁺ / nombre IP⁺+IP⁻) x 100. Les oocystes positifs à l'IP (IP⁺) présentent une coloration rouge brillant, les oocystes négatifs (IP⁻) sont pâles.

La solution d'IP (1mg/ml ; Invitrogen[™] ; Thermo Fisher Scientific, France) conservée à +4°C dans un tube ambré est ajoutée à l'inoculum (10µl) puis incubée pendant 5min à +37°C à l'obscurité. Après incubation, 900µl de PBS sont ajoutés et la suspension est centrifugée à 10 000rpm pendant 3min. Après incubation, le surnageant est ensuite éliminé et le culot est

remis en suspension dans du PBS. La suspension est vortexée brièvement et à nouveau centrifugée (10 000rpm – 3min), ensuite le culot est remis en suspension dans 50µl de PBS et 10µl sont déposés sur une lame (n=2 lames) pour observation au microscope.

e. Contamination expérimentale de la mâche et purification des oocystes

Lors de la mise au point de la méthode de récupération des oocystes à partir des feuilles de mâche ainsi que dans l'étude de l'impact du procédé de 4^{ème} gamme, des échantillons de 30g de mâche commerciale sont placés dans des sacs Stomacher stériles (Interscience, France). La contamination artificielle avec des oocystes de *Cryptosporidium* (1 à 10⁴, selon l'expérience) est effectuée par inoculation de 100µl de suspension, répartie en dix gouttelettes de 10µl, sur plusieurs feuilles de mâche. L'inoculation est suivie d'une étape de contact de 2 heures à température ambiante sous PSM et d'une nuit (ou de 3 nuits pour l'impact du procédé industriel) à +4°C.

Dans l'étude de la persistante et de la survie des oocystes à la surface de mâche en cours de croissance, des plants de mâche Gala au stade 2 feuilles sont contaminés avec le parasite (10⁵ oocystes) par dépôt de cinq gouttes de 1µl. Lors de la récupération des oocystes, les plants sont supplémentés avec de la mâche commerciale afin d'obtenir un poids total de 30g/ échantillon.

La récupération des oocystes de *C. parvum* est ensuite réalisée selon la méthode ISO 18744 : 2016 modifiée par Razakandrainibe *et al.* (2020 ; cf. **Annexe 2**) et Utaaker *et al.* (2015) ; et adaptée à la mâche (**Figure 11**). Les parasites sont élués par ajout de 180ml de tampon d'éluion (glycine 1M (Sigma, France), à pH=3 sauf indication), et homogénéisation dans un mélangeur à pales (BagMixer, Interscience, France) pendant 1 minute à température ambiante (vitesse 8 coups/sec). Le filtrat est ensuite collecté et réparti dans 4 tubes (Falcon de 50ml). Le sac Stomacher est lavé avec 20ml de tampon et ajoutés ensuite aux tubes précédents. Les parasites sont concentrés par centrifugation à 3000g pendant 30min (ou 1 600g pendant 10min si précisé) à +4°C. Après élimination du surnageant, les culots contenant les oocystes sont remis en suspension dans 2ml de solution détergente (1% SDS (Sigma, France) ; 0,1% Tween80 (Sigma, France) ; 0,001% antifoam Y (Sigma, France) ; qsp 50 ml eau distillée ; selon l'essai), puis regroupés. Après homogénéisation au vortex pendant 1min, le pool est à nouveau centrifugé à +4°C (3 000g – 30min ou 1600g – 10min si précisé). Le culot finalement obtenu

est remis en suspension dans 8ml de PBS auxquels sont ajoutés 100µl de billes d'IMS (ou 20µl selon l'expérience) pour procéder à la purification des oocystes. Les oocystes ainsi purifiés sont dénombrés par immunofluorescence (Cf. Chapitre 1. II. B. b. Dénombrement des oocystes) pour évaluer le rendement de récupération de la méthode (nombre de parasites récupérés / nombre de parasites initialement inoculés sur feuilles de mâche x 100) et stockés à +4°C. Un témoin négatif non inoculé est systématiquement analysé.

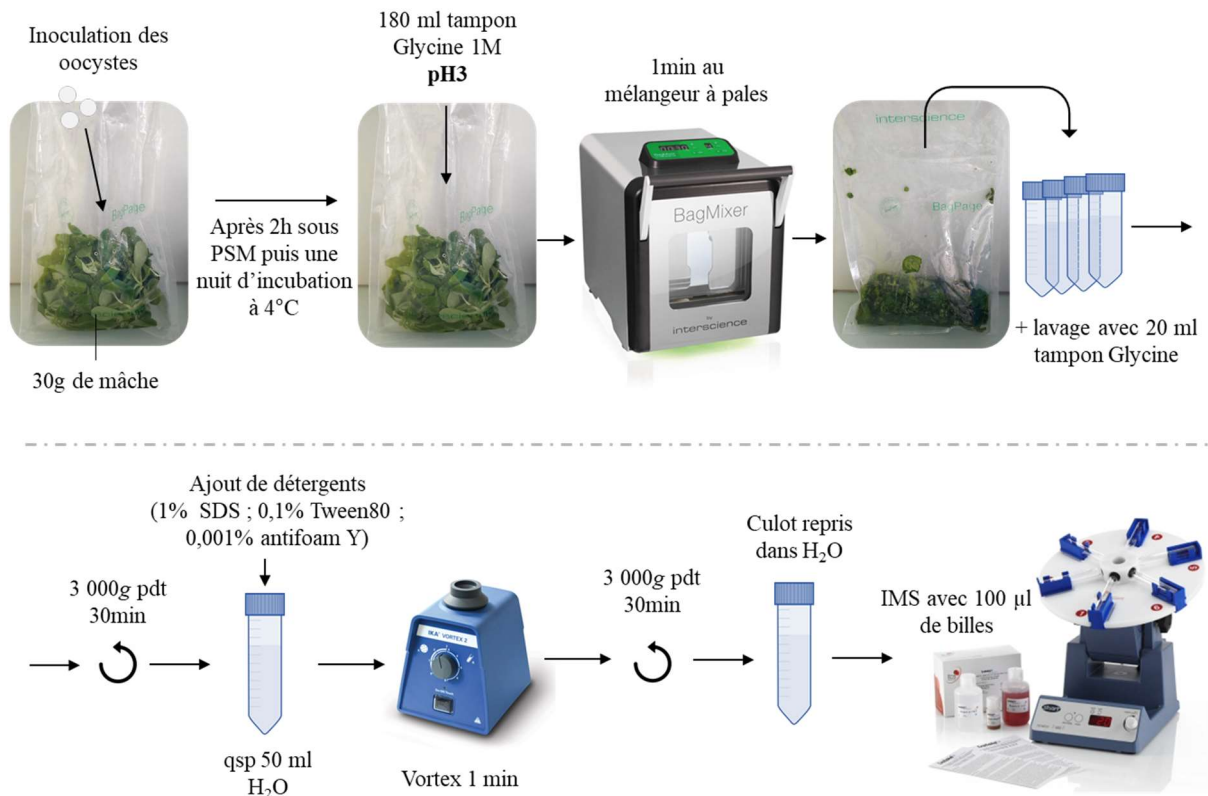


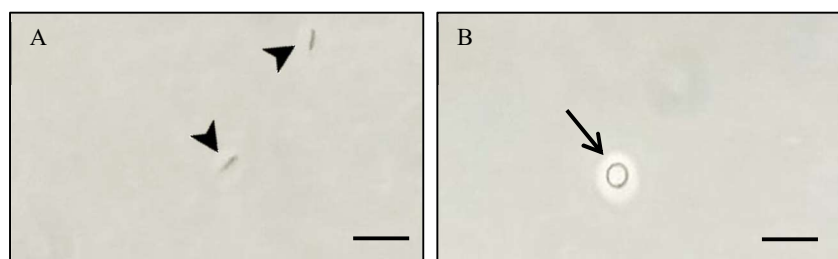
Figure 11 – Protocole de récupération et de purification des oocystes à partir de la mâche contaminée.

f. Évaluation du dékystement *in vitro* des oocystes

D'après les données de la littérature, avant de réaliser une infection en culture cellulaire, un traitement de *Cryptosporidium* à l'acide taurocholique induisant le dékystement des oocystes, est couramment réalisé (Pecková *et al.*, 2016 ; Cook *et al.*, 2006 ; Gargala *et al.*, 2000 ; Fayer, 1995). Afin d'éliminer tout autre contaminant microbien, l'eau de javel est utilisée comme pré-traitement des oocystes avant infection (Cook *et al.*, 2006). Dans cette étude, l'impact de ce traitement (acide taurocholique) et de ce pré-traitement (eau de javel) sur le dékystement des oocystes est évalué. Pour chaque condition testée, 10⁵ oocystes sont utilisés :

- 1) Incubation d’oocystes dans du milieu RPMI 1640 contenant 1,5% d’acide taurocholique à +37°C (Sigma, France) (Gargala *et al.*, 2000).
- 2) Pré-traitement ou non d’oocystes à l’eau de javel (2,63% d’hypochlorite de sodium ; Intermarché, Rouen) pendant 5 ou 10min à température ambiante suivi d’une centrifugation à 15 000g pendant 10min (Fayer, 1995) (élimination de l’eau de javel), mise en suspension du culot dans du milieu RPMI 1640 puis incubation à +37°C.
- 3) Pré-traitement des oocystes à l’eau de javel à température ambiante pendant 5 ou 10min, lavage dans du PBS par centrifugation (15 000g – 10min à température ambiante), puis remise en suspension dans du milieu RPMI 1640 supplémenté en acide taurocholique (1,5%) suivi d’une incubation à +37°C.

L’incubation à +37°C est effectuée pendant 1h pour déterminer le rendement de dékystement et pendant 15 à 120min pour la cinétique de dékystement. Dans ce cas, toutes les 15 minutes, 10µl de chaque suspension sont prélevés et déposés sur lame Kova® (n=2 lames). Le dénombrement des sporozoïtes est réalisé pour chaque condition en microscopie optique (**Figure 12**). Le rendement de dékystement est calculé : (nombre de sporozoïtes libérés / nombre de sporozoïtes initial théorique) x 100. Le nombre de sporozoïtes initial théorique est égal au nombre d’oocystes initialement présents x 4 sporozoïtes/oocyste.



Les pointes de flèche (A) montrent des sporozoïtes et la flèche (B) un oocyste. Échelle = 10µm.

Figure 12 – Photographie de sporozoïtes libres (A) et d’un oocyste (B).

g. Préparation des parasites pour infection de cultures cellulaires HCT-8

1. Préparation des oocystes purifiés à partir de selles de veaux

Lors de l’évaluation de l’impact du dékystement sur l’infectiosité des parasites, différentes suspensions de parasites sont préparées à partir de 10⁴ oocystes :

- des oocystes dékystés sont incubés pendant 1h à +37°C avec de l’acide taurocholique ;

- des oocystes prétraités à l'eau de javel pendant 10min à température ambiante ;
- des oocystes prétraités à l'eau de javel pendant 10min à température ambiante, lavés dans du PBS par centrifugation (15 000g – 10min) puis incubés à +37°C avec de l'acide taurocholique ;
- des oocystes non prétraités et non dékystés ;
- et, des oocystes inactivés par une incubation pendant 10min à +95°C.

Les différentes suspensions parasitaires préalablement préparées (ci-dessus) sont centrifugées (15 000g – 10min) et remises en suspension dans 1ml de milieu de co-culture RPMI 1640 supplémenté avec 45mg/ml de glucose (Sigma, France), 40µg/ml d'acide para-aminobenzoïque (Sigma, France), 40µg/mL d'HEPES (Sigma, France), 0,35mg/ml d'acide ascorbique (Sigma, France), 1UI/ml d'insuline (Sigma, France), 100UI/ml de pénicilline, 100 pg/ml de streptomycine et 10% de SVF (Upton *et al.*, 1995). Les suspensions parasitaires ainsi préparées sont ensuite inoculées sur des tapis cellulaires HCT-8 à 90% de confluence.

2. Préparation des oocystes récupérés à partir de feuilles de mâche

Les oocystes récupérés de la mâche expérimentalement contaminée par IMS sont remis en suspension dans 1ml de milieu de co-culture et inoculés (10³ oocystes/puit de culture) directement sans aucun traitement (non prétraités et non dékystés) sur des tapis cellulaires HCT-8.

h. Évaluation de l'infectiosité du parasite par infection de cultures cellulaires et détection par PCR en temps réel (CC-qPCR)

Les cultures cellulaires permettent d'évaluer l'infectiosité et la multiplication du parasite dans des conditions contrôlées et standardisées. La méthode de CC-qPCR est basée sur la capacité du parasite à accomplir son cycle de développement et se multiplier au sein des cellules. La multiplication parasitaire est mise en évidence par qPCR en détectant spécifiquement l'ADN du parasite au sein des cellules. Les cultures cellulaires peuvent être inoculées directement avec des oocystes purifiés, des oocystes dits dékystés (dékystement induit) ou des sporozoïtes purifiés après dékystement. Quelle que soit la forme initiale inoculée aux cellules, ce sont les sporozoïtes qui pourront y pénétrer et s'y multiplier.

1. Infection des cellules HCT-8 par *C. parvum*

Avant d'être infectées par les parasites, les cellules sont repiquées dans des plaques 24 puits (Dutscher, France) à une densité de $4-6 \cdot 10^4$ cellules/puits et cultivées en monocouche jusqu'à 90% de confluence à +37°C sous 5% de CO₂. Selon les expériences, différentes suspensions de parasites (oocystes dékystés ou non) sont préparées comme indiquées ci-dessus (cf. Chapitre 1. II. B. g. Préparation des parasites pour infection de cultures cellulaires HCT-8) puis déposées sur la monocouche de cellules. Contrairement aux méthodologies décrites dans la littérature, les suspensions parasitaires sont également déposées dans des puits sans cellules HCT-8. Cette condition permet de détecter la présence de parasites infectieux par comparaison des résultats obtenus en présence (+ prolifération parasitaire) et en absence (- prolifération parasitaire) de cellules. Les plaques sont ensuite incubées à +37°C sous 5% de CO₂. L'incubation est arrêtée 48 heures après l'inoculation des parasites (sauf indication).

2. Extraction de l'ADN et détection des parasites par qPCR

Après infection, l'extraction de l'ADN total est réalisée sur l'ensemble des puits avec cellules HCT-8 (+ parasites) et sans cellules HCT-8 (+ parasites). Dans chaque puit, 180µl de tampon ATL et 20µl de protéinase K (QIAmp DNA Mini kit, Qiagen, France) sont ajoutés, puis la plaque de culture est incubée pendant 1h à +56°C. L'ensemble du puit est ensuite transféré dans des tubes de 2ml. L'ADN total est extrait et purifié à l'aide du kit QIAmp DNA Mini selon les instructions du fournisseur. L'ADN de *C. parvum* est spécifiquement détecté en ciblant une séquence de 452pb (Laxer *et al.*, 1991) et en amplifiant un fragment de 138bp (Fontaine & Guillot, 2002). La qPCR est effectuée dans des plaques 96 puits (BioRad, France) sur un thermocycleur CFX96™ (Bio-Rad, France) dans un volume total de 25µl contenant : 5µl d'ADN, 12,5µl d'iQ™ Supermix (Bio-Rad, France), 1µl de chaque amorce à 10µM (forward, 5'-CGCTTCTCTAGCCTTTTCATGA-3' ; reverse, 5'-CTTCACGTGTGTTTGCCAAT-3' ; concentration finale 400nM), 0,25µl de sonde à 10µM (5' FAM-CCAATCACAGAATCATCAGAATCGACTGGTATC-3' BHQ1 ; concentration finale 100nM). Les conditions d'amplification sont : +95°C – 3min, suivi de 45 cycles de +95°C – 15sec et +60°C – 1min. Le logiciel BioRad CFX Manager est utilisé pour analyser les courbes d'amplification et déterminer les valeurs de Cq.

3. Interprétation des données de CC-qPCR

En fin de culture, l'ADN de toutes les formes du parasite est détecté sans distinction des oocystes infectieux, vivants et non infectieux, et morts. Si des oocystes infectieux ont été initialement déposés, une prolifération sera observée par l'augmentation de la quantité d'ADN parasitaire dans les puits avec cellules. Ceci se traduit par la diminution de la valeur de Cq dans les puits avec cellules par rapport aux puits sans cellules. Ainsi, un ΔCq ($Cq_{(-HCT-8)} - Cq_{(+HCT-8)}$) positif indiquera qu'il y a eu multiplication du parasite au sein des cellules, caractéristique de son pouvoir infectieux (**Figure 13**). Un $\Delta Cq \geq 1$ est fixé comme valeur seuil pour valider la multiplication des parasites sur la base de la variabilité observée pour les valeurs de ΔCq obtenues avec des oocystes inactivés par la chaleur (cf. Chapitre 1. III. C. b. Cinétique d'infection des cellules HCT-8 par inoculation d'oocystes dékystés ou non). En condition contrôlée, la valeur de ΔCq peut renseigner sur le niveau de prolifération parasitaire (+ ou – de prolifération mais pas de valeur de quantification absolue) si, i) une valeur de Cq_{-HCT-8} est bien obtenue et, ii) les quantités d'oocystes infectieux déposés sur les cellules sont similaires entre les conditions comparées (Cq_{-HCT-8} équivalents). Dans le cas de l'évaluation de contaminations naturelles ou de l'efficacité de procédés, les valeurs de Cq_{-HCT-8} peuvent varier d'une condition à l'autre, voire même ne pas être obtenues car la quantité d'oocystes déposés est à la limite de détection de la méthode mise en œuvre. Dans ces cas, les ΔCq ne peuvent pas être comparés et donc, ne renseignent pas sur le niveau de prolifération. Le ΔCq donne uniquement une information qualitative, c'est-à-dire présence ou non de parasites infectieux. Le pourcentage d'échantillons contenant des parasites infectieux est déterminé par calcul du (nombre d'échantillons dont le $\Delta Cq \geq 1$ / nombre d'échantillons total) x 100.

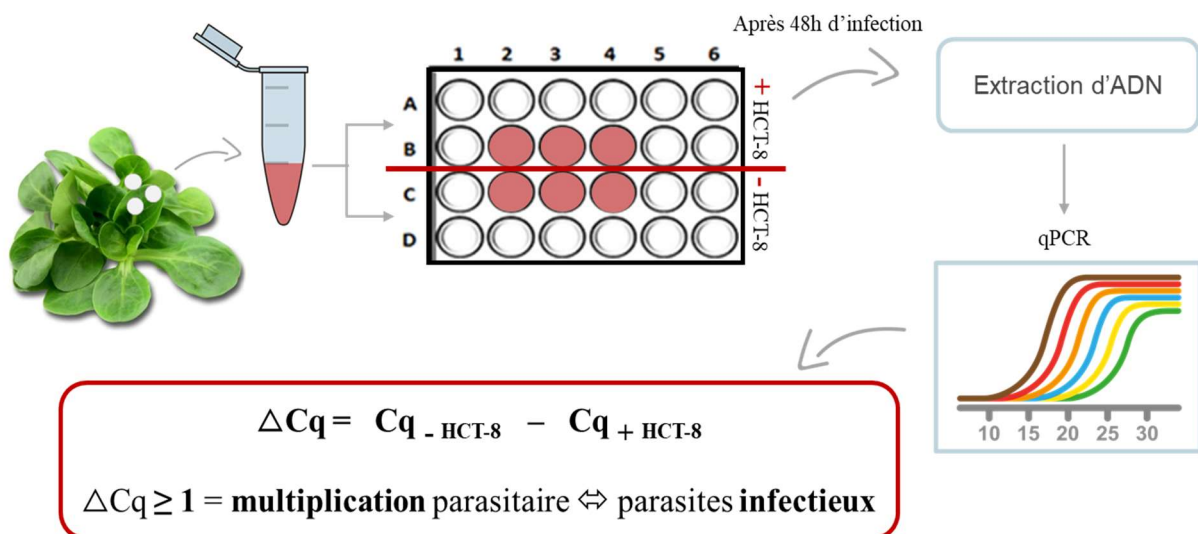


Figure 13 – Procédure pour évaluer l'infectiosité du parasite.

i. Marquage de *C. parvum* au cours de l'infection cellulaire

Afin de suivre la prolifération parasitaire sur tapis cellulaire HCT-8, des expérimentations par marquages immuno-fluorescents ont été effectuées. Cette expérience permet de confirmer la méthode de culture cellulaire utilisée. Des lamelles de culture (Dutscher, France) traitées avec du collagène de type I (100µg/ml ; Corning™ ; Thermo Fisher Scientific, France) pendant 1h à température ambiante sont utilisées. Le collagène de type I permet la fixation et la propagation des cellules sur les lamelles de culture. Une quantité de 6.10^5 cellules HCT-8 sont déposées sur les lamelles traitées. À confluence, 10^5 oocystes non traités et non dékystés sont inoculés sur les cellules. L'infection est réalisée pendant 4, 24 et 48h à +37°C sous 5% de CO₂. Après chaque temps d'infection, les parasites et les cellules présents sur les lamelles sont fixés avec 1ml de méthanol glacé (Thermofischer scientifique, France) pendant 15min à -20°C. Après un lavage (3 x 5min au PBS à température ambiante), une saturation des sites non spécifiques est réalisée par ajout de 2ml de sérum de veau fœtal à 1%, 10min à température ambiante. Après lavage (PBS, 3 x 5min à température ambiante), les cellules sont marquées par ajout d'anticorps polyclonaux spécifiques de Zona Occludens-1 (protéines des jonctions serrées ; Thermofischer scientifique, France) non couplés à un fluorochrome auquel on rajoute un fluorochrome Alexa fluor 594 (Thermofischer scientifique, France). L'incubation est réalisée pendant 1h à +37°C. Ce fluorochrome lors de son excitation émet une coloration rouge et permet de visualiser la paroi des cellules HCT-8. Après lavage (3 x 5min à température ambiante avec du PBS), les parasites sont marqués avec la lectine *Vicia villosa* (couplée au FITC, Vector Laboratories, USA) qui se lie aux N-acétyl-galactosamines présents à la surface des différents stades parasitaires sauf l'oocyste qui est marqué par des anticorps monoclonaux couplés au FITC (Crypto-Cel). L'incubation est réalisée pendant 30min à +37°C. Après un dernier lavage, les lamelles sont observées au microscope à fluorescence.

j. Évaluation de la persistance et de la survie des oocystes.

1. Au cours de la croissance de la mâche

La croissance de la mâche contaminée (cf. Chapitre 1. II. A. b. La mâche) est réalisée pendant 2 mois, jusqu'au stade 8-10 feuilles, stade auquel s'effectue la récolte au champ. Chaque semaine durant la croissance (**Figure 14**), des plants de mâche sont récoltés et les oocystes récupérés (cf. Chapitre 1. II. B. e. Contamination expérimentale de la mâche et

purification des oocystes) afin de réaliser un suivi de la persistance et de la survie du parasite. Un dénombrement des oocystes récupérés est réalisé après immunomarquage (cf. Chapitre 1. II. B. b. Dénombrement des oocystes). La persistance est déterminée selon le calcul suivant : $(\text{nombre d'oocystes récupérés à } J_n / \text{nombre d'oocystes récupérés à } J_1) \times 100$. La survie est évaluée par CC-qPCR en déterminant le pourcentage d'échantillons contenant des parasites infectieux selon la méthode décrite ci-dessus (cf. Chapitre 1. II. B. g. 2. Préparation des oocystes récupérés à partir de feuilles de mâche et h. Évaluation de l'infectiosité du parasite par infection en cultures cellulaires et détection par PCR en temps réel (CC-qPCR)).



Figure 14 – Suivi de la croissance d'un plant de mâche.

Des photographies ont été prises à différents temps après germination (G+semaines).

2. Au cours du procédé industriel de 4^{ème} gamme

Le procédé industriel de 4^{ème} gamme consiste à réaliser un lavage de la mâche qui sera ensuite proposée aux consommateurs sous forme de sachet prêt à l'emploi (**Figure 15**). La mâche contaminée est lavée dans des bains d'eau chlorée à 60ppm (ou non ; pH=6) pendant 30sec sous agitation (bulleur). Après un rinçage à l'eau non chlorée (eau Milli-Q ; Merck Millipore, Allemagne), la mâche est essorée (essoreuse de type ménagère) et déposée dans un nouveau sac Stomacher stérile. Les parasites sont ensuite élués selon le protocole décrit précédemment (cf. Chapitre 1. II. B. e. Contamination expérimentale de la mâche et purification des oocystes). La persistance du parasite après lavage de la mâche à l'eau chlorée (et non chlorée) est déterminée selon le calcul suivant : (nombre d'oocystes récupérés après lavage de

la mâche / nombre d’oocystes récupérés sans lavage) x 100. La survie est évaluée par CC-qPCR telle que précédemment décrite (cf. Chapitre 1. II. B. g. 2. Préparation des oocystes récupérés à partir de feuilles de mâche et h. Évaluation de l’infectiosité du parasite par infection en cultures cellulaires et détection par PCR en temps réel (CC-qPCR)).

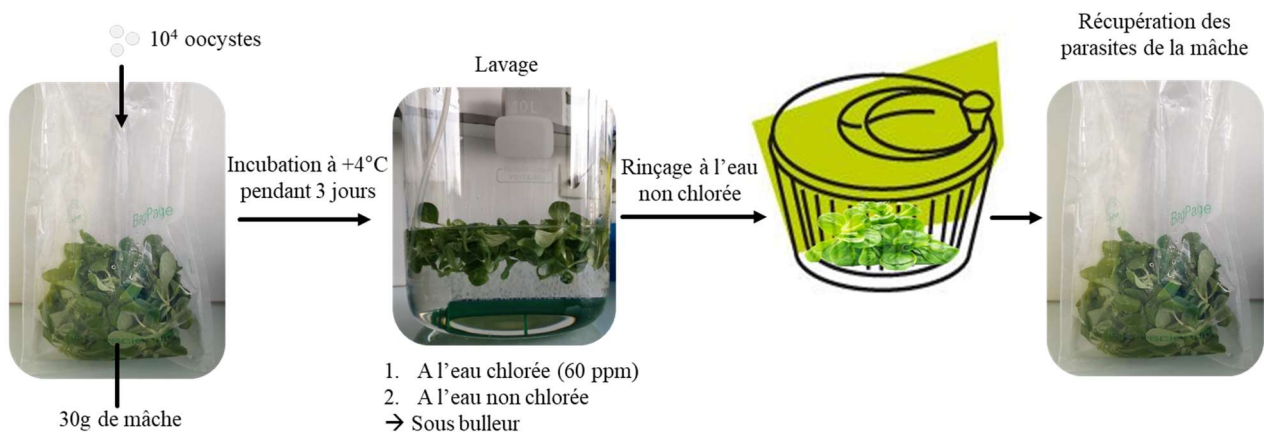


Figure 15 – Protocole mimant le procédé industriel de 4^{ème} gamme.

k. Présentation des résultats

Lorsque les résultats sont présentés sous forme de boîtes à moustache ; l'ensemble des données est représenté par le minimum, le premier quartile, la médiane, le troisième quartile et le maximum (**Figure 16**). Ce type de représentation permet de bien visualiser la répartition des valeurs obtenues d'une même condition et d'identifier les extrêmes.

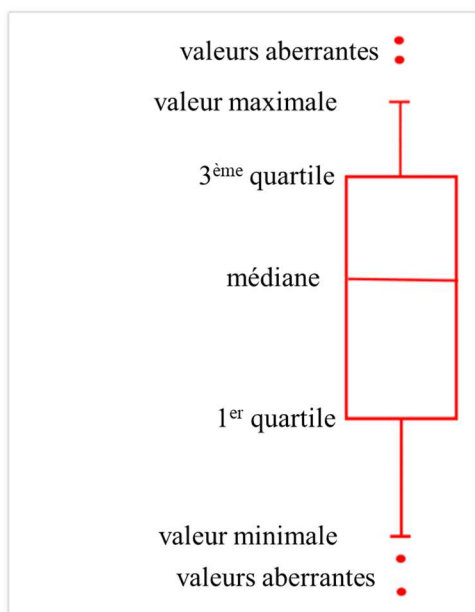


Figure 16 – Représentation des données par « boîte à moustache ».

Différentes informations sont représentées sur cette boîte à moustache :

- la boîte représente 50% des valeurs ;
- la médiane correspond à la valeur qui sépare la moitié inférieure de la moitié supérieure de l'ensemble des valeurs ;
- le 1^{er} quartile présente 25% des valeurs et le 3^{ème} quartile 75% ;
- la longueur des moustaches renseigne sur la dispersion des valeurs : la moustache inférieure correspond à 25% des valeurs les plus petites, et la supérieure à 25% des valeurs les plus grandes.

I. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel R (version 4.0.3). Les hypothèses de normalité des données sont testées par le test de Shapiro et Wilk. La majorité des distributions suit une loi normale, le test de Student est donc appliqué pour comparer les données. Seuls les résultats de la persistance du parasite après le lavage industriel de 4^{ème} gamme (cf. Chapitre 1. III. E. Impact du procédé de 4^{ème} gamme sur la persistance et la survie de *C. parvum* à la surface de la mâche) ne suivent pas une loi normale, ainsi le test de Wilcoxon est utilisé. Les résultats obtenus lors de l'étude de la survie des parasites récupérés de la mâche en cours de croissance et après lavage par le procédé de 4^{ème} gamme, sont des variables qualitatives. Les comparaisons statistiques ont été réalisées selon le test exact de Fisher. Une différence est considérée comme significative pour une p -value $< 0,05$. La reproductibilité (N) correspond aux réplicats indépendants de l'expérience réalisée (jours différents et/ou lots d'oocystes différents) et la répétabilité (n) correspond aux réplicats intra-essais (nombre d'échantillons réalisés au même moment). Elles sont précisées pour chaque condition testée dans la légende des figures présentant chaque résultat.

III. Résultats

A. Méthodes de purification des oocystes de *C. parvum* à partir de selles de veaux

Les différentes méthodes de purification d'oocystes ont été comparées et évaluées en termes de (i) rendement d'extraction, (ii) qualité de la suspension extraite (présence d'impuretés issues des selles), et (iii) d'impact sur la paroi de l'oocyste.

a. Rendement d'extraction

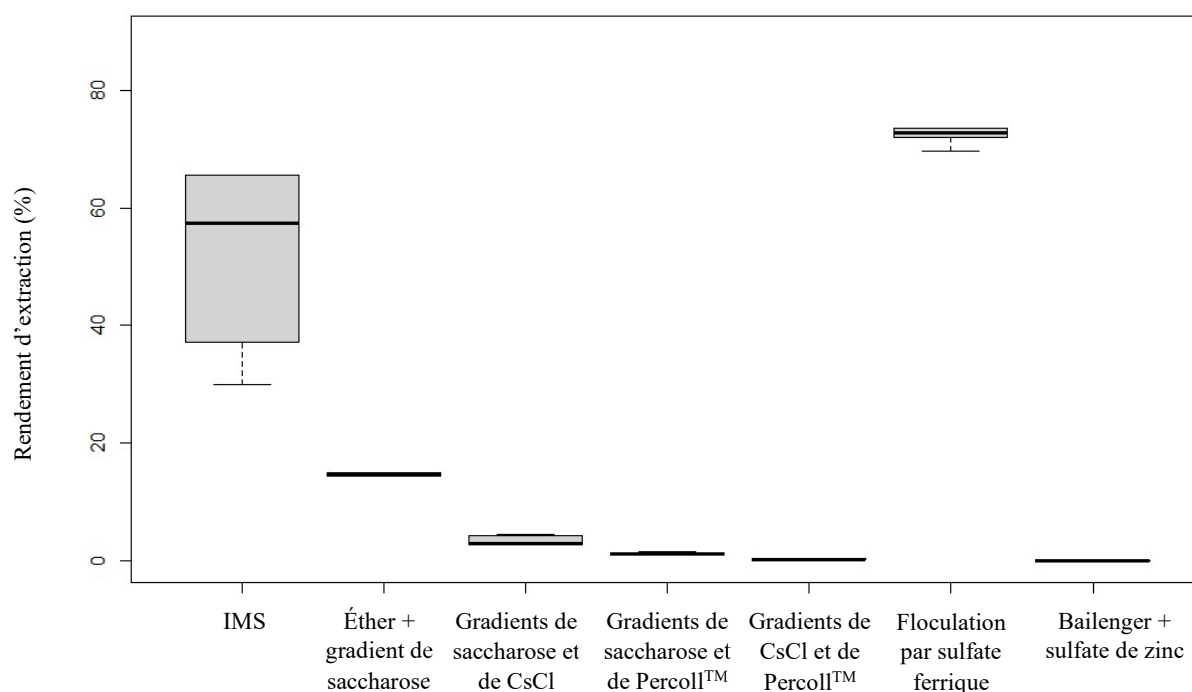


Figure 17 – Rendement d'extraction des oocystes de *C. parvum* à partir de selles de veaux par différentes méthodes.

Les oocystes purifiés par chaque méthode ont été dénombrés après immunomarquage. IMS = immuno-séparation par des billes magnétiques. CsCl = chlorure de césium. p -value $\leq 0,01$. ($N \geq 3$; $n = 2$; nombre de lots d'oocystes testés ≥ 1).

Les rendements de récupération des oocystes à partir de fèces de veau variaient de $0 \pm 0,01\%$ à $75 \pm 7,02\%$ pour les méthodes de concentration et de purification évaluées (**Figure 17**). Les méthodes IMS ($52 \pm 14\%$), l'éther suivi d'un gradient de saccharose ($14 \pm 5\%$) et la floculation par le sulfate ferrique ($75 \pm 7\%$) ont donné des pourcentages d'extraction significativement plus élevés (p -value $\leq 0,01$).

b. Qualité de la suspension parasitaire obtenue

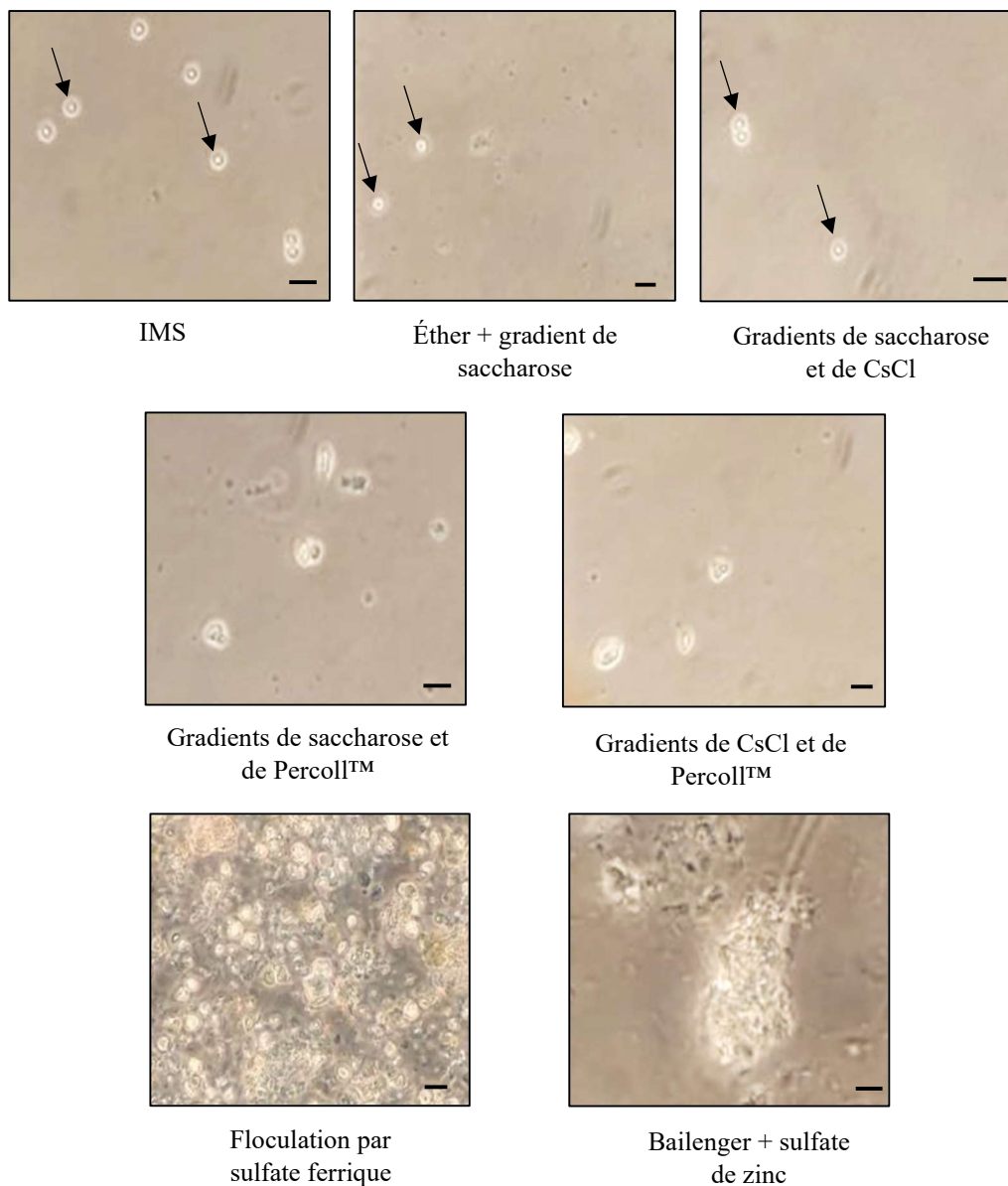


Figure 18 – Qualité de la suspension parasitaire obtenue après purification des oocystes.

La présence d'impuretés dans la suspension parasitaire purifiée par différentes méthodes est appréciée par observation en microscopie optique. Les oocystes sont mis en évidence par des flèches. IMS = immuno-séparation par des billes magnétiques. CsCl = chlorure de césium. Échelle = 10µm. N=3, n=2, nombre de lots d'oocystes testés =1.

Seules trois méthodes garantissent une suspension parasitaire purifiée avec un minimum d'impuretés (**Figure 18**) : i) l'IMS et ii) l'éther suivi d'un gradient de saccharose, qui permettent également d'obtenir des rendements intéressants ; et iii) l'utilisation successive de gradients de saccharose et de CsCl qui est, en revanche, peu efficace en termes de rendement. Ainsi, ces trois techniques ont été retenues afin d'évaluer leur impact sur la perméabilité de la paroi des oocystes.

c. Perméabilité de la paroi des oocystes purifiés

Tableau 8 – Pourcentage d’oocystes marqués à l’iodure de propidium après purification.

	IMS		Éther + gradient de saccharose		Gradients de saccharose et de CsCl	
	Natifs	Congelés/décongelés	Natifs	Congelés/décongelés	Natifs	Congelés/décongelés
IP⁺ (%)	12,5	90,3	10,2	92,2	2,7	95,7

Les oocystes purifiés ont été directement marqués à l’iodure de propidium (IP) (= oocystes natifs) ou soumis préalablement à un traitement de congélation/décongélation. La congélation/décongélation est un contrôle positif de la perméabilisation de la paroi de l’oocyste validée par incorporation de l’IP. IMS = immuno-séparation par des billes magnétiques. CsCl = chlorure de césium. N=1, n=2, nombre de lots d’oocystes testé=1.

Les expériences d’incorporation de l’IP ont été réalisées uniquement en duplicat, ainsi la comparaison statistique des résultats obtenus n’a pas pu être effectuée. A priori, les différentes méthodes de purification n’auraient pas d’impact sur la perméabilité de la paroi des oocystes (Tableau 8).

L’ensemble des données présentées ci-dessus des différentes méthodes de purification des oocystes de *C. parvum* à partir de selles de veaux montrent que l’IMS offre le meilleur rendement d’extraction, une purification de qualité de la suspension extraite et elle a peu d’impact sur la perméabilité de la paroi des oocystes. Cette technique a été choisie comme méthode pour la récupération des oocystes tout au long de cette étude.

B. Méthode d’extraction des oocystes de *C. parvum* à partir de la mâche

La norme ISO 18744 : 2016 « Recherche et dénombrement de *Cryptosporidium* et *Giardia* dans les légumes verts frais à feuilles et les fruits à baies » a été optimisée et adaptée à la matrice mâche.

a. Optimisation du tampon d'élution

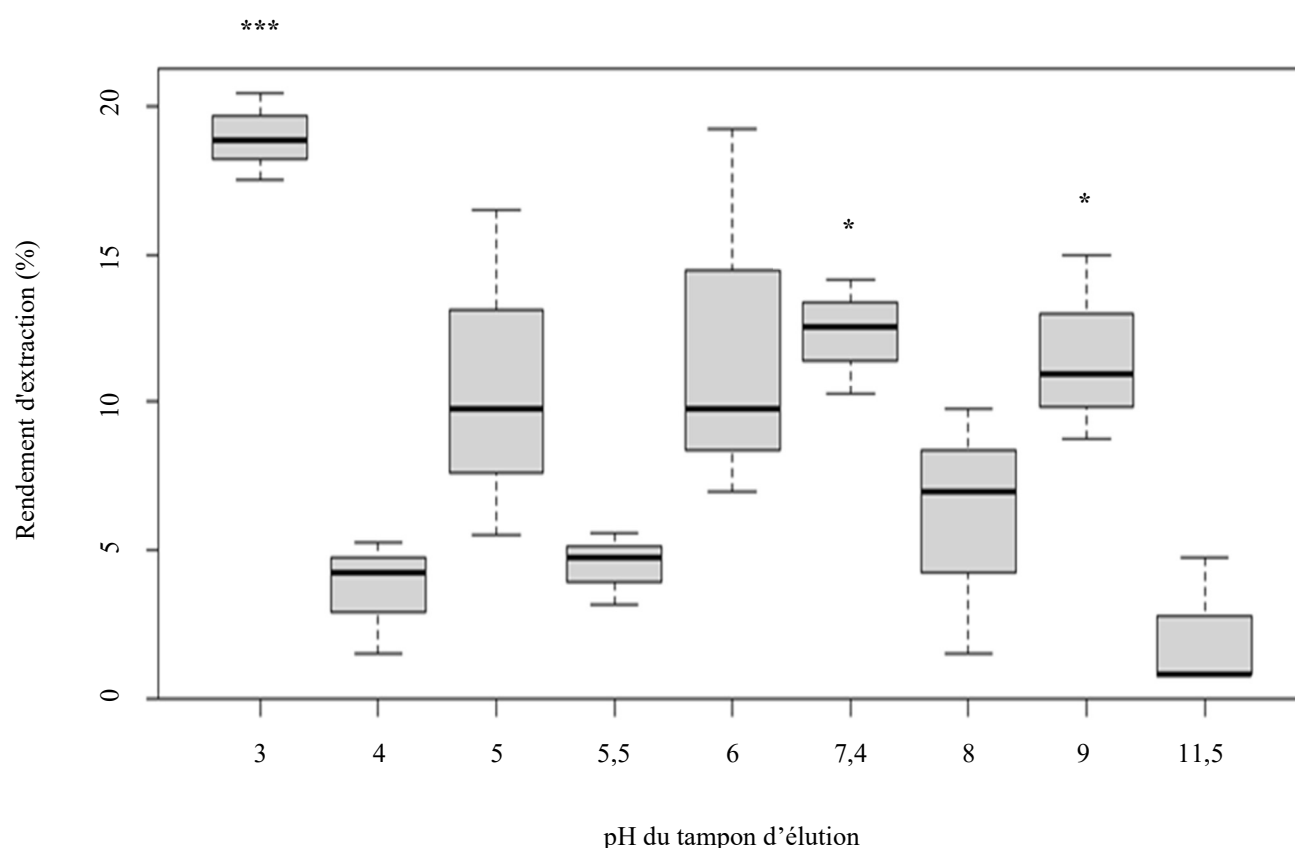


Figure 19 – Rendement d'extraction des oocystes récupérés de la mâche en fonction du pH du tampon d'élution.

Les pH testés vont de 3 à 11,5. Les oocystes purifiés ont été dénombrés après immunomarquage. Les comparaisons statistiques sont réalisées par rapport au pH recommandé par la norme (pH=5,5). *p*-value : *** < 0,001 ; * < 0,05. *N* = 1 ; *n* = 3 ; nombre de lots d'oocystes testés = 2.

L'impact du pH du tampon glycine 1M sur l'élution des oocystes à partir de feuilles de mâche a été évalué en appliquant le protocole de l'ISO 18744 : 2016 modifié selon Razakandrainibe *et al.* (2020), et Utaaker *et al.* (2015) (**Figure 19**). Les rendements d'extraction obtenus varient entre $2 \pm 2\%$ et $19 \pm 2\%$ avec l'utilisation d'un tampon d'élution à un pH de 11,5 et 3, respectivement. Bien que le pH=5,5 soit recommandé par la norme, l'utilisation du tampon pH=3 offre un meilleur taux de récupération (*p*-value < 0,001). Des modifications supplémentaires ont été apportées afin d'optimiser ce rendement d'extraction étant encore relativement faible.

b. Optimisation du protocole d'extraction des oocystes à partir de la mâche

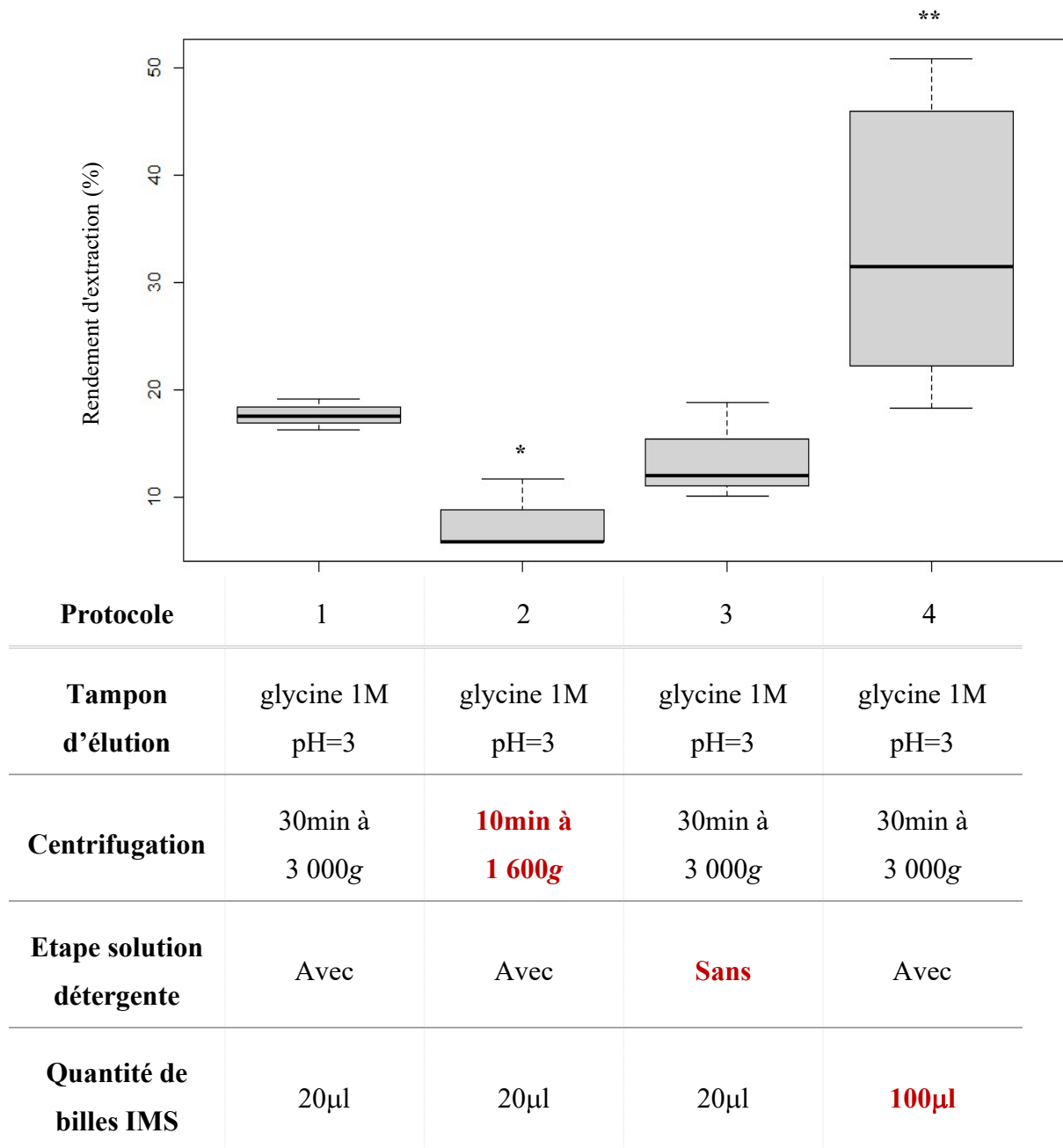


Figure 20 – Rendement d'extraction des oocystes récupérés de la mâche selon le protocole utilisé.

*Les modifications de la méthode de récupération des oocystes réalisées sont présentées dans le tableau ci-dessus. Les oocystes purifiés ont été dénombrés après immunomarquage. Les comparaisons statistiques sont réalisées par rapport à la première condition. p-value : ** ≤ 0,01 ; * ≤ 0,05. N ≥ 1 ; n = 3 ; nombre de lots d'oocystes testés = 2.*

Les modifications supplémentaires (en plus du pH du tampon) dans le protocole de l'ISO 18744 : 2016 modifié portaient sur (i) la diminution de la vitesse et du temps de centrifugation (10min à 1 600g au lieu de 30min à 3 000g), et (ii) la suppression de l'étape

incluant une solution détergente, ne permettent pas d'améliorer le rendement d'extraction avec la récupération de $8 \pm 3\%$ (p -value $< 0,05$) et $14 \pm 5\%$ (p -value $= 0,27$) des oocystes initialement déposés, respectivement (**Figure 20**). En revanche, l'utilisation de 100µl de billes telle que recommandée par le fournisseur au lieu de 20µl (Utaaker *et al.*, 2015) lors de l'IMS permet d'atteindre un rendement de $33 \pm 13\%$ (p -value $< 0,01$) des oocystes initialement déposés.

Offrant un meilleur rendement d'extraction, le protocole retenu pour réaliser la récupération des oocystes de la mâche est le suivant : (i) une élution par tampon glycine 1M à pH=3, (ii) des centrifugations à 3 000g pendant 30min, (iii) une remise en suspension et regroupement des culots dans une solution détergente et, (iv) une IMS effectuée avec 100µl de billes.

C. Développement d'une méthode *in vitro* pour l'évaluation de l'infectiosité de *C. parvum*

Les techniques conventionnelles d'identification des oocystes de *Cryptosporidium* ne permettent pas de savoir si les oocystes sont infectieux ou non et ne peuvent donc pas évaluer correctement le risque pour la santé humaine. Une méthode *in vitro* d'évaluation de l'infectiosité des oocystes de *C. parvum* récupérés de la mâche a été développée et adaptée à cette matrice végétale.

a. Rendement de dékystement des oocystes

Sur la base des données de la littérature, le dékystement des oocystes induit par l'acide taurocholique (Pecková *et al.*, 2016) pendant 1h à +37°C a été réalisé. L'impact d'un pré-traitement (5 ou 10 min) à l'eau de javel sur la capacité des oocystes à dékyster a également été évalué après incubation des oocystes prétraités pendant 1h à +37°C. L'efficacité de dékystement *in vitro* a été déterminée par comparaison avec un témoin d'oocystes n'ayant subi aucun traitement et incubés 1h à +37°C (**Tableau 9**).

Tableau 9 – Pourcentage de sporozoïtes libérés dans différentes conditions.

	Moyenne	Écart type	<i>p</i> -value
Sans traitement	15,5	5,9	1
Eau de javel (5min)	58,4	8,1	< 0,05
Eau de javel (10min)	50,3	6,3	< 0,05
Acide taurocholique	85,5	8,5	< 0,01
Eau de javel (5min) + acide taurocholique	89,9	15,5	< 0,05
Eau de javel (10min) + acide taurocholique	97,8	12,8	< 0,001

Les sporozoïtes libérés sont dénombrés par microscopie optique (grossissement x400) après 1h d'incubation à +37°C dans différentes conditions, après pré-traitement à l'eau de javel (5 ou 10min) ou non. N = 3 ; n = 2 ; nombre de lots d'oocyste testé ≥ 1.

Les résultats démontrent que l'acide taurocholique augmente le dékystement des oocystes par rapport à ceux qui n'ont subi aucun traitement ($85,5 \pm 8,5$ % vs. $15,5 \pm 15,9$ % de sporozoïtes libérés, p -value < 0,001 ; **Tableau 9**). Des pré-traitements de 5 ou 10min à l'eau de javel favorisent le dékystement spontané par rapport à des oocystes non traités, avec respectivement $58,4 \pm 8,1$ % et $50,3 \pm 6,3$ % de sporozoïtes libérés (p -value < 0,05 ; 5 vs. 10min à l'eau de javel : p -value = 0,2). L'ajout d'acide taurocholique après les pré-traitements à l'eau de javel (5 et 10min) augmente significativement le pourcentage de sporozoïtes libérés par rapport aux traitements à l'eau de javel seuls ($89,9 \pm 15,5$ % et $97,8 \pm 12,8$ %, respectivement ; p -value < 0,05). En revanche, l'utilisation de la combinaison des deux traitements (5 ou 10min à l'eau de javel puis ajout d'acide taurocholique) ne montre pas de différence significative par rapport au traitement à l'acide taurocholique seul ($89,9 \pm 15,5$ % et $97,8 \pm 12,8$ %, respectivement vs. $85,5 \pm 8,5$ % ; p -value = 0,3). Une cinétique de dékystement a ensuite été effectuée pendant 120min à +37°C afin de caractériser le temps optimal afin d'obtenir un maximum de sporozoïtes libérés dans les différentes conditions testées (**Figure 21**).

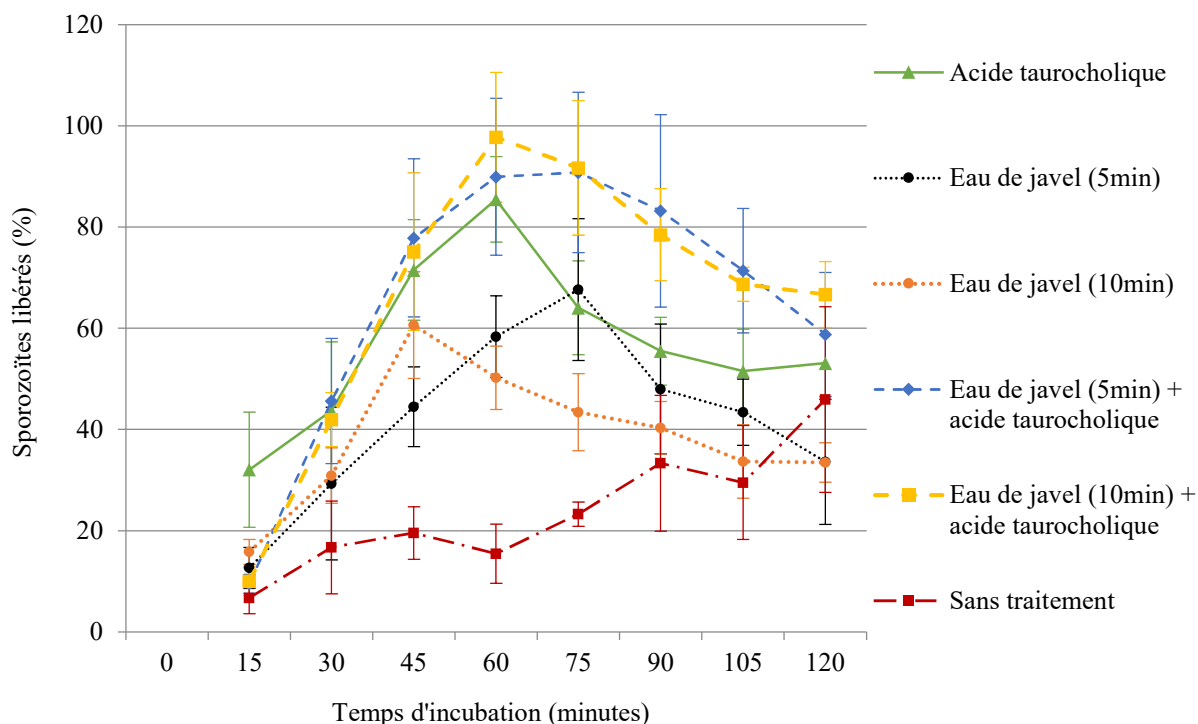


Figure 21 – Cinétique de dékystement des oocystes dans différentes conditions.

Les sporozoïtes libérés ont été dénombrés par microscopie optique (grossissement x400). Les oocystes non dékystés ont subi un pré-traitement à l'eau de javel (5min : ronds noirs ; 10min : ronds oranges) ou non (carrés rouges). Pour d'autres oocystes, le dékystement a été induit par ajout d'acide taurocholique (triangles verts) sans pré-traitement à l'eau de javel, ou après pré-traitement à l'eau de javel 5min (losanges bleus) et 10min (carrés jaunes). $N = 3$; $n = 2$; nombre de lots d'oocystes testés ≥ 1).

En accord avec la littérature, le dékystement par l'acide taurocholique, avec ou sans pré-traitement à l'eau de javel, atteint un pic après 60min d'incubation ($> 85,5\%$), puis le pourcentage de sporozoïtes libérés diminue ($< 68\%$). Les oocystes prétraités à l'eau de javel pendant 5 et 10min atteignent un pic de dékystement à 75min ($67,7 \pm 14\%$) et 45min ($60,6 \pm 10,5\%$), respectivement. Puis, une diminution du nombre de sporozoïtes libérés est observée pour atteindre les 33% après 120min d'incubation ($33,6 \pm 12,4\%$ et $33,5 \pm 3,9\%$ pour l'eau de javel 5 et 10min, respectivement). Pour les oocystes n'ayant subi aucun traitement, le pourcentage de sporozoïtes libérés augmente au cours du temps jusqu'à atteindre $45,9 \pm 18,4\%$ après 120min d'incubation.

Bien que les pourcentages de sporozoïtes libérés soient globalement plus faibles, les oocystes sont capables de dékyster spontanément dans le temps à $+37^\circ\text{C}$. Le pré-traitement à l'eau de javel semble accélérer la libération spontanée de sporozoïtes. Le dékystement induit par l'acide taurocholique pendant 1h à $+37^\circ\text{C}$, avec ou sans pré-traitement, apparaît comme le plus efficace.

b. Cinétique d'infection des cellules HCT-8 par inoculation d'oocystes dékystés ou non

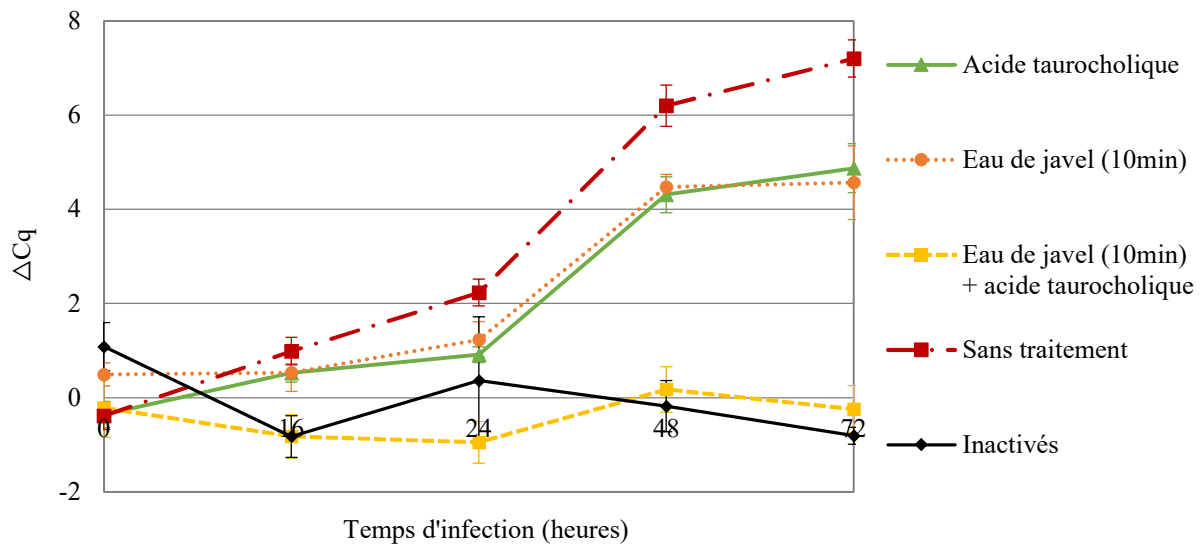


Figure 22 – Cinétiques d'infection des cellules HCT-8 par inoculation d'oocystes dékystés ou non.

Avant infection des cellules, les oocystes ont été préalablement dékystés par une incubation à +37°C pendant 1h avec de l'acide taurocholique après un pré-traitement à l'eau de javel pendant 10min (carrés jaunes) ou non (triangles verts). Les oocystes non dékystés ont été déposés directement sur les cellules HCT-8 après un pré-traitement à l'eau de javel (10min, ronds oranges) ou non (carrés rouges). Des oocystes inactivés par la chaleur (15min à +95°C) et non dékystés ont été déposés sur des tapis cellulaires (losanges noirs). La prolifération parasitaire a été évaluée par CC-qPCR et calcul du ΔCq pour chaque condition et à différents temps d'incubation. $\Delta Cq = Cq_{HCT-8} - Cq_{+HCT-8}$. $N = 1$; $n = 3$; nombre de lots d'oocystes testés = 1).

La capacité de ces sporozoïtes libérés à infecter les cellules HCT-8 et à s'y multiplier, a ensuite été évaluée pendant 72h par CC-qPCR (**Figure 22**). Quels que soient les conditions testées ou le temps d'infection, les valeurs de Cq dans les puits sans cellules (Cq_{HCT-8}) sont stables (moyenne : $29,96 \pm 0,51$; p -value = 0,305). Dans ces conditions, la différence entre les Cq sans cellules et avec cellules, le ΔCq ($Cq_{HCT-8} - Cq_{+HCT-8}$), donne une information sur le niveau de prolifération parasitaire : plus le ΔCq sera élevé dans une condition particulière ou à un temps donné, plus la prolifération parasitaire pourra être supposée forte. Les valeurs de ΔCq peuvent donc être comparées les unes aux autres dans les différentes conditions et aux différents temps d'infection. L'analyse des résultats montre une multiplication significative du parasite à partir de 48h d'infection après inoculation d'oocystes dékystés à l'acide taurocholique ($\Delta Cq = 4,31 \pm 0,18$ vs. T_0 : $\Delta Cq = -0,36 \pm 0,28$; p -value < 0,001). Un résultat équivalent est obtenu après 48h lors d'inoculation des oocystes non dékystés mais prétraités à l'eau de javel ($\Delta Cq = 4,48 \pm 0,27$ vs. T_0 : $\Delta Cq = 0,54 \pm 0,37$; p -value < 0,001). De manière surprenante, une prolifération significativement plus forte a été observée lors d'inoculation des oocystes ni

dékystés, ni prétraités, au même temps d'infection ($\Delta Cq = 6,2 \pm 0,44$ vs. T_0 : $\Delta Cq = 0,39 \pm 0,29$; p -value $< 0,001$; vs. traitement à l'acide taurocholique à T_{48h} : p -value $< 0,001$; vs. pré-traitement à l'eau de javel à T_{48h} : p -value $< 0,001$). Au-delà de 48h, la prolifération semble ralentir dans ces trois conditions. En revanche, au même titre que les oocystes inactivés par la chaleur (à $+95^\circ C$ pendant 15min), les parasites prétraités à l'eau de javel puis dékystés à l'acide taurocholique semblent avoir perdu leur capacité à proliférer (T_{48h} inactivés $\Delta Cq = -0,18 \pm 0,54$ vs. eau de javel + acide taurocholique : $\Delta Cq = 0,18 \pm 0,48$; p -value = 0,74). Indépendamment du temps d'infection, la valeur moyenne du ΔCq des oocystes inactivés est de $-0,07 \pm 1,00$ et reflète la perte d'infectiosité du parasite. Cet écart-type de 1 obtenu a permis de fixer le seuil limite de validation de la présence de parasites infectieux ($\Delta Cq \geq 1$).

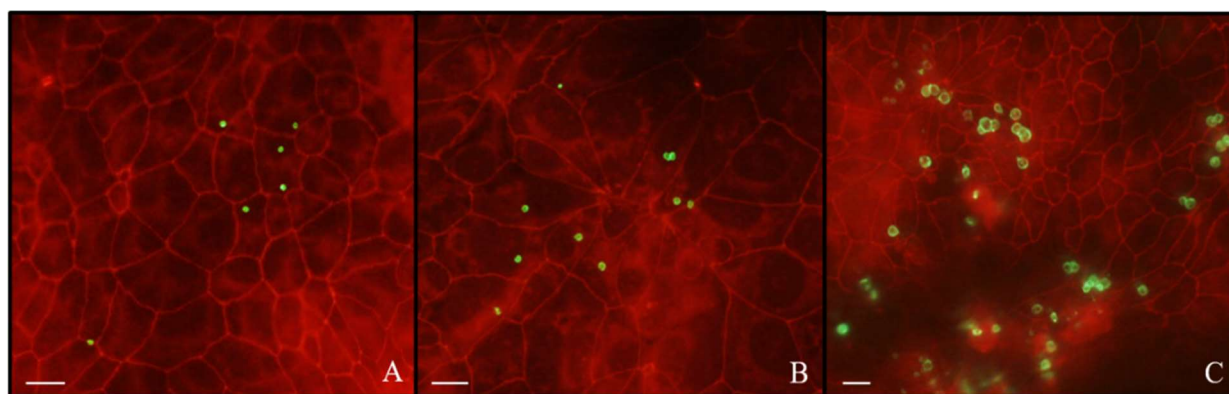


Figure 23 – Cinétique d'infection des cellules HCT-8 par *C. parvum* observée par microscopie à fluorescence.

Après 4 (A), 24 (B) et 48 (C) heures d'infection, la prolifération parasitaire a été observée par microscopie à fluorescence. *C. parvum* est marqué en vert (Crypto-Cel & lectine *Vicia villosa* – FITC). Les cellules HCT-8 sont représentées en rouge, par un marquage des jonctions serrées (*Zona Occludens-1*). Échelle = $10\mu m$. $n = 3$.

Une cinétique d'infection des cellules HCT-8 réalisée par inoculation des oocystes non prétraités et non dékystés a été observée et validée par microscopie à fluorescence (**Figure 23**).

L'ensemble de ces résultats suggère que malgré une libération plus efficace et plus précoce des sporozoïtes par induction à l'acide taurocholique ou par un pré-traitement à l'eau de javel, la multiplication parasitaire sur la monocouche de cellules HCT-8 n'apparaît pas plus importante par rapport aux oocystes ni dékystés, ni prétraités. Par conséquent, pour évaluer la survie de *C. parvum* dans les matrices alimentaires, la méthode la plus simple comprenant un nombre d'étapes minimal et permettant de mettre en évidence une forte multiplication parasitaire, consiste à récupérer les oocystes de la

mâche, à les inoculer directement sur tapis cellulaire, puis à les laisser dékyster seuls et spontanément pendant 48h de culture avant de réaliser l'extraction d'ADN suivie de la qPCR. La CC-qPCR développée permet de mettre en évidence la présence de parasites infectieux à condition d'obtenir un $\Delta Cq \geq 1$.

c. Limite de détection de la méthode CC-qPCR

La limite de détection de la méthode CC-qPCR a été évaluée. Une gamme d'oocystes purifiés (1 à 10^4 oocystes) a directement été déposée dans des puits de culture avec et sans cellules HCT-8 (**Tableau 10 & Figure 24**). Une autre gamme a été inoculée sur 30g de mâche/point de gamme, récupérée selon la méthode ISO modifiée (telle que présentée précédemment) puis déposée en culture cellulaire (**Tableau 11 & Figure 25**).

Tableau 10 – Résultats de la CC-qPCR basée sur l'infection de cellules HCT-8 inoculées avec des oocystes purifiés non dékystés.

Quantité d'oocystes inoculés		10 000	1 000	100	50	25	10	5	1
Lots d'oocystes		2	4	4	3	3	4	3	3
Réplicats en culture cellulaire		9	15	15	12	12	15	12	12
Réplicats en qPCR		2	2	2	2	2	2	2	2
Nombre de puits positifs	Avec cellules	18/18	30/30	30/30	22/24	22/24	23/30	5/24	8/30
	Sans cellules	18/18	29/30	14/30	6/24	7/24	3/30	3/24	2/30
Cq avec cellules		25,55	29,03	31,90	33,16	33,63	34,92	35,18	34,35
ET avec cellules		1,09	1,72	1,57	1,55	1,34	1,58	1,37	0,78
Cq sans cellules		30,47	34,54	36,21	36,28	36,24	37,68	36,69	35,63
ET sans cellules		0,82	1,36	0,73	0,57	0,98	1,24	0,28	0,00

Une gamme d'oocystes de C. parvum purifiés non dékystés a été déposée dans des puits avec et sans cellules. Après 48h d'infection, une qPCR a été effectuée pour chaque point de gamme. Les cases grisées représentent les valeurs de Cq obtenues en présence de cellules HCT-8. ET = écart type.

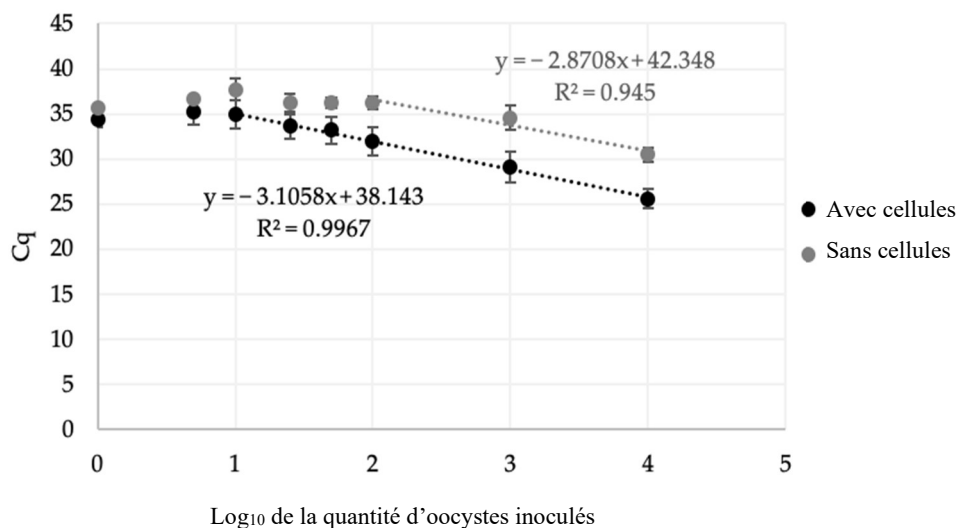


Figure 24 – Courbes standards des résultats obtenus par CC-qPCR basée sur l’infection de cellules HCT-8 inoculées avec des oocystes purifiés non dékystés.

Une gamme d’oocystes purifiés non dékystés (1 à 10⁴ oocystes) a été déposée dans des puits avec (en noir) et sans cellules (en gris). Après 48h d’infection, une qPCR a été effectuée pour chaque point de gamme. Les valeurs moyennes de Cq sont représentées en fonction du log₁₀ du nombre d’oocystes initialement déposés/puits. Les écart-types, les équations de droite et les coefficients de linéarité (R²) sont indiqués.

Tableau 11 – Résultats de la CC-qPCR basée sur l’infection de cellules HCT-8 inoculées avec des oocystes récupérés de la mâche et non dékystés.

Quantité d’oocystes inoculés / 30g de mâche		10 000	1 000	100	10	1
Lots d’oocystes		2	2	2	2	2
Réplicats en culture cellulaire		6	6	6	6	6
Réplicats en qPCR		2	2	2	2	2
Nombre de puit positif	Avec cellules	18/18	12/12	18/18	8/12	3/12
	Sans cellules	18/18	12/12	9/18	0/12	0/12
Cq avec cellules		25,79	29,16	31,91	34,18	35,40
ET avec cellules		2,38	1,74	2,52	1,58	0,87
Cq sans cellules		30,82	33,94	34,86	N/A	N/A
ET sans cellules		1,40	1,26	1,77	N/A	N/A

Une gamme d’oocystes récupérés de la mâche (30g de mâche/ point de gamme) et non dékystés a été déposée dans des puits avec et sans cellules. Après 48h d’infection, une qPCR a été effectuée pour chaque point de gamme. Les cases grisées représentent les valeurs de Cq obtenues en présence de cellules HCT-8. ET = écart type.

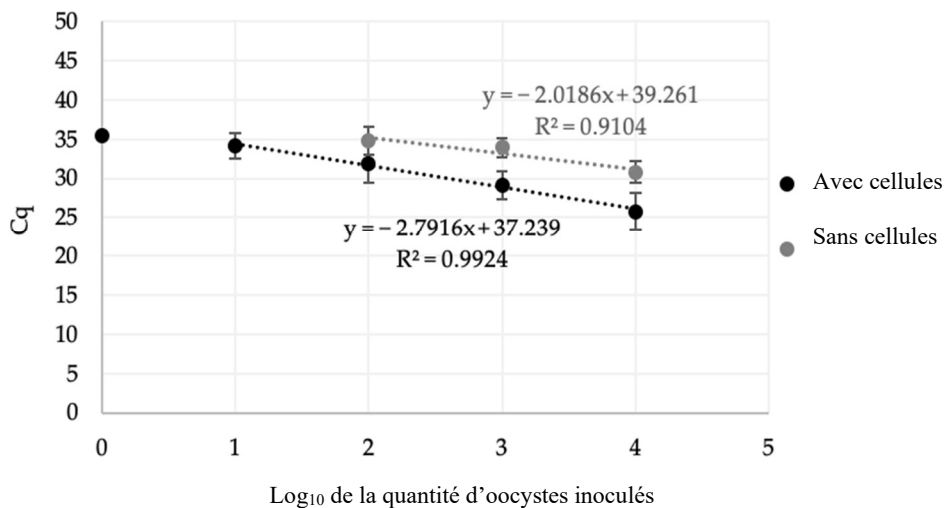


Figure 25 – Courbes standards des résultats obtenus par CC-qPCR basée sur l'infection de cellules HCT-8 par inoculation d'oocystes récupérés de la mâche et non dékystés.

Une gamme d'oocystes récupérés de la mâche (30g/ point de gamme) et non dékystés (1 à 10⁴ oocystes) a été déposée dans des puits avec (en noir) et sans cellules (en gris). Après 48h d'infection, une qPCR a été effectuée pour chaque point de gamme. Les valeurs de Cq moyennes sont représentées en fonction du log₁₀ du nombre d'oocystes initialement inoculés/ 30g de mâche. Les écart-types, les équations de droite et les coefficients de linéarité (R²) sont indiqués.

La CC-qPCR garantit la détection de *C. parvum* avec une probabilité de 100%, lorsqu'il y a inoculation d'au moins 100 oocystes sur le tapis cellulaire HCT-8 (30/30 puits positifs en présence de cellules ; **Tableau 10**). Sans amplification de la quantité d'ADN via l'infection des cellules (Cq_{HCT-8}), la dose « 100 oocystes » n'est détectée que dans 50% des puits (14/30 puits positifs en absence de cellules ; **Tableau 10**). Des résultats similaires ont été obtenus lorsqu'il y a présence d'au moins 100 oocystes initialement sur 30g de mâche (18/18 puits positifs en présence de cellules et 9/18 en absence de cellules ; **Tableau 11**). Un oocyste, purifié ou récupéré de la mâche, peut être mis en évidence avec 27 et 25% de probabilité (8/30 puits positifs en présence de cellules, et 3/12), respectivement ; alors que cet oocyste n'est quasiment pas détecté par qPCR dans les puits sans cellules avec 2/30 et 0/12 puits positifs, respectivement. De bonnes corrélations sont observées entre la valeur de Cq obtenue et la quantité d'oocystes purifiés initialement déposée pour des doses de 10 000 à 10 (R²=0,99) et de 10 000 à 100 oocystes (R²=0,94), en présence et en absence de cellules, respectivement. Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'inoculation des oocystes récupérés de la mâche : 10 000 à 10 (R²=0,99) et de 10 000 à 100 oocystes (R²=0,91), avec et sans cellules, respectivement (**Figures 24 et 25**).

Ces résultats indiquent que la détection par CC-qPCR d'oocystes infectieux en suspension et en matrice mâche est plus sensible que la détection par qPCR de tous les

oocystes. Cette méthode peut être utilisée de manière quantitative jusqu'à 100 oocystes initiaux infectieux et elle peut mettre en évidence l'inactivation des parasites (perte d'infectiosité) si la quantité utilisée est suffisamment élevée.

D. Étude de la persistance et de la survie de *C. parvum* sur la mâche en cours de croissance

Après germination, les plants de mâche (stade 2 feuilles) ont été contaminés par une suspension d'oocystes de quantité connue (10^5). A différents temps de croissance, la persistance de *C. parvum* à la surface des plants de mâche a été appréciée par dénombrement des oocystes en microscopie à fluorescence, et la survie par la méthode CC-qPCR présentée précédemment.

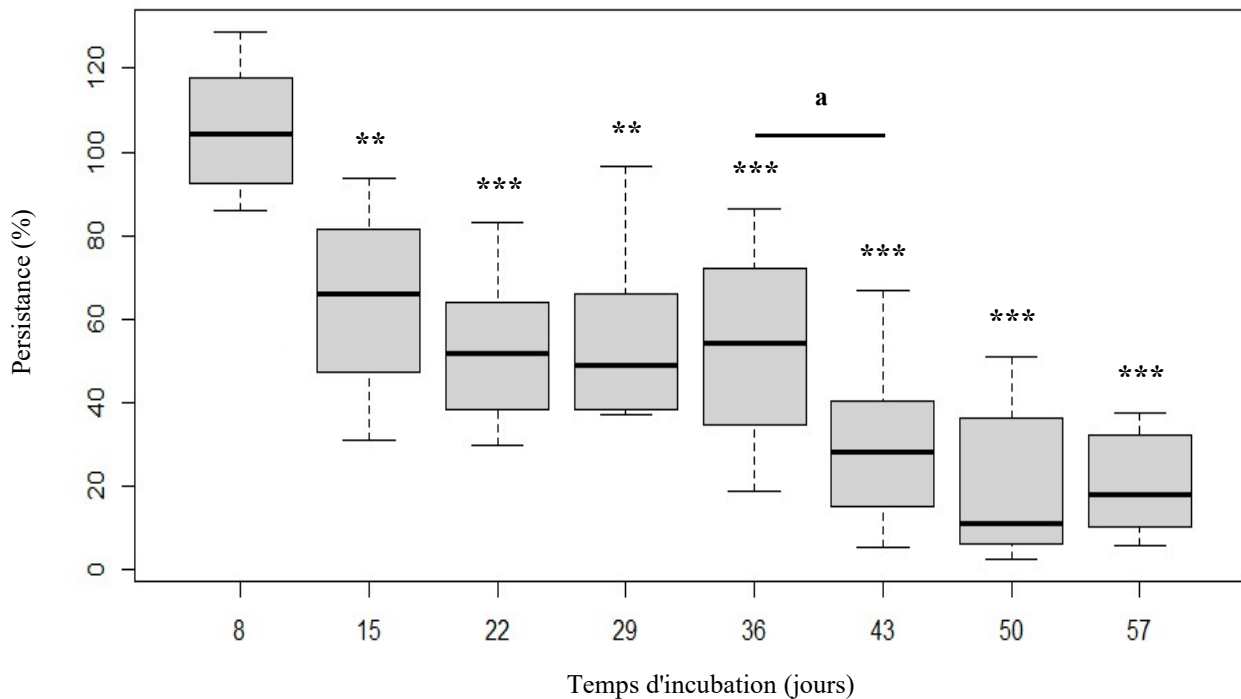


Figure 26 – Persistance de *C. parvum* à la surface de feuilles de mâche en cours de croissance.

Chaque semaine lors de la croissance de la mâche contaminée, la persistance du parasite a été évaluée par dénombrement des oocystes récupérés de la mâche après immunomarquage. Les comparaisons statistiques sont réalisées par rapport à J_8 (** et ***) et à J_{36} (a). p-value : *** $\leq 0,001$; ** $< 0,01$; a = 0,08. $N \geq 3$; $n \geq 2$; nombre de lots d'oocyste testé ≥ 2 .

Tableau 12 – Survie de *C. parvum* récupéré des feuilles de mâche en cours de croissance.

		J ₁	J ₈	J ₁₅	J ₂₂	J ₂₉	J ₃₆	J ₄₃	J ₅₀	J ₅₇
Nombre de lots		3	3	2	2	2	3	3	2	3
Reproductibilité		4	4	3	3	3	3	3	2	4
Répétabilité		≥ 3	≥ 3	≥ 3	≥ 3	≥ 3	≥ 2	≥ 2	2	≥ 2
Réplicats en culture cellulaire		≥ 1	≥ 1	≥ 1	≥ 1	≥ 1	≥ 1	≥ 1	≥ 1	≥ 1
Réplicats en qPCR		2	2	2	2	2	2	2	2	2
Présence de parasites infectieux (%)		100	100	54	13	50	30	20	0	30
<i>p</i> -value		1	0,84	<0,01	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Nombre de puits positif	Avec cellules	54/54	39/44	32/38	17/39	23/34	27/38	24/32	6/8	20/22
	Sans cellules	54/54	37/44	24/38	20/39	21/34	31/38	17/32	5/8	16/22
Cq _{+HCT-8} moyen		27,1	31,4	34,3	35,9	35,8	35,8	36,2	36,4	35,4
ET _{+HCT-8}		1,1	3,3	2,0	0,7	1,5	1,5	0,7	0,3	1,1
Cq _{-HCT-8} moyen		33,7	35,3	35,3	36,0	36,3	36,7	36,9	36,1	35,7
ET _{-HCT-8}		1,4	1,3	1,7	0,9	1,0	0,6	0,7	0,8	0,6

Chaque semaine lors de la croissance de la mâche, l'infectiosité des oocystes a été évaluée par la méthode CC-qPCR. La présence de parasites infectieux est estimée pour chaque plant analysé à chaque temps de croissance par calcul du ΔCq ($Cq_{-HCT-8} - Cq_{+HCT-8}$) ($\Delta Cq \geq 1$ = présence de parasites infectieux).

Une perte significative des oocystes inoculés au départ est observée dès 3 semaines (J₂₂) de croissance de la mâche ($53 \pm 17,9\%$; p -value < 0,01 ; **Figure 26**). Néanmoins, les résultats montrent que le parasite persiste tout au long de la croissance, avec $21,2 \pm 12,2\%$ d'oocystes encore présents après 2 mois de culture (J₅₇). En ce qui concerne la survie, les Cq_{-HCT-8} moyens ne sont pas équivalents d'une condition à l'autre, et les écart-types sont importants (Ex : Cq_{-HCT-8} moyen à J₁ = $33,7 \pm 1,4$ vs. Cq_{-HCT-8} moyen à J₈ = $35,3 \pm 1,3$). Cela suggère qu'il y a une différence dans la quantité de parasites déposés au départ pour réaliser l'infection. De plus, les Cq_{+HCT-8} moyens sont en-dessous de la limite de quantification à partir de J₂₂ ($Cq > 35$). On ne peut donc pas déterminer de manière robuste la quantité de parasites infectieux. Les valeurs de ΔCq ont été calculées pour chaque échantillon, à chaque temps d'incubation, mais ne peuvent pas être comparés d'une condition à l'autre. Elles sont uniquement qualitatives. Ainsi, les résultats sont présentés en pourcentage d'échantillons contenant des parasites infectieux pour

chaque temps d'incubation. Les parasites perdent leur capacité à infecter les cellules dès 2 semaines de croissance (J₁₅). Seuls 54% des échantillons de plants de mâche contaminés contiennent des parasites infectieux après 15 jours d'incubation ($\Delta Cq \geq 1$; $p\text{-value} < 0,01$; **Tableau 12**). Au-delà, une variation du pourcentage des échantillons de mâche contenant des parasites infectieux est observée, allant de 0 à 50% mais sans différence significative avec les résultats obtenus à 15 jours ($0,83 > p\text{-value} > 0,13$).

Ces résultats indiquent que *C. parvum* persiste lors de la croissance de la mâche, du stade 2 feuilles jusqu'à sa récolte (2 mois) et que son infectiosité diminue dès 2 semaines, sans être totalement inactivé au moment de récolte de la mâche. Ceci suggère qu'en cas de contamination de plants de mâche, il peut y avoir un danger pour le consommateur.

E. Impact du procédé de 4^{ème} gamme sur la persistance et la survie de *C. parvum* à la surface de la mâche

La persistance et la survie des oocystes à la surface de la mâche après le procédé de lavage 4^{ème} gamme ont été évaluées. Ce procédé industriel, dit de 4^{ème} gamme, propose des aliments prêts à l'emploi pour le consommateur, sans réaliser un lavage avant d'être consommé. L'eau de javel est l'un des produits biocides les plus couramment utilisés en industrie agroalimentaire. Dans le cas de la 4^{ème} gamme, ce biocide est utilisé comme auxiliaire technologique pour maintenir les eaux de procédés à un niveau de qualité microbiologique correct. L'impact du procédé de 4^{ème} gamme par lavage à l'eau chlorée (60ppm) sur la persistance du parasite à la surface de la mâche lavée a été évalué par dénombrement des oocystes en microscopie à fluorescence (**Figure 27**). L'effet de ce procédé sur la survie du parasite a été évalué par CC-qPCR (**Tableau 13**). En parallèle, un lavage à l'eau non additionnée de chlore a été réalisé afin d'évaluer l'impact des conditions de lavage seules.

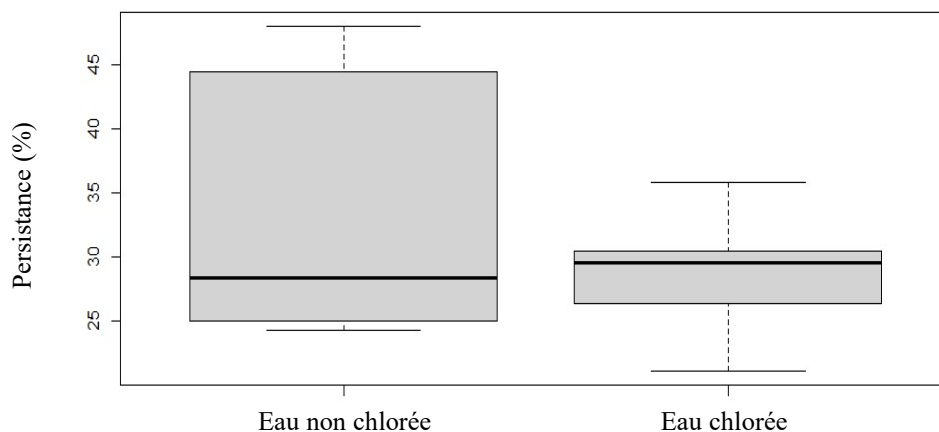


Figure 27 – Persistance de *C. parvum* sur la mèche après le procédé de lavage 4^{ème} gamme.

La mèche contaminée a été lavée dans des conditions mimant le procédé de lavage 4^{ème} gamme, avec de l'eau chlorée (60ppm) pendant 30sec. Un témoin ayant subi le même lavage avec de l'eau non chlorée a été réalisé. Un témoin sans lavage a été effectué en parallèle et a permis d'évaluer la persistance du parasite à la surface de la mèche, après dénombrement des oocystes après immunomarquage. p -value = 0,66. $N = 3$; $n = 2$; nombre de lots d'oocystes testés = 2).

Tableau 13 – Survie des oocystes de *C. parvum* récupérés de la mèche après lavage selon le procédé 4^{ème} gamme.

		Témoin : oocystes en suspension	Témoin : sans lavage	Témoin de lavage (eau non chlorée)	Procédé de 4 ^{ème} gamme (lavage en eau chlorée)
Nombre de lots		2	2	2	2
Reproductibilité		3	3	3	3
Répétabilité		≥ 2	3	3	3
Réplicat en culture cellulaire		1	1	1	1
Réplicat en qPCR		2	2	2	2
Présence de parasites infectieux (%)		100	100	100	100
p -value		1	0,62	0,62	0,62
Nombre de puits positifs	Avec cellules	14/14	17/18	18/18	18/18
	Sans cellules	14/14	18/18	18/18	18/18
Cq _{HCT-8} moyen		26,4	26,9	28,9	29,5
ET _{HCT-8}		2,2	0,8	1,1	1,1
Cq _{HCT-8} moyen		33,6	33,7	34,3	35,1
ET _{HCT-8}		2,1	1,3	1,6	1,4

L'infectiosité des oocystes a été évaluée par la méthode CC-qPCR. La présence de parasites infectieux est estimée pour chaque plant analysé pour chaque condition par calcul du ΔCq ($Cq_{HCT-8} - Cq_{+HCT-8}$) ($\Delta Cq \geq 1$ = présence de parasites infectieux).

Les résultats montrent que le lavage à lui seul permet d'éliminer une partie des oocystes présents sur la mâche mais pas totalement puisque $33,9 \pm 10,0\%$ des oocystes persistent (**Figure 27**, eau non chlorée). L'ajout de chlore dans les conditions du procédé 4^{ème} gamme pendant le lavage n'améliore pas l'élimination des oocystes avec toujours $28,7 \pm 4,4\%$ d'oocystes qui persistent (p -value = 0,66). Concernant la survie (**Tableau 13**), les Cq_{HCT-8} moyens ne sont pas stables d'une condition à l'autre, et les écarts-types sont élevés (Ex : Cq_{HCT-8} moyen de la condition témoin – oocystes en suspension = $33,6 \pm 2,1$ vs. Cq_{HCT-8} moyen du procédé de 4^{ème} gamme = $35,1 \pm 1,4$). Ainsi, pour les mêmes raisons que celles indiquées dans le paragraphe précédent, les résultats sont présentés en pourcentage d'échantillons contenant des parasites infectieux pour chaque condition testée. On observe que le procédé de lavage seul n'affecte pas l'infectiosité des parasites (témoin sans lavage vs. témoin avec lavage). L'ajout de chlore pendant le lavage dans les conditions mimant le procédé de 4^{ème} gamme ne permet pas l'inactivation des parasites puisque 100% des échantillons conservent des parasites infectieux.

Les résultats suggèrent que le lavage à l'eau chlorée utilisée en industrie 4^{ème} gamme ne permet ni d'éliminer totalement le parasite de la mâche et ni de l'inactiver. Si la mâche est contaminée au champ par *Cryptosporidium*, le parasite peut persister et survivre au cours du procédé 4^{ème} gamme et potentiellement se retrouver en fin de transformation dans les produits finis prêts à l'emploi.

IV. Discussion, conclusions et perspectives

A. Méthodes de purification de *C. parvum* à partir de selles de veaux

Il a été crucial de disposer d'une suspension d'oocystes de *C. parvum* aux caractéristiques définies et standardisées. La qualité de la suspension parasitaire utilisée est nécessaire lorsque l'on ne veut pas engendrer de biais par la présence d'autres micro-organismes et de débris. Le rendement d'extraction a été un critère de sélection non négligeable puisque pour suivre une évolution, il faut avoir suffisamment de parasites au départ. D'après l'étude de Medeman *et al.* (1998), la densité moyenne des oocystes serait de 1 045,4 kg/m³. Cela pourrait expliquer que le rendement de récupération des oocystes par gradient de CsCl soit faible. En effet, la récupération des oocystes à l'interface des solutions de CsCl ayant une densité de 1,1 et de 1,05 n'est pas optimale et pas adaptée à la purification de *Cryptosporidium* (Kuczynska & Shelton, 1999). Les oocystes se trouveraient plutôt à la surface de la solution de densité à 1,05. Il a fallu également comparer les différentes méthodes de purification afin de s'assurer que la méthode choisie n'ait pas d'impact particulier sur les oocystes. Couramment utilisés, le Percoll™ et l'éther sont connus pour altérer les propriétés chimiques de surface des oocystes (Brush *et al.*, 1998). Une telle modification pourrait engendrer des biais dans les résultats obtenus, notamment sur la persistance et l'adhérence du parasite sur la mâche. Les résultats de l'étude de la perméabilité de la paroi de l'oocyste après purification par les trois méthodes sélectionnées (IMS, éther suivi d'un gradient de saccharose, et gradients de saccharose et de CsCl) montraient une perméabilité équivalente dans les trois conditions. Ainsi, il serait intéressant de réaliser de la microscopie électronique afin d'observer si la structure de la paroi externe des oocystes est intacte après purification par ces différentes méthodes.

B. Méthode d'extraction de *C. parvum* à partir de la mâche

La norme ISO 18744 : 2016 « Recherche et dénombrement de *Cryptosporidium* et *Giardia* dans les légumes verts frais à feuilles et les fruits à baies » est basée sur des méthodes publiées et testées dans un essai collaboratif multicentrique dans lequel la laitue Iceberg a été utilisée comme matrice de validation. La norme est basée sur l'élution des oocystes dans un tampon glycine à pH=5,5 suivie d'une purification par IMS et d'une détection par microscopie. Cook *et al.* (2006 & 2007) ont déterminé que le pH=5,5 du tampon d'élution permet une récupération maximale des deux parasites, *Cryptosporidium* (avec 85,4 ± 14%) et *Giardia* (avec

34,9 ± 23%), à partir de laitue expérimentalement contaminée. Un pic a également été observé à un pH=3 (68,5 ± 8,1%) pour *Cryptosporidium* mais, pour *Giardia*, les rendements les plus élevés se trouvaient pour des pH allant de 5 à 6 (39,3 ± 17% à 36,9 ± 16%, respectivement ; Cook *et al.*, (2006 & 2007). Cette méthode a été utilisée pour extraire les parasites d'autres matrices alimentaires. Une importante variabilité du pourcentage d'extraction de *Cryptosporidium* a été observée, allant de 3% (à partir de laitues Sucrine) à 65% (à partir de framboises) (NF EN ISO 18744, 2016). Ainsi, bien qu'une norme existe à l'heure actuelle, des modifications sont à prévoir afin de l'optimiser et l'adapter à la matrice alimentaire étudiée. En 2015, Utaaker *et al.* ont validé sur laitue Iceberg une méthode ISO modifiée, moins coûteuse, qui impliquait une diminution de la quantité de billes utilisées lors de l'IMS et des solutions tampon alternatives. Cependant, une étude collaborative entre l'EA 7510 ESCAPE et l'unité de référence *Cryptosporidium* en Angleterre a mis en évidence que l'efficacité de récupération des oocystes par la norme ISO modifiée selon Utaaker *et al.*, était pH-dépendante. En effet, la récupération des oocystes à partir de feuilles d'épinard par cette méthode modifiée n'est pas efficace. Il est nécessaire d'utiliser un tampon basique (pH>7,2) et de modifier le réactif anti-mousse (anti-foam Y) pour obtenir des rendements corrects (≥ 36%) (Razakandrainibe *et al.*, 2020 disponible en **Annexe 2**). Étant donné qu'aucune étude ne s'est intéressée à la mâche et que l'efficacité de la méthode est matrice-dépendante, il a été indispensable de l'adapter à cette matrice végétale. L'impact du pH du tampon glycine (allant de 3 à 11) sur l'élution des oocystes à partir des feuilles de mâche contaminées a été évalué selon le protocole de Razakandrainibe *et al.* (incluant 20µl de billes d'IMS, l'anti-foam Y et l'ajout d'une étape utilisant une solution détergente). Bien que le pH=3 conduise au rendement le plus élevé (19%), il reste faible et bien en-dessous du rendement décrit par Cook *et al.* (2006) obtenu à partir de la laitue Iceberg (avec 68,5 ± 8,1%, au même pH). Des modifications supplémentaires ont donc été menées afin d'optimiser cette méthode. Entre autres, les vitesses et temps de centrifugation ont été augmentés par rapport au protocole Razakandrainibe *et al.* afin de limiter la perte de parasites (3 000g pendant 30min vs. 1 600g pendant 10min) et la quantité de billes d'IMS préconisée par le fournisseur du kit a été utilisée (100µl vs. 20µl). Ces ajustements ont permis d'augmenter le taux de récupération des oocystes à 33%. Étant donnée la fragilité des feuilles de mâche, la présence d'une plus grande quantité de débris par rapport aux feuilles de laitue, pourrait gêner la récupération des oocystes lors de l'IMS. Une augmentation de la quantité de billes permet ainsi d'augmenter le rendement de la méthode. Étant donné que le seuil d'efficacité de récupération est fixé à 20% (Utaaker *et al.*, 2015), ce rendement de 33% est considéré comme acceptable.

C. Développement d'une méthode *in vitro* pour l'évaluation de l'infectiosité de *C. parvum*

Bien que l'utilisation du modèle animal soit la méthode standard pour l'évaluation du pouvoir infectieux de *Cryptosporidium*, il pose des problèmes éthiques et est particulièrement lourd et coûteux. L'alternative *in vitro* a été retenue. La méthode de CC-qPCR consiste à infecter une culture cellulaire (HCT-8) avec *Cryptosporidium*. Si le parasite est infectieux, il pourra accomplir son cycle de développement et se multiplier au sein des cellules. Les cultures cellulaires peuvent être inoculées directement avec des oocystes purifiés, ou après leur dékystement induit par un traitement (acide taurocholique). Quelle que soit la forme initiale inoculée aux cellules, ce sont les sporozoïtes qui pourront y pénétrer et s'y multiplier. Le dékystement des oocystes préalable à l'inoculation sur le tapis cellulaire, est systématique. L'acide taurocholique, l'eau de javel et la combinaison des deux sont connus pour favoriser la libération des sporozoïtes (Pecková *et al.*, 2016 ; Gold *et al.*, 2001 ; Kar *et al.*, 2011). Les mécanismes par lesquels les sels biliaires entraînent le dékystement des oocystes ne sont pas clairs. Cependant, l'acide taurocholique permet d'activer la voie de sécrétion des protéines au niveau du pôle apical des sporozoïtes et favorise leur mobilité (Gold *et al.*, 2001). L'eau de javel, quant à elle, entraîne un amincissement et une perforation des couches externes et internes de la paroi des oocystes, ce qui pourrait favoriser la libération des sporozoïtes (Smith *et al.*, 2005). La combinaison des deux a permis d'obtenir le meilleur rendement de dékystement mais finalement les parasites présentaient une perte totale de leur infectiosité. Cela est probablement lié au fait que le pré-traitement à l'eau de javel fragilise les oocystes avant même d'entrer en contact avec l'acide taurocholique. Or, cet acide a été décrit comme toxique pour les cellules HCT-8 qui sont des cellules « non protégées » comme les sporozoïtes (Delling *et al.*, 2017). Ainsi, l'ajout de l'acide taurocholique pourrait avoir un effet léthal sur les parasites déjà affaiblis. De plus, chez *Toxoplasma gondii*, Freyre & Falcón ont décrit les sporozoïtes comme adoptant une apparence fantôme après 30min d'incubation avec cet acide, pouvant traduire de leur mortalité (Freyre & Falcón, 2004). Il est probable qu'il se passe la même chose pour les sporozoïtes de *Cryptosporidium* et que, nombre d'entre eux meurent avant même d'avoir pu infecter une cellule. Il est intéressant d'observer que finalement, les oocystes incubés à +37°C, sans pré-traitement à l'eau de javel et sans dékystement préalable, sont capables de dékyser spontanément. Des résultats similaires ont été observés chez Gold *et al.* (2001). La chaleur (+37°C) est certainement une des raisons du déclenchement de la libération des sporozoïtes. De manière surprenante, la prolifération parasitaire étant la plus forte après inoculation d'oocystes

non dékystés, la méthode de CC-qPCR proposée n'implique pas d'étape de dékystement préalable à l'inoculation du parasite sur le tapis cellulaire.

La limite de détection de la CC-qPCR a été évaluée. Les résultats montrent que la méthode peut détecter jusqu'à un oocyste infectieux, à condition que l'échantillon soit déposé en quadruplicat. Shahiduzzaman *et al.* (2009) ont également testé la limite de détection de leur méthode CC-qPCR, développée pour *Cryptosporidium*. Pour cela, ils ont réalisé une dilution en cascade de l'ADN total extrait après 48h d'infection des cellules HCT-8 par *C. parvum*. Leur limite de détection a été estimée à 25 oocystes. La différence observée des seuils de détection entre ces deux méthodes est probablement liée à une perte de parasites à différentes étapes dans le protocole de Shahiduzzaman *et al.* Leur CC-qPCR inclut i) un pré-traitement à l'eau de javel ; ii) un lavage des puits après 3h d'incubation des parasites sur le tapis cellulaire ; et iii) 3 lavages successifs après 48h d'infection et avant de réaliser l'extraction d'ADN totale. La méthode développée dans ce projet inclut un nombre d'étapes minimal qui limite cette perte potentielle de parasites. Les oocystes sont directement déposés sur le tapis cellulaire, sans traitement préalable, et l'ensemble du puit (culot et surnageant) est utilisé pour réaliser l'extraction d'ADN total. Le signal qPCR positif des puits sans cellules (quantité d'oocystes déposés au départ) permet de calculer un ΔCq traduisant de la présence de parasites infectieux s'il est supérieur ou égal à 1. Cependant, dans les conditions où on ne mesure pas de valeur de Cq sans cellules alors qu'on détecte un signal avec cellules, le ΔCq ne peut pas être calculé mais il y a pourtant bien eu prolifération parasitaire. Les résultats des puits avec et sans cellules demeurent indispensables pour déterminer si le signal qPCR observé dans les puits avec cellules est lié à un bruit de fond, à la présence d'oocystes non infectieux, ou bien à une prolifération parasitaire. Enfin, il faut toutefois noter que le signal qPCR détecté dans les puits avec cellules principalement, est variable entre les lots (écart-types entre 0,78 et 1,72 pour les oocystes purifiés, et entre 0,877 et 2,38 pour les oocystes récupérés de la mâche). Ceci est probablement lié à la capacité des oocystes à dékyster seuls provenant de différents lots. Ceci peut s'avérer être un inconvénient pour des oocystes récupérés d'échantillons environnementaux qui ont subi de nombreux stress et pour lesquels on ne peut prédire la qualité et le potentiel de dékystement spontané.

Le développement de cette méthode CC-qPCR a permis la rédaction d'un article dans une revue à comité de relecture, disponible à la fin de ce chapitre (Kubina *et al.*, 2021).

D. Étude de la persistance et de la survie de *C. parvum* sur la mâche

La transmission de *Cryptosporidium* à son hôte *via* la consommation de mâche est possible à condition que les oocystes persistent et survivent à la surface de cette matrice végétale. De nombreuses épidémies d'origine alimentaire impliquant l'ingestion de salades ont été décrites, mais très peu de données concernant la persistance et la survie du parasite sur ces matrices ne sont publiées (Ryan *et al.*, 2018). Dans ce projet de thèse, la persistance et la survie de *C. parvum* à la surface de la mâche ont été évaluées dans des conditions favorables à la croissance de la mâche (production primaire) et après le procédé industriel de 4^{ème} gamme (transformation).

Les résultats montrent que le parasite persiste tout au long de la croissance de la mâche mais perd sa capacité à proliférer dès 2 semaines. Les valeurs de Cq_{+HCT-8} obtenues après 15 jours de croissance (Cq > 35) montrent que la limite de détection de la méthode CC-qPCR est atteinte. Ainsi, il serait intéressant d'inoculer une quantité initiale d'oocystes plus importante, afin de s'assurer que les parasites récupérés ne soient effectivement plus infectieux, et pas, parce qu'on a atteint la limite de détection. Une cinétique d'inoculation inversée peut également être envisagée. Il s'agirait d'inoculer des oocystes sur des plants de mâche 1 semaine, 2 semaines, 3 semaines (etc...) avant récolte, puis d'évaluer l'infectiosité du parasite. Ces données permettraient de définir, dans ces conditions de croissance, s'il y a un risque pour le consommateur et précisément sur quelle période avant récolte. Une condition témoin a été réalisée en parallèle, il s'agit d'une suspension de *C. parvum* dans du PBS conservée dans les mêmes conditions que la culture de la mâche. Les résultats obtenus dans cette condition témoin (présentés en **Annexe 3**), montre que la suspension parasitaire reste infectieuse dans 100% des cas, même après 2 mois d'incubation. Ces résultats indiquent que la perte d'infectiosité est liée à la matrice mâche et/ou aux conditions rencontrées par l'oocyste lors de son contact avec la mâche. L'inoculation du parasite à la surface des feuilles est réalisée par dépôt d'une goutte de 5 x 1µl qui finit par s'évaporer après une à deux semaines, malgré un taux d'humidité assez élevé (95 ± 5,51%) avec un arrosage par les racines. Considérant que *Cryptosporidium* ne supporte pas la dessiccation (Dawson, 2005), la perte d'infectiosité observée après 15 jours pourrait ainsi être corrélée avec le séchage de la goutte. Une expérience complémentaire a été réalisée afin de tester cette hypothèse (présentée en **Annexe 4**) et a permis de démontrer qu'après 12h d'incubation à température ambiante et évaporation de la goutte déposée sur la feuille de mâche, les oocystes récupérés de la mâche perdent en effet totalement leur infectiosité, comparée à la condition témoin (oocystes en suspension dans du PBS). Il serait

donc intéressant de réaliser une étude similaire en effectuant un arrosage par le dessus afin de limiter les phénomènes de dessiccation. Dans ce cas, peut-être que si la surface de la mâche reste constamment mouillée, les oocystes survivront plus longtemps, et donc le risque pour le consommateur serait d'autant plus grand.

Le procédé industriel de 4^{ème} gamme utilise de l'eau de javel pour réaliser un lavage des aliments prêts à l'emploi dans une eau microbiologiquement « propre ». L'eau de javel est un agent de nettoyage et de désinfection intéressant en raison de son large spectre d'action, de sa bonne solubilité dans l'eau, de sa stabilité en solution aqueuse, de sa disponibilité et de son faible prix. Un lavage des aliments à l'eau de javel peut être réalisé à condition d'ajouter une étape de rinçage (selon l'arrêté du 19 octobre 2006, JORF). Les résultats montrent que le lavage à l'eau chlorée utilisée en industrie 4^{ème} gamme ne permet ni d'éliminer totalement le parasite de la mâche et ni de l'inactiver. Des données similaires ont été obtenues par Duhain *et al.* (2012) montrant que les parasites exposés à 100ppm d'eau de javel, récupérés de poivrons contaminés restaient viables. Ainsi, la contamination de légumes consommés crus ou peu cuits est un réel vecteur de la cryptosporidiose.

Ce premier chapitre a permis de mieux comprendre le comportement de *C. parvum* à la surface de la mâche. Le développement d'une méthode *in vitro* pour l'évaluation de l'infectiosité de *Cryptosporidium* dans les aliments a été nécessaire. Cette méthode CC-qPCR est fiable, robuste et avec un minimum d'étape afin de limiter les pertes potentielles de parasite. Présentant une faible limite de détection, elle peut être utilisée dans les études de prévalence du parasite dans les aliments, et apporter une information supplémentaire, qui est d'évaluer directement le caractère infectieux des parasites détectés. Ce qui permettrait d'évaluer au mieux l'exposition au danger *Cryptosporidium* des consommateurs dans les aliments.

La transmission de *Cryptosporidium* à l'Homme, via les produits frais, est bien réelle. Elle est probablement favorisée par sa capacité à persister et à survivre, c'est-à-dire à conserver son caractère infectieux, au cours de la production primaire et de la transformation 4^{ème} gamme. Ces données contribuent à une meilleure appréciation du risque pour le consommateur et doivent être associées à des données de prévalence dans ces matrices.

Publication dans une revue à comité de lecture

La méthode CC-qPCR développée dans ce chapitre a permis la rédaction d'un article.



Detection of Infectious *Cryptosporidium parvum* Oocysts from Lamb's Lettuce: CC-qPCR's Intake

Sophie Kubina, Damien Costa, Loïc Favennec, Gilles Gargala, Angélique Rousseau, Isabelle Villena, Stéphanie La Carbona, Romy Razakandrainibe

► To cite this version:

Sophie Kubina, Damien Costa, Loïc Favennec, Gilles Gargala, Angélique Rousseau, et al.. Detection of Infectious *Cryptosporidium parvum* Oocysts from Lamb's Lettuce: CC-qPCR's Intake. *Microorganisms*, MDPI, 2021, 9 (2), pp.215. 10.3390/microorganisms9020215 . hal-03152168

HAL Id: hal-03152168

<https://hal.univ-reims.fr/hal-03152168>

Submitted on 25 Feb 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Article

Detection of Infectious *Cryptosporidium parvum* Oocysts from Lamb's Lettuce: CC-qPCR's Intake

Sophie Kubina ^{1,2,*}, Damien Costa ^{2,3}, Loïc Favennec ^{2,3}, Gilles Gargala ^{2,3}, Angélique Rousseau ^{1,4}, Isabelle Villena ⁴, Stéphanie La Carbona ¹  and Romy Razakandrainibe ^{2,3,*}

¹ ACTALIA Food Safety Department, 310 Rue Popielujko, 50 000 Saint-Lô, France; angelique.rousseau@live.com (A.R.); s.lacarbona@actalia.eu (S.L.C.)

² Laboratoire de Parasitologie, EA 7510, Université de Rouen Normandie, 76 000 Rouen, France; damien.costa@chu-rouen.fr (D.C.); loic.favennec@univ-rouen.fr (L.F.); gilles.gargala@chu-rouen.fr (G.G.)

³ Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CNR Laboratoire expert Cryptosporidioses, Centre Hospitalier Universitaire de Rouen, 76 000 Rouen, France

⁴ Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, EA 7510, SFR CAP-Santé, Université Reims-Champagne Ardenne, Centre Hospitalier Universitaire de Reims, 51 000 Reims, France; ivillena@chu-reims.fr

* Correspondence: sophie.kubina@etu.univ-rouen.fr (S.K.); romy.razakandrainibe@univ-rouen.fr (R.R.)



Citation: Kubina, S.; Costa, D.; Favennec, L.; Gargala, G.; Rousseau, A.; Villena, I.; La Carbona, S.; Razakandrainibe, R. Detection of Infectious *Cryptosporidium parvum* Oocysts from Lamb's Lettuce: CC-qPCR's Intake. *Microorganisms* **2021**, *9*, 215. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020215>

Academic Editor: Nigel Cook

Received: 30 December 2020

Accepted: 17 January 2021

Published: 21 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Cryptosporidium* spp. is responsible for several food and waterborne disease outbreaks worldwide. Healthier lifestyles attract consumers to eat, notably, fresh food like fruits and vegetables. The consumption of raw or under-cooked food increases the risk of foodborne transmission of Cryptosporidiosis. The assessment of the consumer's exposure to *Cryptosporidium* danger is crucial for public health. Still, the standardized method to detect this parasite in fresh leafy greens and berry fruits has only been available since 2016 and suffers from weaknesses. Consequently, in this study, we propose a method with minimum processing steps that combines cell culture and the quantitative PCR (CC-qPCR) for detecting infectious *C. parvum* oocysts recovered from lamb's lettuce. This CC-qPCR is a rapid and easy method that can detect up to one oocyst, whereas it is undetectable by classic qPCR.

Keywords: *Cryptosporidium*; oocysts infectivity; detection; fresh vegetables; in vitro method

1. Introduction

During the last decade, food choices and eating habits have changed dramatically around the world and contributed to the globalization of food supplies. This trend has been implicated as a reason for the emergence or re-emergence of many foodborne parasitic diseases [1]. The consumption of raw or under-cooked foods and the growing market for more ready-to-eat fresh and healthy food, as well as novel, ethnic food products may be linked to the increased risk of foodborne transmission of zoonoses. Fruits, vegetables, and drinking water have been implicated as vehicles for many environmental stages of parasites, particularly protozoa such as *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Cyclospora* [2].

In Europe, of 279 parasitic protozoan outbreaks in humans (representing 40,289 cases) reported since 2010 to the European Food Safety Authority (EFSA) and the European Centre for Disease Prevention and Control, 58 were due to *Cryptosporidium* spp., representing 33,486 cases. Currently, *Cryptosporidium* is considered one of the most important etiological agents of food and waterborne disease [3–13]. However, the number of foodborne parasitic outbreaks is probably underestimated. Indeed, in 32% of reported outbreaks, the pathogen was not identified. Additionally, the methods for its detection are not suitable for all food matrices and were only recently published [14]. Among foodborne *Cryptosporidium* outbreaks described around the world, salad consumption was incriminated in 35% of cases [15]. Lamb's lettuce is usually included in a pre-packed mixed salad. Moreover, lamb's lettuce grows low to the ground and is entirely consumed (no leaves are thrown

out), increasing both the likelihood of surface contamination and the transmission of the infective stages of the protozoa to humans [16].

Since 2016, a gold standard exists for *Cryptosporidium* oocyst detection in food (ISO 18744:2016), but it suffers from weaknesses such as a relatively low parasite recovery rate (34%) that is variable between users [14]. Indeed, (i) the small number of organisms relative to the amount of the interfering material and (ii) the specific characteristics for each food matrix (trapping and adhesion force) may interfere with oocyst removal and elution [17,18]. Furthermore, the standard ISO method is neither able to determine the species/genotypes of the isolated oocysts nor to presume the infectivity of the oocysts [19]. Acquiring such data is crucial for assessing and identifying the risk of *Cryptosporidium* infection from consumption of contaminated food. Methods based on cell culture coupled to quantitative PCR (CC-qPCR) are interesting tools to evaluate the infectivity of *Cryptosporidium* oocysts [20]. Cell culture assays are based on the in vitro release of sporozoites from oocysts after induction of excystation [21]. Sporozoites invade epithelial cells and start their life cycle; specific detection of *C. parvum* (Tyzzer, 2012) DNA is thus possible when combining cell culture with the qPCR technique and using specific primers and probes [22,23]. Such assays have already been used to detect infectious oocysts in water and wastewater but were never applied to complex food matrices [20]. In addition to the assessment of infectivity, the in vitro proliferation of the parasite allows an increase in DNA quantities that could enhance the detection of a small number of oocysts in the sample and, consequently, improve the detection compared to other direct molecular assays.

This study aims to propose a CC-qPCR method with minimum processing steps to detect the *C. parvum* infectious oocysts recovered from lamb's lettuce. Several publications recommend oocyst excystation for improving in vitro parasitic proliferation. However, the aim is also to limit the supplementary loss of parasites during excystation treatment. Thus, on one hand, the human ileocecal adenocarcinoma cell line (HCT-8) was inoculated with purified or excysted oocysts, based on known procedures; on the other hand, the method detection limit was assessed by inoculating the cell culture directly with known concentration ranges of purified parasites, and finally with concentration ranges of recovered oocysts from lamb's lettuce.

2. Materials and Methods

2.1. *Cryptosporidium parvum* Oocysts and Purification

Cryptosporidium parvum oocysts were purchased from the National Institute of Agricultural Research (INRA), Nouzilly, France. The isolate was initially sampled from an infected child and maintained in a laboratory by serial passages on calves at the INRA, Nouzilly, France. Several batches of parasites were used in this study. Oocysts in the feces of an experimentally infected calf were concentrated and purified using a commercially available kit (Isolate for ImmunoMagnetic Separation "IMS" of *Cryptosporidium* oocysts, TCS biosciences, Botolph Claydon, UK) according to the manufacturer's protocol. Purified oocysts were enumerated in triplicate by a Kova-slide hemocytometer (Hycor, Garden Grove, CA, USA) and were stored at +4 °C in sterile phosphate-buffered saline (PBS) solution until use.

2.2. Cell Line and Routine Cell Culture

The human ileocecal adenocarcinoma HCT-8 cell line (ATCC CCL-224) was maintained in Rosewell Park Memorial Institute "RPMI"1640 medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (Eurobio, Les Ulis, France), 100 UI/mL of penicillin (Corning, Manassas, VA, USA), and 100 pg/mL of streptomycin (Corning, Manassas, VA, USA) in Falcon flasks (75 cm²) at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. HCT-8 cells were passaged every three to four days. Cells were transferred to twenty-four-well plates (Thermo Fischer Scientific, Roskilde, Denmark) and grown to 90% confluent monolayers in a 5% CO₂ humidified incubator before infection.

2.3. Infection of Cell Monolayers

HCT-8 cells were seeded at a density of 2×10^4 cells per well in 24-well flat-bottom plates. Monolayers were allowed to grow at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere and to reach 90% confluence before the infectivity assay. Excysted or not, oocysts (10^4 per well) were inoculated onto monolayers. During this study, the excystation procedure was adapted from those described elsewhere such as (i) 1.5% sodium taurocholate (NaTC; Sigma, Steinheim, Germany) solution in RPMI 1640 medium at 37 °C for 1 h [21]; (ii) 2.63% aqueous sodium hypochlorite at room temperature for 10 min [18]; and (iii) the combination of 2.63% aqueous sodium hypochlorite at room temperature for 10 min, then centrifugation at $15,000 \times g$ for 10 min, and 1.5% NaTC solution in RPMI 1640 medium at 37 °C for 1 h. After the excystation, the parasitic suspension (oocysts and sporozoites) was centrifuged at $15,000 \times g$ for 10 min and resuspended in a final volume of 1 mL in co-culture medium (RPMI 1640 medium supplemented with 45 mg/mL of glucose (Sigma), 40 µg/mL of para-aminobenzoic acid (Sigma), 40 µg/mL of 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid “HEPES” (Sigma), 0.35 mg/mL of ascorbic acid (Sigma), 1 UI/mL of insulin (Sigma), 100 UI/mL of penicillin (Panpharma, Luitré-Dompierre, France), and 100 pg/mL streptomycin (Panpharma) before inoculation onto the monolayer. Parasitic suspensions were deposited in flat-bottom 24-well plates with and without cells in a co-culture medium and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Infection was stopped at 0, 16, 24, 48, and 72 h post-inoculation. Oocysts inoculated into wells without HCT-8 cells were used as “background” controls for each time point. Experiments were done at least in triplicate. Control assays with unexcysted and heat-inactivated (95 °C for 15 min) oocysts were performed in conjunction with each series of tests.

The limit of CC-qPCR detection was determined using a dilution series of *C. parvum* parasites at concentrations of 10^4 to 10^0 (one) oocysts. Unexcysted oocysts were directly inoculated onto monolayers; the assay was stopped at 48 h post-inoculation. Experiments were performed in triplicate and repeated thrice.

2.4. DNA Extraction and Real-Time qPCR

At the end of the incubation period, each well was treated for 1 h at 56 °C with 180 µL of ATL buffer (Qiagen, Hilden, Germany) and 20 µL of proteinase K (Qiagen). DNA isolation was performed according to the instructions for the QIAamp DNA mini kit (Qiagen). Each sample was deposited in duplicate in the qPCR plate. The primers and TaqMan probe used for the real-time PCR were positioned inside a specific 452 bp *C. parvum* sequence reported by Fontaine and Guillot [24]. PCR reactions were carried out in a total volume of 25 µL containing 12.5 µL of iQ™ Supermix (Bio-Rad, Boissy-l’Aillerie, France), primers (forward, 5′-CGCTTCTCTAGCCTTTTCATGA-3′; reverse, 5′-CTTCACGTGTGTTTGCCAAT-3′) and probe (5′ FAM-CCAATCACAGAATCATCAGAATCGACTGGTATC-3′ BHQ1) at 0.4 µM and 0.1 µM (final concentrations), respectively, and 5 µL of DNA template. Assays were run on CFX96™ Thermal Cycler (Bio-Rad) using 96-well hard-shell qPCR plates (BioRad). Cycling conditions were as follows: 95 °C for 3 min, followed by 45 cycles (95 °C for 15 s, 60 °C for min). BioRad CFX Manager Software was used to analyze the amplification curves. The C_q values correspond to the quantification cycle. To evaluate parasite infectivity, the ΔC_q was calculated. The ΔC_q of a sample is obtained by subtracting the C_q of oocysts inoculated onto HCT-8-free well from the C_q of oocysts inoculated onto HCT-8 monolayer well: $\Delta C_q = (C_{q\text{sample}_{w/o\text{ cells}}} - C_{q\text{sample}_{w/\text{cells}}})$ for each incubation time. The higher the ΔC_q, the more DNA copies are observed, and thus the more parasitic proliferation there is.

2.5. Lamb’s Lettuce: *Cryptosporidium* Oocysts Spiking, Recovery, and Cell Infection

Fresh lamb’s lettuces (*Valerianella locusta*; Linnaeus, 1753) were purchased as a sealed bag [25]. For sample spiking and optimal recovery, according to Robertson and Gjerde [26], 30 g of lamb’s lettuce leaves was weighed into a homogenizer bag (Bagpage R, Interscience,

Saint-Nom-la-Bretèche, France) with a filter porosity <250 µm (Interscience), and 100 µL of spike containing 1 to 10⁴ oocysts was deposited by spotting across the leaves.

Inoculated leaves were incubated for 2–3 h at room temperature, then at 4 °C overnight. After incubation, the oocyst recovery was realized according to the ISO 18744:2016 “Microbiology of the food chain -Detection and enumeration of *Cryptosporidium* and *Giardia* in fresh leafy green vegetables and berry fruits” method with some modifications. The pH of 1 M glycine elution buffer (5.5) was adjusted to 3 for better recovery (data not shown), and for each step, samples were centrifuged at 3000× g for 30 min at 4 °C. Before oocyst purification by IMS, pellets were resuspended, and 2 mL of a detergent solution containing 1% SDS (Sigma), 0.1% Tween 80 (Sigma), and 0.001% antifoam Y (Sigma) were added as described by Razakandrainibe et al. [27]. After centrifugation, pellets were resuspended in 7 mL of PBS, and oocysts were recovered by IMS (Isolate, TCS Biosciences, Buckingham, UK). Finally, purified oocysts were directly deposited in wells with and without cells, then they were incubated as described above. After incubation, DNA was extracted as described in Section 2.4. Experiments were performed in triplicate and repeated twice.

2.6. Statistical Analysis

Experiments were performed in replicates and repeated at least twice to ensure reproducibility. Data were entered into an Excel spreadsheet (Microsoft, Redmond, WA, USA) to determine the mean and standard deviation. For further analyses, all data were transferred to R version 3.6.3 (R foundation for statistical computing; Vienna, Austria) software. Unless otherwise stated, Student’s t-test analysis was used to determine the statistical significance among the different conditions tested. A *p*-value of less than 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Parasitic Proliferation Kinetics Using Excysted and Unexcysted Oocysts Assessed by CC-qPCR

Average C_q values generated from parasites inoculated in HCT-8-free wells were consistently stable (mean: 29.96 ± 0.51; range: 29.19–30.5) with no significant difference (Kruskal-Wallis test *p* = 0.305).

As shown in Figure 1, the peak of ΔC_q was observed 48 h after infection of HCT-8 cells, and the highest ΔC_q was obtained using unexcysted oocysts (ΔC_q = 6). At 48 h post-infection, compared to unexcysted oocysts, this study illustrates a decrease of the parasite proliferation (ΔC_q = 4.5; *p* = 0.005) with the excysted oocysts (either with NaTC alone or with sodium hypochlorite alone). The combination of sodium hypochlorite and NaTC caused a loss of infectivity of the parasite. Indeed, the ΔC_q observed when using this combination was similar to that of heat-inactivated oocysts.

3.2. The Detection Limit of CC-qPCR Method Using Purified Unexcysted Oocysts

The method was evaluated by seeding a known concentration of purified oocysts (ranging from 1 to 10,000). Analytical sensitivity results are shown in Table 1. Detection of *C. parvum* DNA can be achieved with a sensitivity of 100% when inoculating at least 100 oocysts onto HCT-8 monolayers (Table 1). As low as one oocyst could be detected in 27% of inoculated cell replicates (8/30), while only 7% (2/30) of wells without cells were positive.

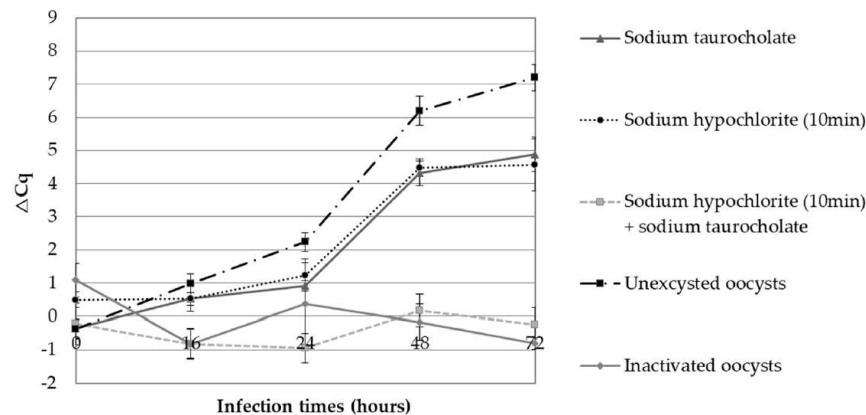


Figure 1. Parasitic proliferation kinetics established from ΔCq values. Kinetics of the human ileocecal adenocarcinoma cell line (HCT-8) cells infection by excysted oocysts or not. Oocysts excysted with 1.5% sodium taurocholate (grey triangle), with 2.63% sodium hypochlorite (black round), or with the combination of both (gray square). Unexcysted oocysts (black square) and inactivated oocysts (gray diamond). The parasitic proliferation was assessed after DNA purification and quantification of *Cryptosporidium* DNA by qPCR. A positive ΔCq ($\Delta Cq = Cq_{w/out\ cells} - Cq_{with\ cells}$) indicates that the parasites have multiplied within cells.

Table 1. Cell culture and quantitative PCR (CC-qPCR) assay results for purified *C. parvum* oocysts.

Number of Inoculated Purified Oocysts		10,000	1000	100	50	25	10	5	1
Oocysts batch		2	4	4	3	3	4	3	3
Cell culture replicates		9	15	15	12	12	15	12	12
qPCR repeats		2	2	2	2	2	2	2	2
Number of positive wells detected	with cells	18/18	30/30	30/30	22/24	22/24	23/30	5/24	8/30
	w/out cells	18/18	29/30	14/30	6/24	7/24	3/30	3/24	2/30
Cq with cells		25.55	29.03	31.90	33.16	33.63	34.92	35.18	34.35
SD with cells		1.09	1.72	1.57	1.55	1.34	1.58	1.37	0.78
Cq w/out cells		30.47	34.54	36.21	36.28	36.24	37.68	36.69	35.63
SD w/out cells		0.82	1.36	0.73	0.57	0.98	1.24	0.28	0.00

Grey cases are the results of wells with cells. SD = standard deviation.

The results show a linear detection range for *Cryptosporidium* concentration with a limit of 10 oocysts ($R^2 = 0.997$) and 100 oocysts ($R^2 = 0.945$) inoculated onto HCT-8 monolayers and HTC-8-free wells, respectively (Figure 2).

3.3. The Detection Limit of CC-qPCR Method Using Unexcysted Oocysts Recovered from Lamb's Lettuce

When recovered oocysts from spiked (ranging from 1 to 10,000) lamb's lettuce were inoculated onto monolayers, the CC-qPCR assay was as sensitive as it was for purified oocysts and enabled the detection of 100 oocysts with 100% sensitivity (Table 2). This method allowed the detection of one spiked oocyst in 25% of the HCT-8 well replicates, which were not detected in the HCT-8-free wells.

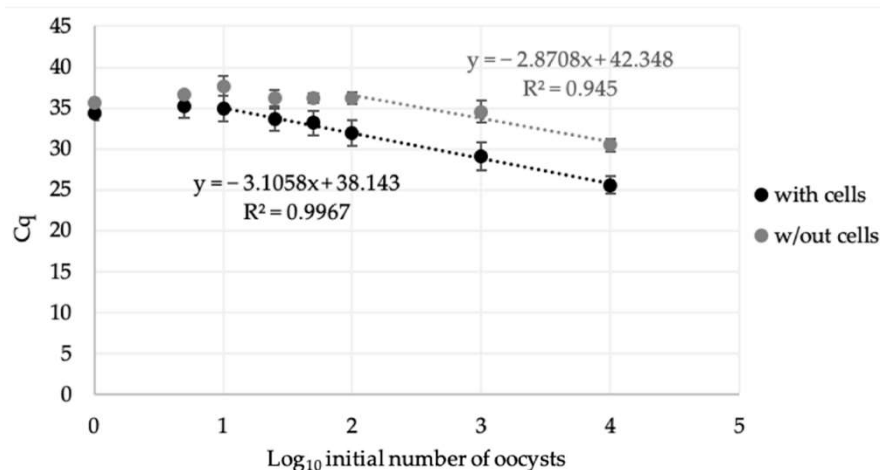


Figure 2. Standard curves of *C. parvum* DNA resulting from CC-qPCR after inoculation of purified oocysts onto wells with (black) or without (grey) HCT-8 cells.

Table 2. CC-qPCR assay results for *C. parvum* oocysts recovered from lamb's lettuce.

Number of Inoculated Oocysts Per 30 g of Lamb's Lettuce		10,000	1000	100	10	1
Oocysts batch		2	2	2	2	2
Cell culture replicates		6	6	6	6	6
qPCR repeats		2	2	2	2	2
Number of positive wells detected	with cells	18/18	12/12	18/18	8/12	3/12
	w/out cells	18/18	12/12	9/18	0/12	0/12
Cq with cells		25.79	29.16	31.91	34.18	35.40
SD with cells		2.38	1.74	2.52	1.58	0.87
Cq w/out cells		30.82	33.94	34.86	N/A	N/A
SD w/out cells		1.40	1.26	1.77	N/A	N/A

Grey cases are the results of wells with cells. N/A: not available. SD = standard deviation.

A standard curve was established, and the coefficient of determination was calculated. The curve was linear over a range of 10 to 10,000 ($R^2 = 0.992$) and 100 to 1000 ($R^2 = 0.91$) in wells with and without HCT-8 cells, respectively (Figure 3).

These results suggest that assays should be done in at least quadruplicates to detect as low as one infectious *Cryptosporidium* oocyst.

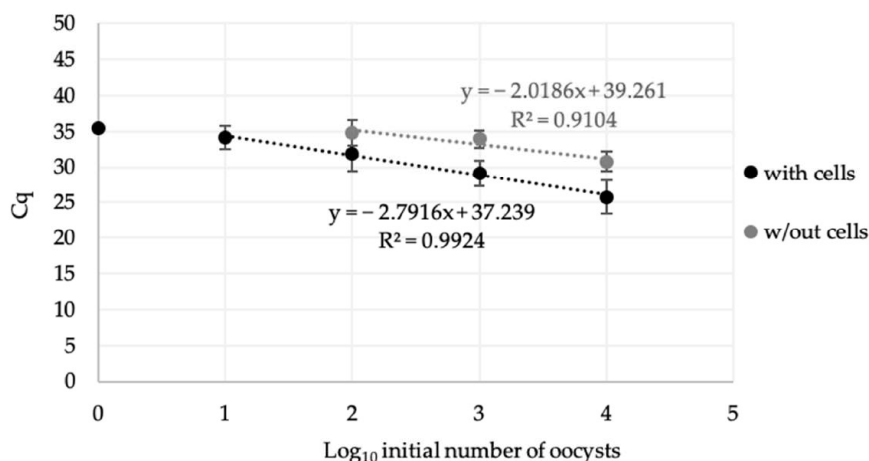


Figure 3. Standard curves of *C. parvum* DNA resulting from CC-qPCR after inoculation of oocysts recovered from lamb's lettuce onto wells with (black) or without (grey) HCT-8 cells.

4. Discussion

Cryptosporidiosis outbreaks are on the rise, and numerous foodborne and waterborne outbreaks due to *Cryptosporidium* have been reported [15,28,29]. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in a variety of food matrices, including salads, constitutes a threat to human health. Although, since 2016, a standard method is available as the gold standard for the detection and enumeration of *Cryptosporidium* and *Giardia* in/on food matrices, the recovery rate is still low for some foods (<20%) [14]. Thus, rapid and robust methods for detecting infectious parasites in food are urgently needed.

This study aims to propose a method with minimum processing steps to limit potential loss of parasites that combines cell culture and the quantitative PCR (CC-qPCR) to detect infectious *C. parvum* oocysts recovered from leafy greens such as lamb's lettuce.

This process relies on the oocysts' ability to proliferate. The parasite proliferation allows an increase in the number of parasitic DNA copies, which leads to better detection. It also provides information about *Cryptosporidium* infectivity. While mouse infectivity assays have been recognized as the reference method for establishing the ability of oocysts to cause infection, they are expensive, time-consuming, and pose ethical concerns. The combination of cell culture and qPCR techniques provides an alternative to detect infectious *Cryptosporidium* specifically and accurately [20]. Moreover, in vitro cell culture of *C. parvum* has shown equivalent results to those obtained in animals [30]. The human ileocecal adenocarcinoma cell line HCT-8 was used in this study as it was previously found to support the most *C. parvum* infection compared to other cell lines [31,32], has been shown to have a better correlation with the neonate BALB/c and CD-1 mouse models [30,33], and is commonly used for *Cryptosporidium* infectivity assays [22,34,35].

Publications described the association of excystation and cell culture for improving in vitro infection [30,32,36–38]; however, to reduce the supplementary loss of parasites, we compared the use of excysted and unexcysted oocysts for infecting monolayers. Sodium hypochlorite and sodium taurocholate are the two compounds that are most frequently used in the literature. In this study, sodium hypochlorite (2.63%) and sodium taurocholate (1.5%) solutions were used alone or in combination. Although these procedures increase the excystation of oocysts (data not shown), our results show reduced parasite proliferation compared to unexcysted oocyst inoculation onto HCT-8 monolayers. Surprisingly, the mean C_q values of inactivated oocysts (95 °C for 15 min) were not significantly different to those of oocysts excysted with sodium hypochlorite plus sodium taurocholate (which resulted in the highest excystation rate), suggesting that this

excystation procedure resulted in the inactivation and non-proliferation of the parasite (Figure 1). Sodium hypochlorite helps to thin and remove the outer and inner layers of the oocyst wall and, consequently, weakens the parasites even before their contact with sodium taurocholate [39]. The cytotoxicity of sodium taurocholate for HCT-8 cells has been described [40] and, by extension, may have a lethal effect on the weakened sporozoites.

According to the results of the present study, excystation is not necessary before infecting cells as the parasitic proliferation in HCT-8 cells is decreased. Moreover, excystation is an additional step that can lead to a supplementary loss of parasites, whereas the number of recovered *Cryptosporidium* from food is already low. Thus, the use of unexcysted oocysts for CC-qPCR assays seems to be an interesting and relevant alternative for food analysis and risk assessment. The limit of detection of this CC-qPCR method for purified oocysts or those recovered from parasites spiked in lamb's lettuce was determined using serial dilutions of *C. parvum* at concentrations of 10^4 to one oocyst. This method reliably enables the detection of up to 100 infectious oocysts (100% of sensitivity). According to the sensitivity obtained at the lowest doses, the assays should be done in at least quadruplicates to allow the detection of one infectious oocyst in water (3/12) or lamb's lettuce (8/30) (Tables 1 and 2).

The present CC-qPCR method allows the assessment of *Cryptosporidium* infectivity in food. The inoculation of parasites in wells with and without cells allows us to calculate the ΔC_q that reflects the parasitic proliferation relative to the *Cryptosporidium* DNA background (in wells without cells). The higher the ΔC_q , the more DNA copies are observed; thus, the more parasitic proliferation there is. However, in a condition when we have the C_q in wells with cells and no signal in wells without cells, the ΔC_q cannot be calculated, but we assume parasites have proliferated. When no signal is observed in wells without cells, the detection limit of classic qPCR is probably reached, and the DNA background cannot be detected. Thus, DNA amplification through parasite proliferation in wells with cells is essential to detect *Cryptosporidium* in the sample. Therefore, the CC-qPCR can circumvent the limits of the classic qPCR and improve the level of detection in complex food matrices compared to direct molecular assays. The results of wells with and without cells are still essential to determine if the observed qPCR signal in wells with cells is a background signal of non-infectious oocysts or due to the proliferation of infectious parasites.

Furthermore, a good correlation is observed between the C_q obtained with and without cells and the quantity of oocysts initially inoculated in wells for 10,000 to 10 ($R^2 = 0.997$) and 10,000 to 100 ($R^2 = 0.945$), respectively; and of parasites recovered from lamb's lettuce for 10,000 to 10 ($R^2 = 0.992$) and 10,000 to 100 ($R^2 = 0.91$), respectively (Figures 2 and 3). These results show that the method can be used to detect, quantitatively, up to 100 infectious oocysts recovered from food and can highlight the parasites' inactivation (loss of infectivity). Such a performance offers interesting perspectives to assess the efficacy of food processes on oocysts in food.

5. Conclusions

The present CC-qPCR method is sensitive, reproducible, and quantitative. It is adequate to successfully detect as low as one infectious *C. parvum* oocysts from lamb's lettuce if assays are performed in at least quadruplicates. The technique uses unexcysted oocysts and, thus, limits the potential loss of parasites at excystation procedures, washes, and successive centrifugations because the entirety of the sample is analyzed. Furthermore, it provides a valid alternative to the mouse model to evaluate parasite infectivity in food.

This CC-qPCR method constitutes a useful tool to carry out parasite surveillance in food and, thus, to assess consumer exposure to *Cryptosporidium* hazard.

Author Contributions: Conceptualization: L.F., S.L.C., R.R. and I.V.; methodology: S.K.; validation: R.R., D.C., L.F. and S.L.C.; investigation: S.K.; writing—original draft preparation: S.K.; visualization: L.F., S.L.C., R.R., D.C., I.V., G.G. and A.R.; supervision: D.C., S.L.C., L.F. and R.R.; funding acquisition: L.F., I.V. and S.L.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by the region Normandie (RIN SACRYVEG, grant number 18E01808/18P03680) and the University of Rouen Normandie. S. Kubina was funded by a CIFRE Ph.D. between ACTALIA and the French Ministry of “Higher Education, Research and Innovation” (CIFRE 2017/1450) in the frame of the UMT ACTIA PROTORISK.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors are grateful to Nikki Sabourin-Gibbs (Rouen University Hospital), for her help in editing the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Murphy, F.A. The threat posed by the global emergence of livestock, food-borne, and zoonotic pathogens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *894*, 20–27. [CrossRef] [PubMed]
- Macarisin, D.; Bauchan, G.; Fayer, R. *Spinacia Oleracea* L. leaf stomata harboring *Cryptosporidium parvum* oocysts: A potential threat to food safety. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 555–559. [CrossRef] [PubMed]
- European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA J.* **2012**, *10*, 2597. [CrossRef]
- European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA J.* **2013**, *11*, 3129. [CrossRef]
- European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA J.* **2014**, *12*, 3547. [CrossRef]
- European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J.* **2015**, *13*, 3991. [CrossRef]
- European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA J.* **2015**, *13*, 4329. [CrossRef]
- European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J.* **2016**, *14*, e04634. [CrossRef]
- European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J.* **2017**, *15*, e05077. [CrossRef]
- European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA J.* **2018**, *16*, e05500. [CrossRef]
- European Food Safety Authority. The European Union One Health 2018 zoonoses report. *EFSA J.* **2019**, *17*, e05926. [CrossRef]
- Koutsoumanis, K.; Allende, A.; Alvarez-Ordóñez, A.; Bolton, D.; Bover-Cid, S.; Chemaly, M.; Davies, R.; Cesare, A.D.; Herman, L.; Hilbert, F.; et al. Public health risks associated with food-borne parasites. *EFSA J.* **2018**, *16*, e05495. [CrossRef] [PubMed]
- Ryan, U.; Zahedi, A.; Paparini, A. *Cryptosporidium* in Humans and animals—A One Health approach to prophylaxis. *Parasite Immunol.* **2016**, *38*, 535–547. [CrossRef] [PubMed]
- NF EN ISO 18744-Juin. 2016. Available online: <https://www.boutique.afnor.org/norme/nf-en-iso-18744/microbiologie-de-la-chaine-alimentaire-recherche-et-denombrement-de-cryptosporidium-et-giardia-dans-les-legumes-verts-frais-a-fe/article/818177/fa181274> (accessed on 15 December 2020).
- Ryan, U.; Hijjawi, N.; Xiao, L. Foodborne cryptosporidiosis. *Int. J. Parasitol.* **2018**, *48*, 1–12. [CrossRef] [PubMed]
- Slifko, T.R.; Smith, H.V.; Rose, J.B. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int. J. Parasitol.* **2000**, *30*, 1379–1393. [CrossRef]
- Hohweyer, J.; Cazeaux, C.; Travaillé, E.; Languet, E.; Dumètre, A.; Aubert, D.; Terryn, C.; Dubey, J.P.; Azas, N.; Houssin, M.; et al. Simultaneous detection of the protozoan parasites *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* and *Giardia* in food matrices and their persistence on basil leaves. *Food Microbiol.* **2016**, *57*, 36–44. [CrossRef]
- Cook, N.; Paton, C.A.; Wilkinson, N.; Nichols, R.A.B.; Barker, K.; Smith, H.V. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 1: Development and optimization of methods. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, *109*, 215–221. [CrossRef]
- Ahmed, S.A.; Karanis, P. An overview of methods/techniques for the detection of *Cryptosporidium* in food samples. *Parasitol. Res.* **2018**, *117*, 629–653. [CrossRef]
- Rousseau, A.; La Carbona, S.; Dumètre, A.; Robertson, L.J.; Gargala, G.; Escotte-Binet, S.; Favenec, L.; Villena, I.; Gérard, C.; 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. *Parasite* **2018**, *25*, 14. [CrossRef]

21. Pecková, R.; Stuart, P.D.; Sak, B.; Květoňová, D.; Kváč, M.; Foitová, I. Statistical comparison of excystation methods in *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Vet. Parasitol.* **2016**, *230*, 1–5. [\[CrossRef\]](#)
22. Di Giovanni, G.D.; Hashemi, F.H.; Shaw, N.J.; Abrams, F.A.; LeChevallier, M.W.; Abbaszadegan, M. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in surface and filter backwash water samples by immunomagnetic separation and integrated cell culture-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 3427–3432. [\[CrossRef\]](#)
23. Tyzzer, E.E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.* **1912**, *26*, 394–412.
24. Fontaine, M.; Guillot, E. Development of a taqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2002**, *214*, 13–17. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Linnaeus, C. *Valeriana locusta* var. *olitoria* Linnaeus, 1753, var. nov. *Zenodo* **1753**. [\[CrossRef\]](#)
26. Robertson, L.J.; Gjerde, B. Factors affecting recovery efficiency in isolation of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from vegetables for standard method development. *J. Food Protect.* **2001**, *64*, 1799–1805. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Razakandrainibe, R.; Kubina, S.; Costa, D.; Robinson, G.; La Carbona, S.; Aubert, D.; David, A.; Gargala, G.; Villena, I.; Favennec, L.; et al. Evaluation of a modified method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts on spinach leaves. *Food Waterborne Parasitol.* **2020**, *21*, e00097. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Dixon, B.; Parrington, L.; Cook, A.; Pollari, F.; Farber, J. Detection of *Cyclospora*, *Cryptosporidium*, and *Giardia* in ready-to-eat packaged leafy greens in Ontario, Canada. *J. Food. Prot.* **2013**, *76*, 307–313. [\[CrossRef\]](#)
29. Robertson, L.J. *Cryptosporidium as a Foodborne Pathogen*; Springer Briefs in Food, Health, and Nutrition; Springer: New York, NY, USA, 2014; ISBN 978-1-4614-9377-8.
30. Rochelle, P.A.; Marshall, M.M.; Mead, J.R.; Johnson, A.M.; Korich, D.G.; Rosen, J.S.; De Leon, R. Comparison of in vitro cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3809–3817. [\[CrossRef\]](#)
31. Meloni, B.P.; Thompson, R.C. Simplified methods for obtaining purified oocysts from mice and for growing *Cryptosporidium parvum* in vitro. *J. Parasitol.* **1996**, *82*, 757–762. [\[CrossRef\]](#)
32. Upton, S.J.; Tilley, M.; Brillhart, D.B. Comparative development of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa) in 11 continuous host cell lines. *FEMS Microbiol. Lett.* **1994**, *118*, 233–236. [\[CrossRef\]](#)
33. Slifko, T.R.; Huffman, D.E.; Dussert, B.; Owens, J.H.; Jakubowski, W.; Haas, C.N.; Rose, J.B. Comparison of tissue culture and animal models for assessment of *Cryptosporidium parvum* infection. *Exp. Parasitol.* **2002**, *101*, 97–106. [\[CrossRef\]](#)
34. Aboytes, R.; Giovanni, G.; Abrams, F.; Rheinecker, C.; Mcelroy, W.; Shaw, N.; Lechevallier, M. Detection of infectious *Cryptosporidium* in filtered drinking water. *J. Am. Water Work Assoc.* **2004**, *96*, 88–98. [\[CrossRef\]](#)
35. Arrowood, M.J. In vitro cultivation of *Cryptosporidium* species. *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, *15*, 390–400. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Feng, H.; Nie, W.; Sheoran, A.; Zhang, Q.; Tzipori, S. Bile acids enhance invasiveness of *Cryptosporidium* spp. into cultured cells. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 3342–3346. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Kar, S.; Dauschies, A.; Cakmak, A.; Yilmazer, N.; Dittmar, K.; Bangoura, B. *Cryptosporidium parvum* oocyst viability and behaviour of the residual body during the excystation process. *Parasitol. Res.* **2011**, *109*, 1719–1723. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Gold, D.; Stein, B.; Tzipori, S. The utilization of sodium taurocholate in excystation of *Cryptosporidium parvum* and infection of tissue culture. *J. Parasitol.* **2001**, *87*, 997–1000. [\[CrossRef\]](#)
39. Siripanth, C.; Punpoowong, B.; Amarapal, P.; Thima, N.; Eampokalap, B.; Kaewkungwal, J. Comparison of *Cryptosporidium parvum* development in various cell lines for screening in vitro drug testing. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **2004**, *35*, 540–546.
40. Delling, C.; Lendner, M.; Müller, U.; Dauschies, A. Improvement of in vitro evaluation of chemical disinfectants for efficacy on *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Vet. Parasitol.* **2017**, *245*, 5–13. [\[CrossRef\]](#)

Chapitre 2



Chapitre 2 : Étude de l'adhérence de *Cryptosporidium parvum* à la surface de la mâche

I. Introduction

Dans un contexte d'émergence du danger *Cryptosporidium*, il est crucial de mieux comprendre le comportement de ce parasite dans les aliments. Il est capable de persister à la surface des feuilles de mâche. Le lavage à l'eau chlorée de la salade contaminée ne parvient pas à réduire en totalité la charge parasitaire. Cela suggère que *C. parvum* est capable d'adhérer durablement sur la mâche. Or, actuellement aucune étude ne s'est intéressée aux interactions impliquées entre le parasite et les matrices alimentaires végétales.

L'attachement des oocystes aux matrices végétales est une étape clé dans sa transmission alimentaire. Comprendre les facteurs qui contrôlent ce processus d'adhérence peut donner un aperçu des méthodes d'intervention appropriées pouvant être utilisées pour empêcher l'attachement ou éliminer cet agent pathogène adhérent à l'aliment.

L'adhérence initiale (premier contact entre deux individus) est caractérisée par des interactions non spécifiques qui résultent des propriétés hydrophobes, électrostatiques et ioniques des organismes concernés. Elle dépend de la composition de surface des oocystes et de la feuille de mâche. Les feuilles de mâche sont recouvertes d'une cuticule, un matériau hydrophobe composé principalement d'acides gras, de cires et de glucides. La cuticule favorise la fixation de molécules hydrophobes. De plus, les cassures de cette surface peuvent exposer le parasite aux cellules végétales, qui sont majoritairement recouvertes de glycoprotéines et de sucres (Yaron & Römling, 2014). La paroi de l'oocyste, quant à elle, est composée d'une membrane contenant des protéines et des lipides, recouverte d'une fine couche riche en sucres, appelée glycocalyx (Jenkins *et al.*, 2010 ; Nanduri *et al.*, 1999). En fonction de leur composition en acides aminés, les protéines vont présenter des charges à leur surface, qu'elles soient positives, négatives ou neutres. Il est probable que des facteurs tels que le pH et la charge ionique peuvent modifier les interactions entre le parasite et la feuille de mâche. En effet, plusieurs études ont pu montrer que la présence d'ions monovalents et divalents modifie l'adhérence du parasite à différentes surfaces (Kuznar & Elimelech, 2005 ; Janjaroen *et al.*, 2010 ; Luo *et al.*, 2016). Cependant, les facteurs qui contrôlent l'adhérence des oocystes de *Cryptosporidium* aux supports végétaux ne sont pas étudiés.

L'adhérence peut évoluer vers des interactions dites spécifiques, de type récepteur-ligand. Des études ont pu démontrer que *Cryptosporidium* est capable d'interagir notamment avec des cellules de l'épithélium intestinal humain par l'intermédiaire des sucres. Les sporozoïtes (forme végétative) de *Cryptosporidium* possèdent à leur surface des lectines (P30, P23) spécifiques du galactose/N-acétyl-galactosamine (Gal/GalNAc) se trouvant à la surface des cellules hôtes. Ces protéines P30 et P23 seraient ainsi impliquées dans l'attachement du parasite aux cellules épithéliales (Bhat *et al.*, 2007 ; Martínez-Ocaña *et al.*, 2020). Étant donné la présence de sucres à la surface des oocystes et de la feuille végétale, il est fort probable que des interactions de ce type soient impliquées dans l'adhérence.

II. Matériels et méthodes

A. Matériel

Le matériel utilisé dans ce chapitre est le même que celui présenté dans le chapitre 1 (cf. Chapitre 1. II. A. Matériel).

B. Méthodes

a. Préparation des suspensions parasitaires

Les oocystes purifiés de selles de veaux par IMS (10^4) sont centrifugés à 3 000g pendant 30min à +4°C et le surnageant est éliminé.

1. Pour étudier les interactions non spécifiques :

Le culot d'oocystes est remis en suspension dans du PBS à différents pH (allant de 2 à 11) ou dans de l'eau ultrapure (Gibco™ ; Thermo Fisher Scientific, France) enrichie en ions. Le pH du milieu est ajusté par ajout de HCl pour obtenir des pH acides ou de NaOH pour des pH basiques. Les différentes solutions ioniques utilisées sont composées de 100mM de NaCl (Sigma, France), de KCl (Sigma, France), de CaCl_2 (Sigma, France) ou de MgCl_2 (Sigma, France). Les suspensions ainsi préparées sont mélangées par vortex (30sec) et incubées 10min à température ambiante avant utilisation.

2. Pour les interactions spécifiques :

Le culot d'oocystes est remis en suspension dans du PBS supplémenté en sucres ou en lectines. Les sucres ajoutés au milieu à 500mM sont : le glucose, le galactose, le fucose, le mannose, le N-acétyl-glucosamine (GlcNAc), le N-acétyl-galactosamine (GalNAc) et le N-acétyl-neuraminique (NANA) (Sigma, France). Les lectines (glycoMATRIX™, Clinisciences, France) sont ajoutées au milieu à une concentration de 10µg/ml sauf pour la lectine AIA

(*Artocarpus integrifolia*) qui est utilisée à 1µg/ml (**Tableau 14**). Les oocystes sont mis en contact avec les sucres ou les lectines pendant 1h à température ambiante avant utilisation.

Tableau 14 – Liste des lectines utilisées

Sucre cible	Lectine		Concentration utilisée
	Nom	Origine	
Galactose	<i>Artocarpus integrifolia</i> (AIA)	<i>Artocarpus integrifolia</i>	1µg/ml
Mannose/glucose	Concanavaline A (ConA)	<i>Canavalia ensiformis</i>	10µg/ml
GlcNAc	Wheat Germ Agglutinin (WGA)	<i>Triticum vulgaris</i>	10µg/ml
NANA	<i>Maackia amurensis</i> (MAL)	<i>Maackia amurensis</i>	10µg/ml

b. Inoculation des oocystes et évaluation de l'adhérence du parasite sur la mâche

La suspension parasitaire préalablement préparée est directement inoculée sur une feuille de mâche (sans lavage) par dépôt en gouttes (10 x 1µl) / condition testée. La feuille de mâche contaminée est ensuite déposée sous PSM pendant 2h à température ambiante puis une nuit à +4°C. Au terme de l'incubation, la feuille de mâche contaminée est placée dans un tube de 15ml puis soumise à un lavage doux dans du PBS (5ml) sous rotation verticale pendant 1min à 40rpm. Le surnageant est récupéré puis 5ml de PBS sont ajoutés dans le tube contenant la feuille de mâche contaminée pour réaliser un second lavage. Une fois le dernier lavage effectué, le surnageant est transféré dans le tube précédent puis centrifugé à 3 000g pendant 30min à +4°C. Le culot est ensuite remis en suspension dans 200µl de PBS. Après vortex, 10µl de la suspension parasitaire sont déposés sur lame afin de réaliser le dénombrement des oocystes récupérés après marquage avec Crypto-Cel (cf. Chapitre 1. B. b. Dénombrement des oocystes). Le pourcentage d'oocystes non adhérents est calculé pour chaque condition testée et correspond au (nombre d'oocystes récupérés / nombre d'oocystes initialement inoculés sur la feuille de mâche) x 100.

c. Mise en évidence de la présence de sucres à la surface de l'oocyste par cytométrie en flux

Dix milles oocystes sont incubés avec 50µl de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole ; Waterborne, USA) pendant 30min à +37°C. Un lavage est ensuite effectué avec 1ml de PBS par centrifugation (3 000g – 30min à +4°C). Le culot est remis en suspension dans 50µl de PBS contenant une lectine fluorescente (**Tableau 15**), puis incubé à +37°C pendant 30min. Un lavage au PBS (1ml) est ensuite réalisé par centrifugation à 3 000g pendant 30min à +4°C. Le culot est remis en suspension dans 500µl de PBS pour être analysé par cytométrie en flux.

Tableau 15 – Liste des lectines fluorescentes utilisées

Sucre cible	Lectine		
	Nom	Origine	Fluorochrome couplé
Galactose	<i>Artocarpus integrifolia</i> (AIA)	<i>Artocarpus integrifolia</i>	Cyanine 3
Mannose/glucose	Concanavaline A (ConA)	<i>Canavalia ensiformis</i>	Cyanine 3
GlcNAc	Wheat Germ Agglutinin (WGA)	<i>Triticum vulgaris</i>	Cyanine 5
NANA	<i>Maackia amurensis</i> (MAL)	<i>Maackia amurensis</i>	Cyanine 5

Les échantillons sont analysés par un cytomètre en flux de type LSR Fortessa™ (BD Biosciences, USA). La sélection de la population est tout d'abord effectuée grâce à la taille (FSC) et à la granulosité (SSC) des oocystes (**Figure 28A**), puis par les DAPI⁺ (**Figure 28B**). Les différents échantillons présentés sous forme d'histogramme ont été comparés à la courbe représentant la population d'un témoin négatif (sans marquage) (**Figure 28C**). Dès que l'intensité relative de fluorescence détectée est plus élevée que celle représentée par le témoin négatif, les échantillons sont considérés comme marqués positivement, traduisant de la présence du sucre à la surface de l'oocyste. L'analyse des données est effectuée *a posteriori* en utilisant le logiciel v10,7.2. FlowJo (BD Biosciences, USA).

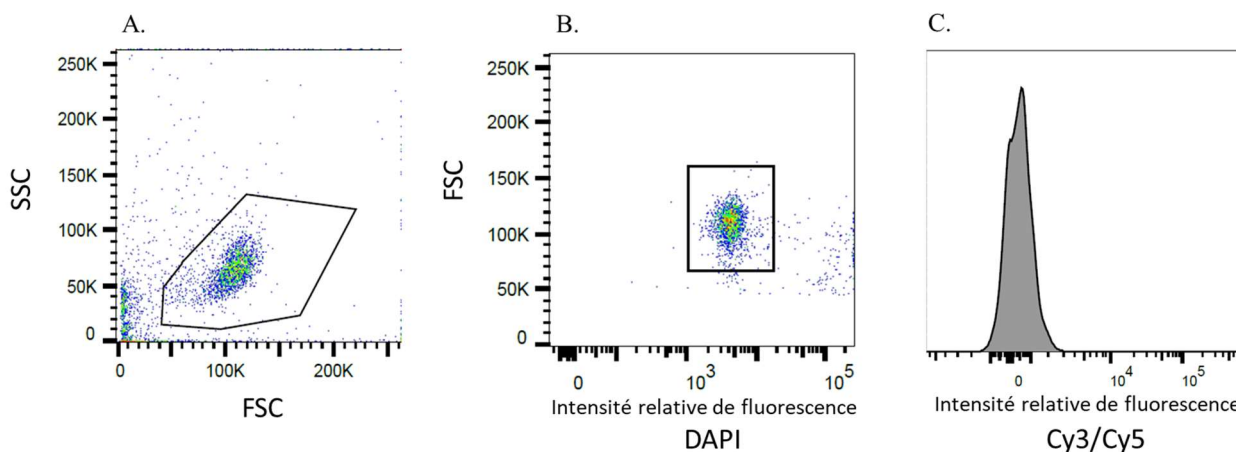


Figure 28 – Sélection de la population étudiée grâce à un témoin négatif

d. Présentation des résultats et analyses statistiques

La majorité des résultats est présentée sous forme de boîtes à moustache comme décrit précédemment (cf. Chapitre 1. II. B. 1. Présentation des résultats). Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel R (version 4.0.3). Le test de la normalité des jeux de données *via* Shapiro et Wilk a conduit à l'utilisation du test de Student pour comparer les données. Les résultats obtenus en cytométrie en flux sont des variables qualitatives (marquage positif ou négatif). Dans ces conditions, les comparaisons statistiques sont réalisées selon le test exact de Fisher. Une différence est considérée comme significative pour une p -value < 0,05. La reproductibilité (N) et la répétabilité (n) pour chaque essai effectué seront précisées dans la légende des figures présentant chaque résultat.

III. Résultats

A. Interactions non spécifiques

Les interactions non spécifiques sont définies selon les propriétés de surface des oocystes de *C. parvum* et de la feuille de mâche. Elles peuvent également dépendre des propriétés du milieu environnant lors du contact entre le parasite et la matrice végétale. Les oocystes possèdent une paroi épaisse, contenant des glucides (2%), des protéines (7%), des glycolipides et des phospholipides (Jenkins *et al.*, 2010). Ces groupes fonctionnels conduisent à une surface chargée. L'adhérence du parasite peut ainsi varier en fonction des paramètres environnants tels que le pH et la composition ionique du milieu (Luo *et al.*, 2016). Les interactions non spécifiques ont été étudiées en faisant varier le pH et la composition ionique des suspensions parasitaires inoculées à la surface des feuilles de mâche. L'adhérence du parasite a été évaluée après un lavage doux des feuilles de mâche contaminées pour récupérer les oocystes considérés comme non adhérents, puis dénombrement de cette fraction non adhérente.

a. Liaisons électrostatiques

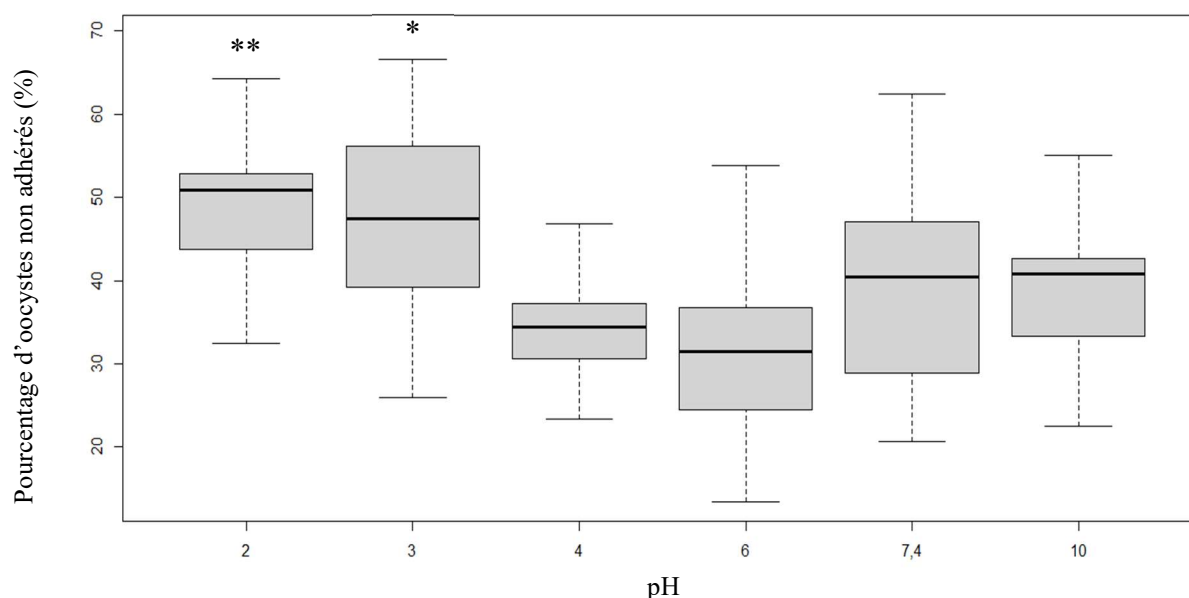


Figure 29 – Adhérence des oocystes de *C. parvum* à la surface de la mâche en fonction du pH de la suspension parasitaire inoculée.

L'adhérence du parasite est évaluée par dénombrement des oocystes récupérés de la mâche après un lavage doux et un immunomarquage. Les comparaisons statistiques ont été réalisées par rapport aux résultats obtenus à pH neutre (7,4). *p*-value : ** < 0,01 ; * < 0,05. *N* ≥ 5, *n*=3, nombre de lots d'oocystes testés ≥ 2.

Une augmentation significative du pourcentage d’oocystes non adhérents et récupérés de la mâche contaminée est observée lorsque le pH de la suspension est inférieur ou égal à 3 (moyennes : $48 \pm 11,5\%$ à $\text{pH} \leq 3$ vs. $37 \pm 10,1$ à $\text{pH} > 3$; $p\text{-value} < 0,001$; **Figure 29**). Le point isoélectrique (pI) des oocystes étant compris entre 2 et 3, la charge négative présente à la surface du parasite pour les $\text{pH} > 3$ semble favoriser son adhérence sur la mâche.

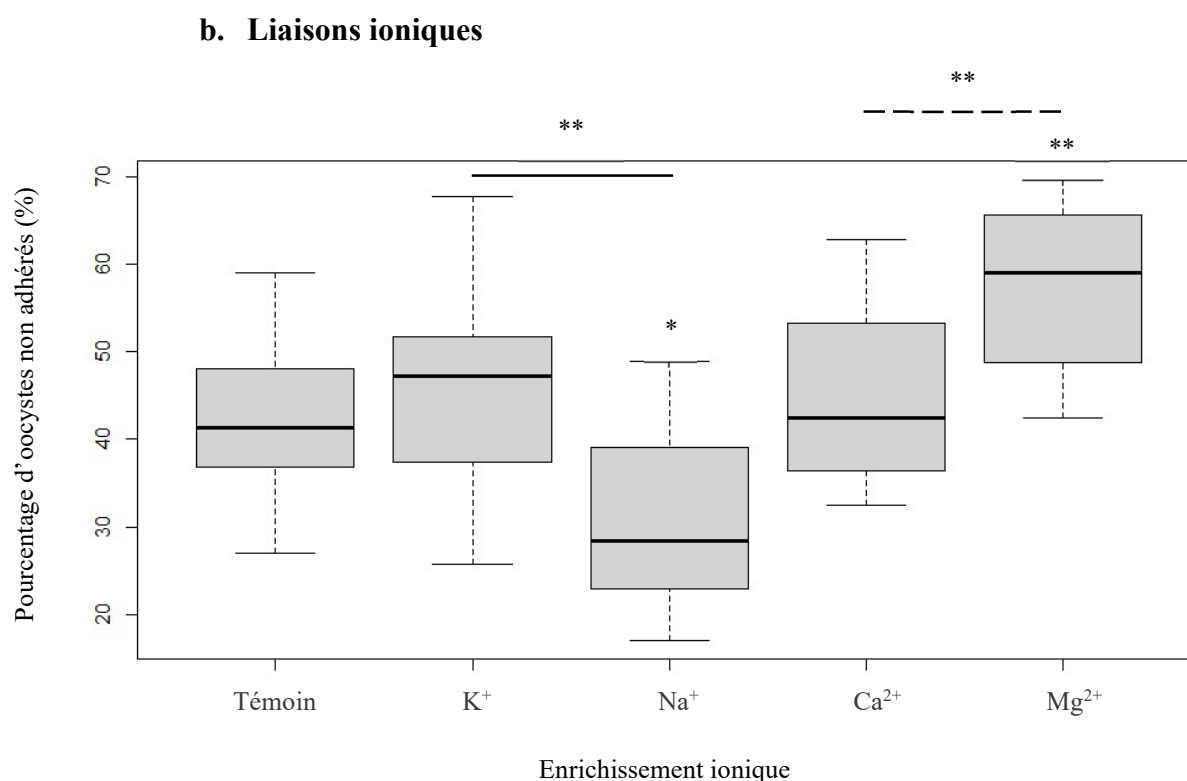


Figure 30 – Adhérence des oocystes de *C. parvum* à la surface de la mâche en fonction de l’enrichissement ionique de la suspension parasitaire inoculée.

L’adhérence du parasite est évaluée par dénombrement des oocystes non adhérents et récupérés de la mâche après un lavage doux et un immunomarquage. La condition témoin correspond à une suspension d’oocystes non supplémentés en ions. Le pH moyen des suspensions enrichies en ions était de $5,35 \pm 0,33$. Les comparaisons statistiques ont été réalisées par rapport à la condition témoin, entre l’enrichissement en K⁺ et Na⁺ (trait uni) ; et entre Ca²⁺ et Mg²⁺ (trait en pointillé). $p\text{-value}$: ** < 0,01 ; * < 0,05. N=4, n=3, nombre de lots d’oocystes testés =3.

Aucune différence significative n’a été observée en présence d’ions potassium (K⁺) ($46 \pm 11,6\%$ d’oocystes récupérés ; $p\text{-value} = 0,47$) et d’ions calcium (Ca²⁺) ($45 \pm 10,3\%$; $p\text{-value} = 0,55$) par rapport à la condition témoin (sans enrichissement ; $42 \pm 10,1\%$; **Figure 30**). En revanche, l’enrichissement en ions sodium (Na⁺) et en ions magnésium (Mg²⁺) induit une diminution ($31 \pm 10,6\%$; $p\text{-value} < 0,05$) et une augmentation ($56 \pm 10,3\%$; $p\text{-value} < 0,01$) significatives du pourcentage d’oocystes non adhérents à la mâche, respectivement. Des

différences entre les ions monovalents (Na^+ vs. K^+ ; $p\text{-value} < 0,01$) et divalents (Ca^{2+} vs. Mg^{2+} ; $p\text{-value} < 0,01$) ont été observées. La présence d'ions Na^+ favorise l'adhérence du parasite aux feuilles de mâche et celle d'ions Mg^{2+} empêche l'interaction, contrairement aux ions K^+ et Ca^{2+} , respectivement.

Les interactions non spécifiques semblent médier l'adhérence de *C. parvum* sur la mâche. Les facteurs tels que le pH et la composition ionique du milieu dans lequel se trouve les oocystes lorsqu'ils entrent en contact avec la matrice végétale, contrôlent probablement leur adhérence. Les ions Na^+ favorisent l'interaction, alors que la présence d'ions Mg^{2+} la diminue.

B. Interactions spécifiques

Au cours des interactions matrice/agent pathogène, la disponibilité en sucre est un des enjeux majeurs pour les deux partenaires, ce type d'interaction peut se faire, notamment *via* la présence de glycoconjugués, composants essentiels de la membrane et paroi cellulaire. Les glycoconjugués sont des molécules constituées d'une partie glucidique liée de manière covalente à une partie non glucidique (aglycone). Cet aglycone peut être d'origine protéique ou lipidique. La partie glucidique participe à de nombreux phénomènes de reconnaissance moléculaire de type récepteur-ligand (Cioci, 2006). Il est fort probable que les sucres présents à la surface des oocystes et de la feuille de mâche soient impliqués dans leur interaction. En général, les saccharides les plus couramment retrouvés à la surface de toute cellule sont : le glucose, le galactose, le mannose, le fucose, le GlcNAc, le GalNAc et le NANA (Cioci, 2006). L'implication de ces sucres dans l'adhérence des oocystes de *C. parvum* sur la mâche a été appréciée. Tout d'abord, les récepteurs des sucres potentiellement présents sur l'oocyste et la matrice végétale ont été saturés par incubation des oocystes avec ces différents sucres. Puis les glucides probablement impliqués ont été bloqués par des lectines spécifiques. Pour finir, la présence de ces sucres impliqués, à la surface de l'oocyste, a été évaluée par l'utilisation de lectines spécifiques fluorescentes puis analysée par cytométrie en flux.

a. Identification indirecte de sucres potentiellement impliqués dans l'interaction entre l'oocyste et la mâche *via* leurs récepteurs

Des suspensions d'oocystes ont été incubées avec différents sucres, puis ont été inoculées sur des feuilles de mâche. Aucun lavage de la suspension parasitaire supplémentée en sucre n'a été réalisé avant l'inoculation sur la matrice végétale. L'objectif a été de bloquer les récepteurs des sucres potentiellement présents sur l'oocyste mais également sur la feuille de mâche. Dans ces conditions, le sucre présent en suspension pourra entrer en compétition avec le sucre naturellement présent à la surface de l'oocyste ou de la mâche pour un récepteur donné. La capacité d'adhérence des oocystes sur le végétal, après saturation des potentiels récepteurs de sucres, a été évaluée en caractérisant le pourcentage d'oocystes non adhérents. La figure 31 présente les différents scénarii possibles pouvant être mis en jeu dans l'interaction oocyste-mâche pour un sucre donné et conduisant à l'adhérence du parasite.

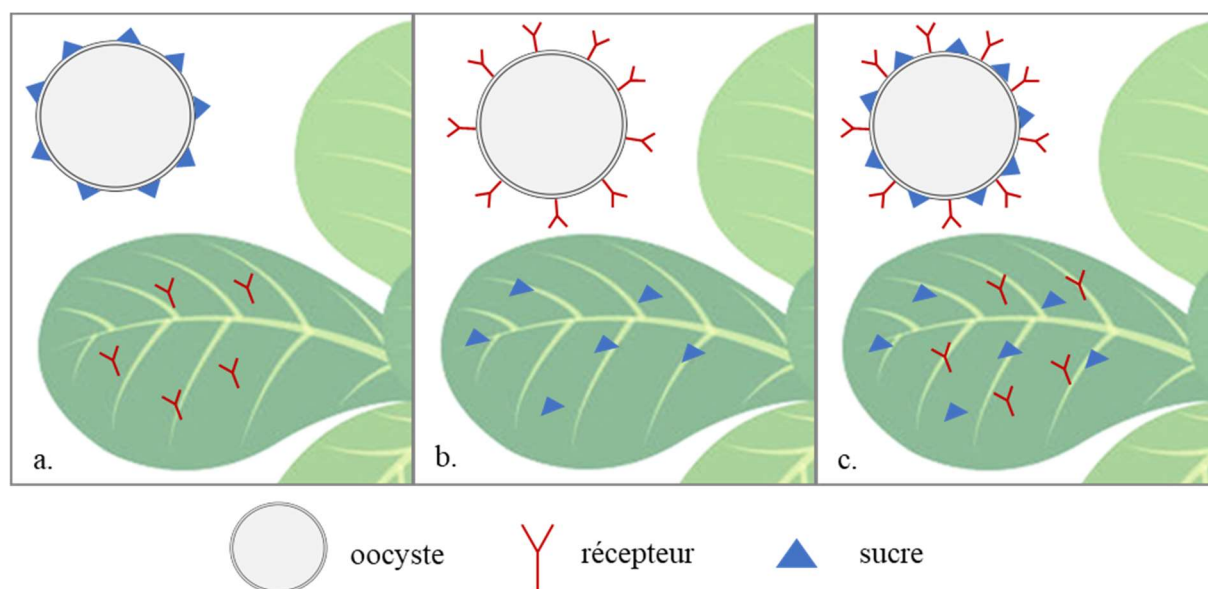


Figure 31 – Hypothèses sur la localisation d'un sucre potentiellement impliqué dans l'adhérence parasitaire (et de son récepteur).

Le sucre impliqué dans l'adhérence parasitaire peut être présent sur l'oocyste (a), la mâche (b) ou les deux (c). En parallèle, son récepteur peut se retrouver sur la mâche (a), l'oocyste (b) ou les deux (c).

Le récepteur d'un sucre donné impliqué dans l'adhérence parasitaire peut être localisé sur l'oocyste (b et c) ou sur la mâche (a et c). Indirectement, le sucre peut être présent à la surface de l'oocyste (a et c) ou à celle de la mâche (b et c). Peu importe la manière d'interagir, étant donné qu'aucun lavage de la suspension d'oocystes supplémentés en sucre n'a été réalisé, si le sucre est impliqué dans l'adhérence, une diminution de l'adhérence parasitaire sera observée après saturation des récepteurs (**Figure 32**).

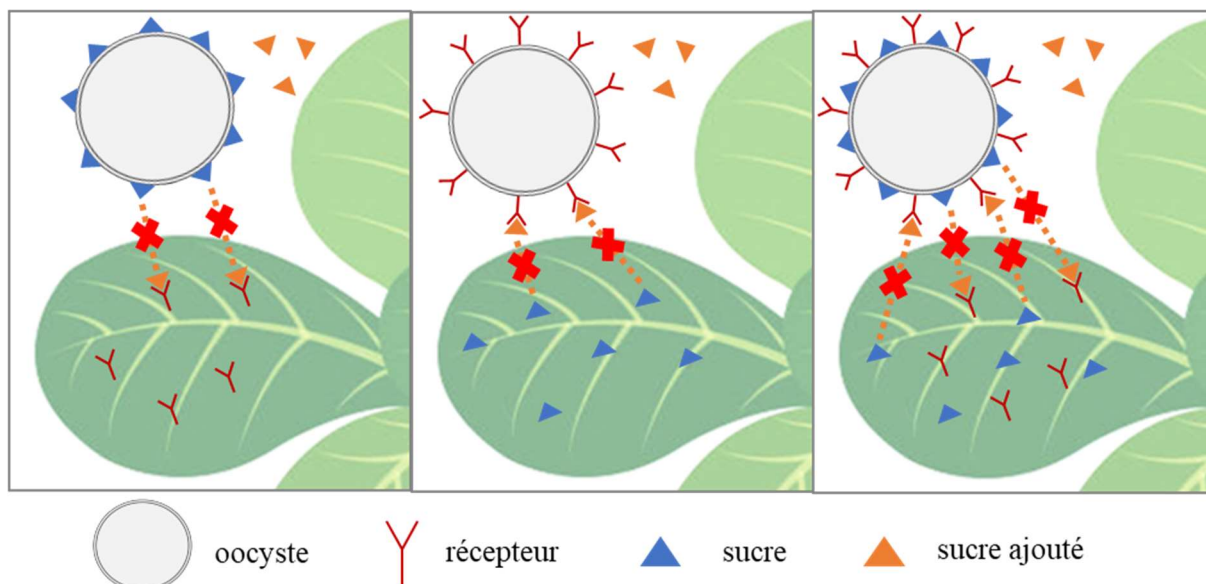


Figure 32 – Schémas des interactions possibles entre le parasite et la mâche après saturation des récepteurs par un sucre impliqué dans l'adhérence selon la localisation des récepteurs.

Après saturation des récepteurs d'un sucre impliqué dans l'interaction entre l'oocyste et la mâche, une diminution de l'adhérence du parasite est possible selon les différents scénarii présentés.

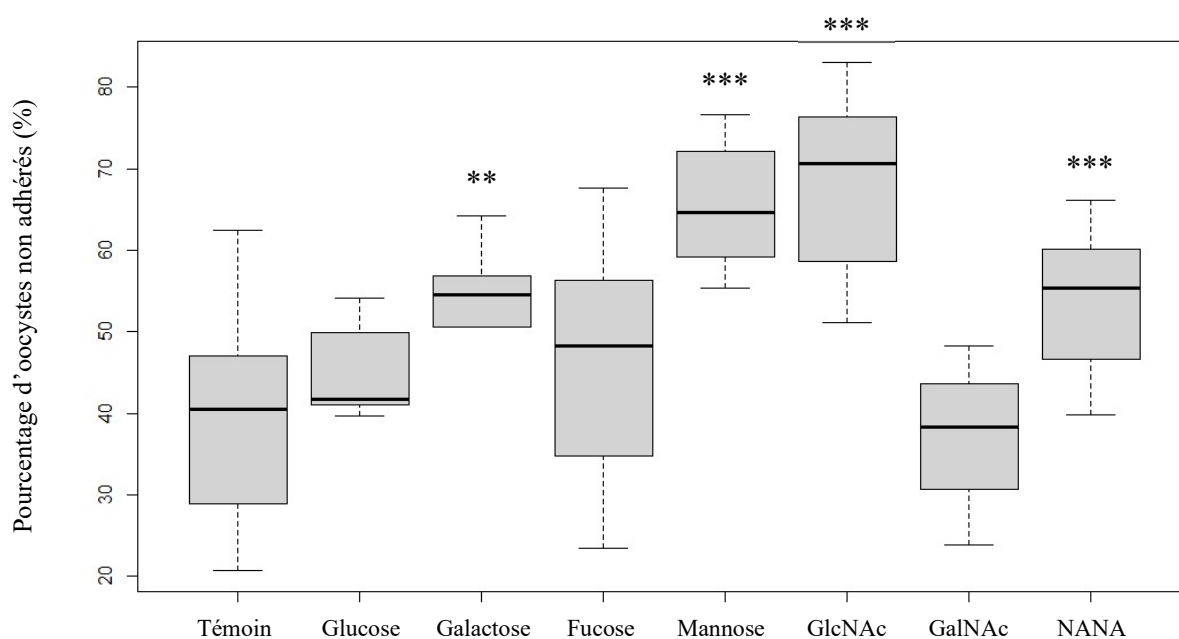


Figure 33 – Adhérence des oocystes de *C. parvum* à la surface de la mâche en fonction du sucre ajouté.

L'adhérence du parasite est évaluée par dénombrement des oocystes non adhérents et récupérés de la mâche après un lavage doux et immunomarquage. La condition témoin correspond à une suspension d'oocystes non supplémentée en sucre. Les comparaisons statistiques ont été réalisées par rapport à la condition témoin. p-value : *** < 0,001 ; ** = 0,01. GlcNAc : N-acétyl-glucosamine. GalNAc : N-acétyl-galactosamine. NANA : N-acétyl-neuraminique. $N \geq 3$, $n=3$, nombre de lots d'oocystes testés =3.

Les résultats ne montrent aucune différence significative de l'adhérence du parasite par rapport à la condition témoin (sans ajout de sucre) ($39 \pm 10,1\%$ d'oocystes récupérés), en présence de glucose ($45 \pm 5,8\%$; $p\text{-value} = 0,10$), de fucose ($46 \pm 15,6\%$; $p\text{-value} = 0,23$), et de GalNAc ($39 \pm 12,3\%$; $p\text{-value} = 0,96$). En revanche, ils mettent en évidence une augmentation significative du pourcentage d'oocystes non adhérents en présence de galactose ($51 \pm 11,0\%$; $p\text{-value} = 0,01$), de mannose ($65 \pm 7,8\%$; $p\text{-value} < 0,001$), de GlcNAc ($68 \pm 11,1\%$; $p\text{-value} < 0,001$) et de NANA ($53 \pm 8,7\%$; $p\text{-value} < 0,001$). Ceci suggère qu'en présence de ces sucres en excès, les récepteurs correspondants (sur l'oocyste et/ou la mêche) ne sont plus disponibles pour les sucres naturellement présents. Ainsi, l'interaction entre l'oocyste et la mêche ne peut plus avoir lieu. Le galactose, le mannose, le GlcNAc et le NANA sont probablement impliqués dans l'attachement des oocystes sur la mêche alors que le glucose, le fucose et le GalNAc ne le sont pas.

b. Identification directe des sucres impliqués dans l'interaction entre l'oocyste et la mêche

Afin de confirmer l'implication du galactose, du mannose, du GlcNAc et du NANA ; des lectines spécifiques ont été utilisées (**Tableau 16**).

Tableau 16 – Liste des lectines utilisées avec leurs sucres cibles.

Sucre cible	Lectine	
	Nom	Origine
Galactose	<i>Artocarpus integrifolia</i> (AIA)	<i>Artocarpus integrifolia</i>
Mannose/glucose	Concanavalline A (ConA)	<i>Canavalia ensiformis</i>
GlcNAc	Wheat Germ Agglutinin (WGA)	<i>Triticum vulgaris</i>
NANA	<i>Maackia amurensis</i> (MAL)	<i>Maackia amurensis</i>

Les lectines utilisées dans cette étude sont des protéines qui possèdent au moins deux domaines de liaison à leur sucre spécifique (Arockia Jeyaprakash *et al.*, 2003 ; Turton *et al.*, 2004 ; Huang *et al.*, 2010 ; Loris *et al.*, 1998 ; Loris *et al.*, 2000 ; KleinJan *et al.*, 2014 ; Imberty *et al.*, 2000). Des suspensions d'oocystes ont été incubées avec différentes lectines, puis ont été inoculées sur des feuilles de mâche. Aucun lavage de la suspension parasitaire supplémentée en lectines n'a été réalisé avant l'inoculation sur la mâche. Dans ces conditions, la lectine ajoutée ira saturer son sucre cible naturellement présent à la surface de l'oocyste et/ou de la mâche. Une diminution de l'adhérence (augmentation du nombre de parasites non adhérents) sera observée si le sucre est naturellement présent que sur l'une des deux surfaces (a et b). En revanche, si le sucre impliqué et reconnu par la lectine est présent sur l'oocyste et la mâche, la lectine pourra former un pont entre les deux surfaces *via* ses deux sites de liaison et une adhérence équivalente à la condition témoin (non supplémentée en lectine) sera observée (c ; **Figure 34**).

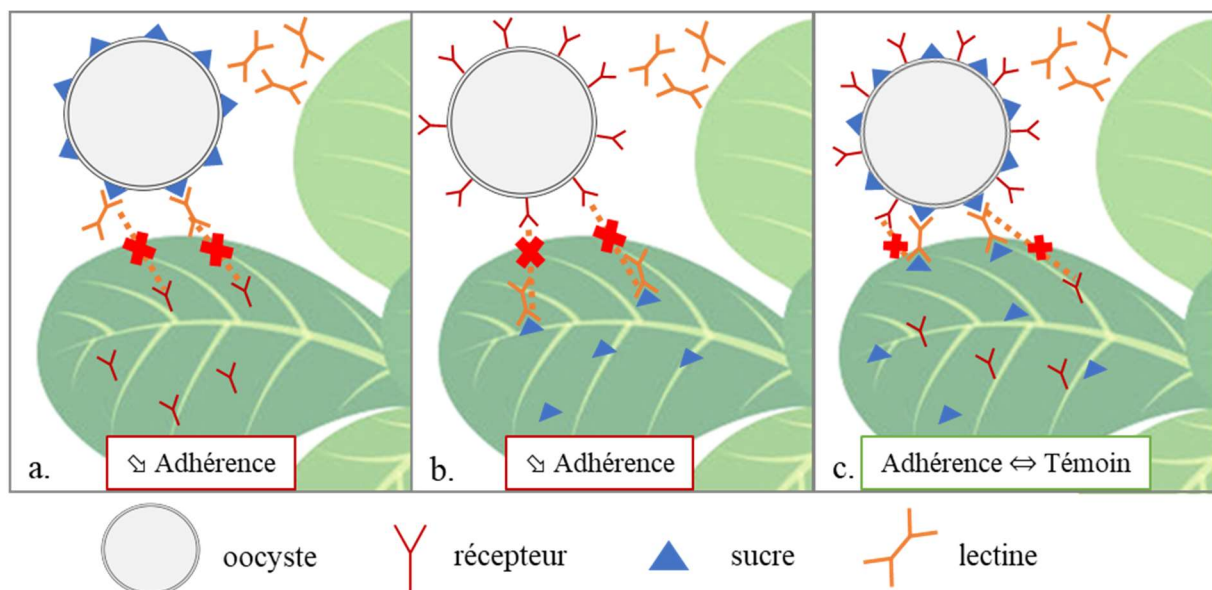


Figure 34 – Schémas des interactions possibles entre le parasite et la mâche après saturation d'un sucre impliqué dans l'adhérence parasitaire selon la localisation du sucre.

Après saturation d'un sucre impliqué dans l'adhérence parasitaire par une lectine spécifique, une diminution (a et b) ou non (c) de l'attachement du parasite est possible selon les différents scénarii présentés.

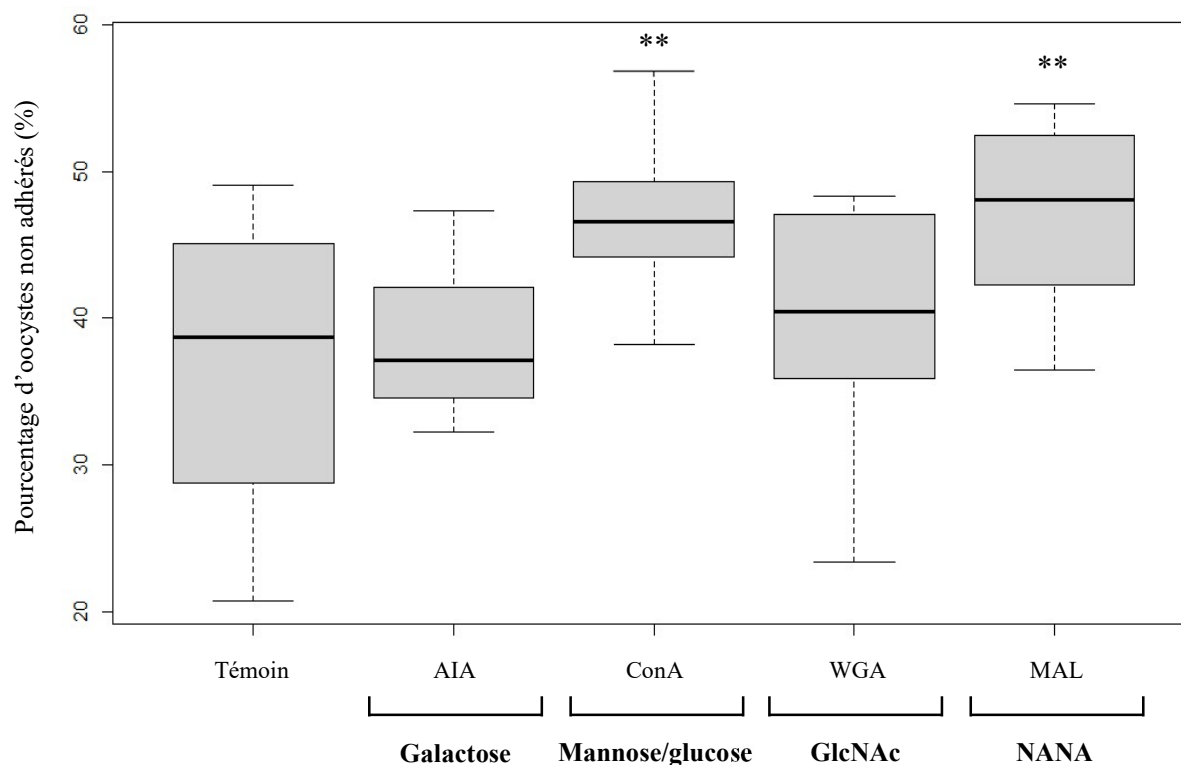


Figure 35 – Adhérence des oocystes de *C. parvum* à la surface de la mèche en fonction de la lectine ajoutée.

L'adhérence du parasite est évaluée par dénombrement des oocystes non adhérents et récupérés de la mèche après un lavage doux et un immunomarquage. La condition témoin correspond à une suspension d'oocystes non supplémentés en lectine. En gras sont indiqués les sucres cibles. Les comparaisons statistiques ont été réalisées par rapport à la condition témoin. p -value : ** < 0,01. GlcNAc : N-acétyl-glucosamine. NANA : N-acétyl-neuraminique. $N \geq 3$, $n=3$, nombre de lots d'oocystes testés =3.

Les résultats ne montrent aucune différence d'adhérence du parasite entre la condition témoin (sans ajout de lectines ; $39 \pm 10,1\%$ d'oocystes récupérés) et les lectines : AIA ($35 \pm 8,8\%$; p -value = 0,21) et WGA ($42 \pm 9,5\%$; p -value = 0,30). Cependant, pour les lectines MAL et ConA, une diminution significative de l'attachement des oocystes est observée ($47 \pm 6,5\%$; p -value < 0,01 ; et, $45 \pm 8,3\%$; p -value < 0,05 ; respectivement). Comme nous avons précédemment démontré que le glucose n'était pas impliqué dans l'adhérence (**Figure 33**), la diminution de l'adhérence du parasite observée en présence de la lectine ConA est probablement liée à la fixation de la lectine au mannose. Bien évidemment, on ne peut cependant pas exclure que le glucose ne soit pas présent sur l'une des deux surfaces. D'après ces résultats, de nouvelles hypothèses peuvent être émises quant à la localisation des sucres : le NANA et le mannose seraient présents uniquement à la surface de l'oocyste ou de la mèche (**Figure 36A**) alors que le galactose et le GlcNAc seraient présents naturellement sur les deux surfaces, parasitaire et végétale (**Figure 36B**).

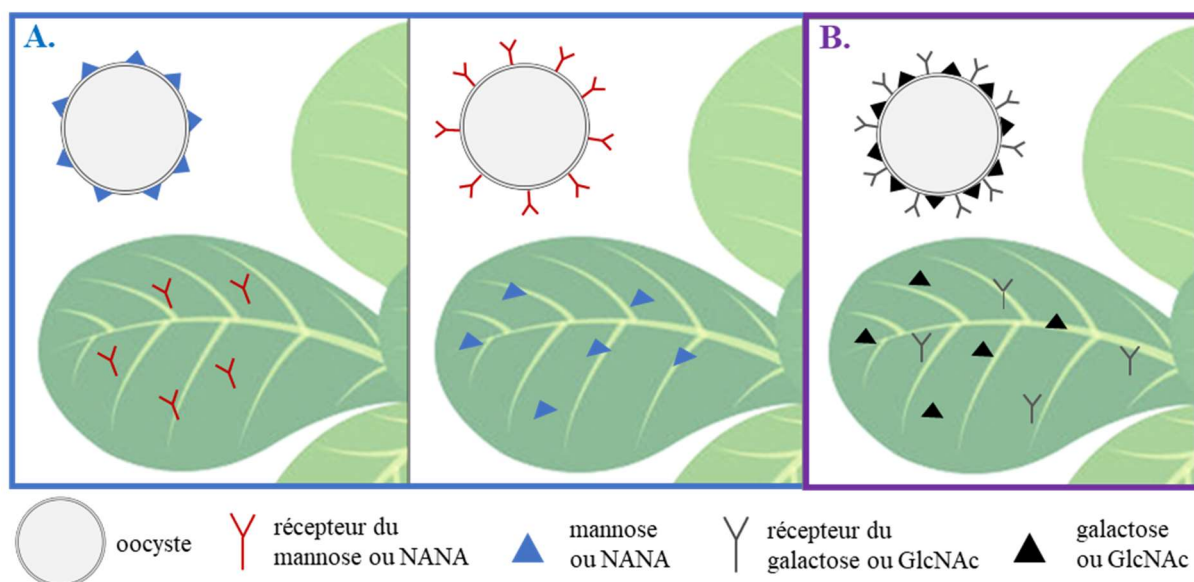


Figure 36 – Hypothèses sur la localisation des sucres potentiellement impliqués dans l’adhérence parasitaire (et de leur récepteur).

Le mannose et le NANA seraient potentiellement localisés sur l’oocyste ou la mâche, et inversement pour leur récepteur (A). Le galactose et le GlcNAc pourraient se trouver sur l’oocyste et la mâche simultanément, ainsi que leur récepteur (B).

c. Mise en évidence des sucres impliqués dans l’interaction à la surface des oocystes

Pour mettre en évidence la présence de ces sucres à la surface de l’oocyste, des suspensions parasitaires ont été marquées avec différentes lectines fluorescentes (**Tableau 17**) puis analysées par cytométrie en flux. Si le sucre est présent à la surface de l’oocyste, ce dernier deviendra fluorescent après fixation de la lectine. Le nombre d’oocystes marqués est ensuite déterminé par cytométrie.

Tableau 17 – Lectines utilisées avec leurs sucres cibles et leurs fluorochromes.

Sucre cible	Lectine		
	Nom	Origine	Fluorochrome couplé
Galactose	<i>Artocarpus integrifolia</i> (AIA)	<i>Artocarpus integrifolia</i>	Cyanine 3
Mannose/glucose	Concanavaline A (ConA)	<i>Canavalia ensiformis</i>	Cyanine 3
GlcNAc	Wheat Germ Agglutinin (WGA)	<i>Triticum vulgaris</i>	Cyanine 5
NANA	<i>Maackia amurensis</i> (MAL)	<i>Maackia amurensis</i>	Cyanine 5

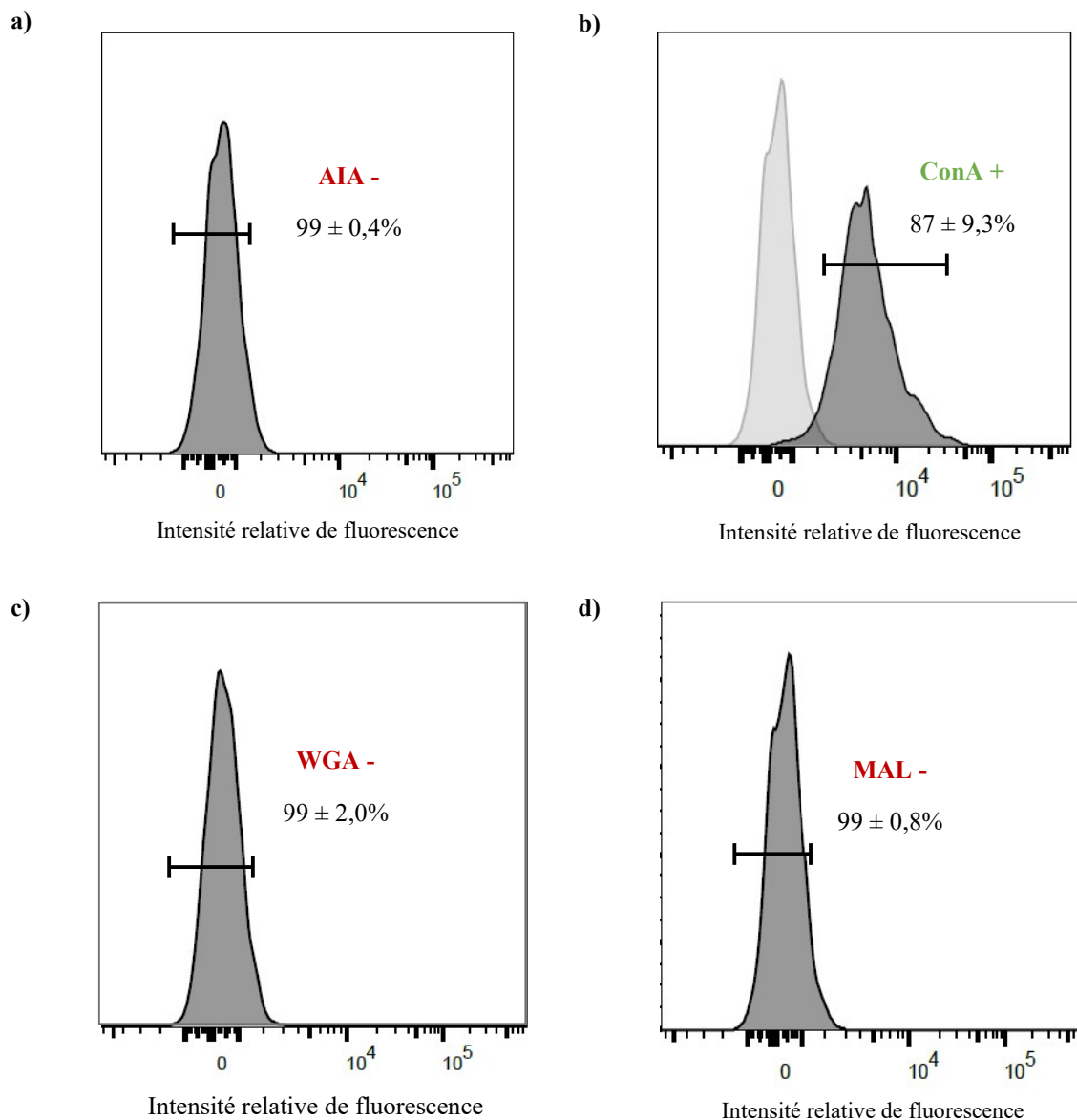


Figure 37 – Mise en évidence de sucres à la surface des oocystes par cytométrie en flux.

La présence de sucres à la surface des oocystes a été appréciée par cytométrie en flux. Les oocystes ont été incubés avec différentes lectines (couplées à des fluorochromes) : a) AIA, b) ConA, c) WGA et d) MAL. Si l'intensité relative de fluorescence moyenne pour un marquage donné est supérieure à celle de la condition témoin sans marquage (représentée en gris clair), le marquage est considéré comme positif. $p\text{-value} \leq 1$. $N = 3$, $n=3$, nombre de lots d'oocystes testés = 2.

Les résultats montrent que les lectines AIA ($99 \pm 0,4\%$ des oocystes détectés négatifs), WGA ($99 \pm 2,0\%$) et MAL ($99 \pm 0,8\%$) ne se sont pas fixées aux oocystes. Le galactose, le GlcNAc et le NANA ne seraient donc pas présents à la surface de l'oocyste. En revanche, la lectine ConA a pu se fixer sur l'oocyste *via* son sucre cible, avec $87 \pm 9,3\%$ des oocystes marqués (**Figure 37**). Cependant la lectine ConA est capable de se lier au glucose et au mannose. Les résultats permettent uniquement de mettre en évidence la présence du glucose et/ou du mannose sur l'oocyste, sans faire la différence entre les deux.

En reprenant l'ensemble des résultats, le NANA serait impliqué dans l'adhérence mais ne semble pas être localisé à la surface de l'oocyste (marquage négatif par la lectine MAL–Cy5). La présence de la lectine MAL a induit une diminution de l'attachement parasitaire à la surface de la mâche. Ce sucre semble donc être présent sur la mâche, et indirectement, son récepteur sur l'oocyste (**Figure 38**). Le mannose semble également être impliqué dans l'interaction parasite-mâche. Lorsque la lectine ConA a été ajoutée dans la suspension parasitaire inoculée sur la matrice végétale, une diminution de l'adhérence parasitaire a été observée. Ce qui semble suggérer que le mannose (et/ou le glucose) serait présent uniquement sur l'une des deux matrices et non sur les deux. Étant donné que l'oocyste est marqué par la lectine et que le mannose est impliqué dans l'interaction, il est fort probable que le mannose soit présent à la surface de l'oocyste et son récepteur sur la mâche comme présenté sur la figure 38.

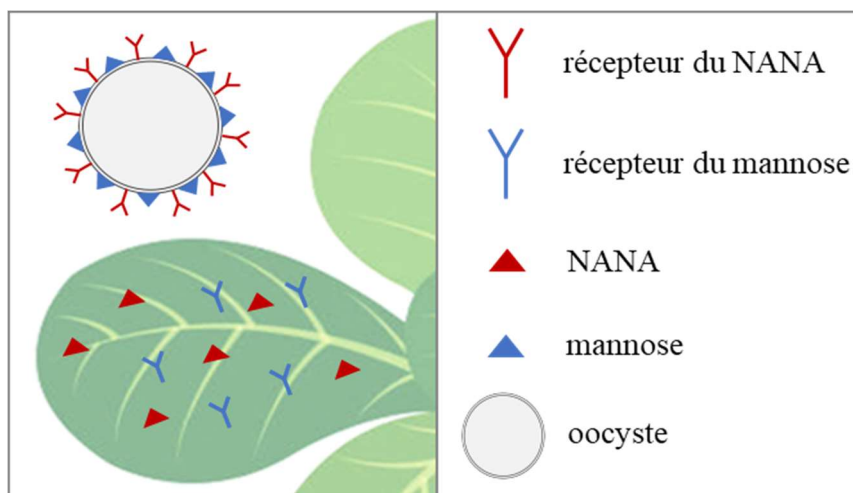


Figure 38 – Hypothèse sur la localisation du NANA et du mannose selon l'ensemble des résultats obtenus.

Le NANA semble être localisé à la surface de la feuille de mâche et le mannose à la surface de l'oocyste ; et inversement pour leur récepteur.

En ce qui concerne le GlcNAc et le galactose, la conclusion semble plus complexe. Ils sont bien impliqués dans l'adhérence de l'oocyste sur la mâche mais les résultats actuels ne permettent pas d'aller plus loin.

L'ensemble des résultats montrent que le galactose, le mannose, le GlcNAc et le NANA sont impliqués dans l'adhérence des oocystes de *C. parvum* sur les feuilles de mâche, contrairement au glucose, au fucose et au GalNAc. Le mannose semble être présent à la surface de l'oocyste contrairement au galactose, au GlcNAc et au NANA.

IV. Discussion, conclusions et perspectives

L'adhérence des oocystes de *Cryptosporidium* à la surface des feuilles végétales est essentielle pour garantir sa persistance et sa survie jusqu'à l'infection d'un nouvel hôte. L'élucidation du comportement des oocystes dans des environnements complexes est ainsi nécessaire à la protection de la santé publique. Il existe deux types d'interactions : les liaisons non spécifiques et spécifiques.

A. Interactions non spécifiques

La charge globale nette de surface de l'oocyste de *Cryptosporidium* est plus impliquée dans son adhérence aux surfaces, comparée à l'hydrophobicité. En effet, l'étude menée par Drozd & Schwartzbrod (1996) a démontré que les oocystes ne présentent pas de propriétés hydrophobes marquées et que la charge globale de surface des oocystes à pH neutre est négative (- 235 mV) puis augmente lorsque le pH diminue, jusqu'à atteindre 0 à pH acide (pH=2,5). Le point isoélectrique (pI) du parasite a été mesuré, il est compris entre 2 et 3 (Kuznar & Elimelech, 2005). Les connaissances actuelles sur la composition chimique de la paroi de l'oocyste sont limitées. Cependant, la charge globale négative du parasite (à pH neutre) peut être liée à la présence de groupes carboxyles et de phosphates contenus dans les phospholipides et les protéines de surface (Kuznar & Elimelech, 2005). Nos résultats montrent que les oocystes adhèrent plus à la feuille de mâche pour des valeurs de pH supérieures à son pI (> 3), c'est-à-dire lorsqu'ils sont chargés négativement. Ainsi, la charge négative à la surface des oocystes favoriserait son adhérence. Indirectement, cela voudrait dire que la surface des feuilles de mâche serait plutôt chargée positivement (à pH neutre).

Les interactions non spécifiques dépendent non seulement du pH mais aussi de la charge ionique du milieu environnant. En effet, des études ont pu montrer que l'ajout d'ions pouvait favoriser ou non l'attachement du parasite à certaines surfaces. Kuznar & Elimelech (2005) ont observé une augmentation de l'adhérence du parasite au Quartz (surface composée de charges négatives homogènes) en présence d'ions Ca^{2+} par rapport à la présence d'ions Na^+ . Ils ont émis l'hypothèse que la présence de cations monovalents (Na^+) permet seulement de neutraliser la surface, qui n'a pas d'impact sur l'adhérence. Les ions divalents (Ca^{2+}), quant à eux, peuvent engendrer une modification de la conformation des protéines de surface, favorable à l'attachement du parasite, ou faire un pontage entre les deux surfaces chargées négativement.

Une autre étude visant à évaluer l'adhérence de *Cryptosporidium* à des biofilms (surfaces chargées négativement), a également mis en évidence une différence d'attachement des oocystes en présence d'ions Mg^{2+} par rapport aux ions Ca^{2+} (Luo *et al.*, 2016). Ils ont observé une augmentation de l'adhérence du parasite aux biofilms, de 60% en présence de Mg^{2+} et de 100% en présence de Ca^{2+} . Leur hypothèse est que l'affinité des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} pour des groupes fonctionnels chargés négativement dépend de la propriété du cation impliqué. Notamment par sa taille, l'ion Ca^{2+} est plus gros que l'ion Mg^{2+} , ainsi les sites de fixation ne seront pas les mêmes. Cette caractéristique peut induire des différences de conformation des protéines de surface et donc d'adhérence du parasite. Dans cette étude, la surface sur laquelle *Cryptosporidium* se fixe, la mèche, est à priori, chargée positivement (comme démontrée précédemment), contrairement à la surface du biofilm et du Quartz. Les résultats ne montrent aucune différence de l'attachement du parasite, en présence de K^+ et de Ca^{2+} , alors qu'une augmentation et une diminution significatives de l'adhérence sont observées dans un milieu enrichi en Na^+ et Mg^{2+} , respectivement. Pour les ions divalents, les ions Mg^{2+} viendraient probablement neutraliser la charge de surface des oocystes mais également ajouteraient des charges positives à leur surface. Ces charges positives ajoutées pourraient induire une répulsion électrostatique, diminuant l'attachement du parasite à la mèche. De manière surprenante, la présence de Ca^{2+} n'induit aucun changement. Ce qui suggère que l'attachement n'est pas seulement une question de charge. Cette différence entre les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} , pourrait s'expliquer par une affinité différente des protéines de surface face aux ions. La fixation des ions Ca^{2+} pourrait impliquer un changement de conformation des protéines, comme suggéré par Luo *et al.* (2016) qui n'impacterait pas l'interaction parasite-mèche. En ce qui concerne l'enrichissement par des ions monovalents, la neutralisation des charges de surface de l'oocyste n'empêche pas son adhérence, et même, au contraire, l'augmente en présence de Na^+ . La différence de l'adhérence parasitaire observée entre ces deux ions monovalents, Na^+ et K^+ , pourrait s'expliquer, comme pour les ions divalents, par l'existence de sites de reconnaissances spécifiques aux ions Na^+ qui ne le sont pas aux ions K^+ , et inversement (Roux, 2010). Ainsi, s'il s'agissait uniquement de charge, l'ajout de cations (mono- ou divalents) diminuerait l'adhérence du parasite, ce qui n'est pas le cas sauf avec le Mg^{2+} . Ce sont probablement les caractéristiques individuelles des ions et des protéines impliquées, qui médient la fixation de *Cryptosporidium* aux feuilles de mèche. A l'heure actuelle, la composition de la paroi de l'oocyste exacte est limitée. Il serait intéressant d'en connaître davantage pour pouvoir avancer dans cette réflexion. Sachant que la surface de la mèche serait plutôt chargée positivement, un enrichissement en anions serait apprécié.

Les liaisons électrostatiques et ioniques sont impliquées dans l'adhérence de *C. parvum* à la surface de la mâche. La charge de surface des oocystes paraît essentielle à son attachement sur la mâche mais également pourrait dépendre des caractéristiques des ions et molécules de surface présents.

B. Interactions spécifiques

Les résultats de cette étude ont permis de mettre en évidence des interactions entre l'oocyste et la feuille de mâche par l'intermédiaire du galactose, du mannose, du GlcNAc et du NANA. Le NANA semble se localiser à la surface de la mâche et le mannose sur l'oocyste. La présence de mannose dans la paroi de l'oocyste a déjà été décrite (Jenkins *et al.*, 2010). Cependant, la lectine ConA reconnaît le mannose et le glucose, également présent dans la paroi de l'oocyste (Jenkins *et al.*, 2010) mais non impliqué dans l'interaction avec la mâche. Il conviendrait donc de valider la localisation du mannose à la surface de l'oocyste par l'utilisation d'autre lectine, comme la lectine GNL (*Galanthus nivalis*) qui semble être uniquement spécifique au mannose (Cioci, 2006).

Pour le GlcNAc et le galactose, la localisation ne peut pas être clairement établie d'après nos données. Le galactose a été identifié dans la paroi de l'oocyste par spectrométrie de masse en chromatographie gazeuse mais pas le GlcNAc (Jenkins *et al.*, 2010). Dans notre étude, l'ajout de lectines spécifiques à ces sucres ne permet pas de modifier l'interaction entre l'oocyste et la mâche, ni de les marquer. Ces résultats sont surprenants et posent un problème dans l'élaboration d'hypothèses. Une explication pourrait être liée à la quantité de lectines utilisée. Au cours de cette étude, la lectine AIA a été utilisée à une concentration de 1 µg/ml évitant ainsi l'agglutination des oocystes entre eux comme observée au laboratoire et préalablement décrite (Stein *et al.*, 2006). En effet, l'agglutination des oocystes pourrait modifier leur adhérence à la mâche et par conséquent biaiser les résultats. Cependant, cette concentration est peut-être trop faible pour pouvoir saturer l'ensemble des sucres naturellement disponibles et observer des modifications de l'adhérence parasitaire, ainsi qu'un marquage fluorescent positif. Afin de mieux comprendre ces données, il serait intéressant de réaliser une gamme de concentration de la lectine AIA marquée. Chaque point de gamme sera ajouté à une suspension parasitaire, puis après incubation et lavage de la suspension, la population d'oocystes sera analysée par cytométrie en flux. Ceci permettra de voir : (i) s'il y a un marquage positif des oocystes au-dessus d'une certaine concentration en lectine, qui traduira de la

présence du sucre à la surface de l'oocyste et/ou (ii) s'il y a présence d'amas de parasites (= agglutination par une augmentation de la taille des événements détectés). En parallèle, d'autres lectines pourront être utilisées, par exemple, la lectine GSL-II (*Griffonia simplicifolia*-II) pour identifier le GlcNAc et la lectine GSL-I (*Griffonia simplicifolia*-I) pour le galactose (Cioci, 2006).

L'interprétation de la localisation des sucres avec les lectines est parfois compliquée par leur manque de spécificité pour un unique sucre. Une alternative pourrait être envisagée. Lorsqu'un sucre a été identifié comme étant impliqué, il serait intéressant de réaliser des lavages de la suspension parasitaire supplémentée en sucre avant inoculation sur la mâche. Dans ce cas, seuls les récepteurs de l'oocyste peuvent être saturés par le sucre ajouté en suspension, ce qui se traduira par une diminution de l'adhérence parasitaire (**Figure 39a**). Si l'adhérence est identique à la condition témoin, cela suggère que : i) le récepteur impliqué est présent uniquement à la surface de la mâche (**Figure 39b**) ou ii) à la surface des deux matrices (**Figure 39c**). Le sucre en suspension, éliminé par le lavage, ne peut pas bloquer les récepteurs de la mâche et entrer en compétition avec le sucre naturellement présent sur l'oocyste. Ces résultats permettraient de préciser davantage la localisation des récepteurs/sucres impliqués dans l'interaction entre l'oocyste et la mâche, sans l'utilisation de lectines.

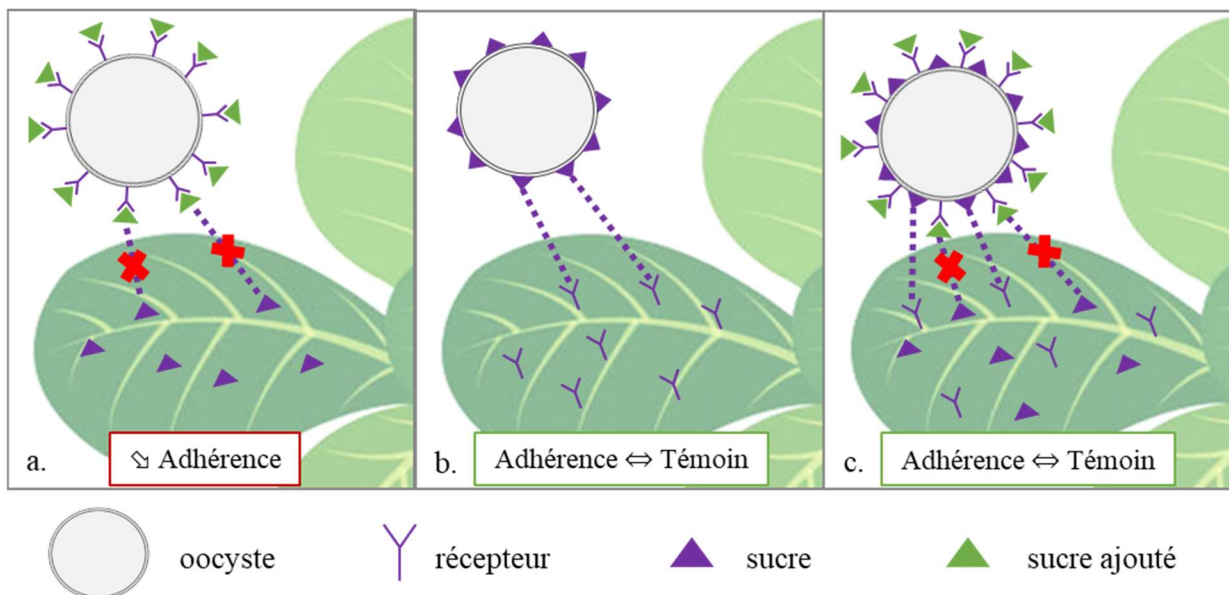


Figure 39 – Schémas des interactions possibles entre le parasite et la mâche après saturation des récepteurs sur l'oocyste par un sucre impliqué dans l'adhérence selon la localisation des récepteurs.

Jenkins *et al.* (2010) ont mis en évidence la présence du talose, du glucofuranose, du D-glucopyranose et du D-mannopyranose. Ces sucres n'ont pas été étudiés dans ce projet, il serait appréciable d'explorer leurs implications dans l'interaction oocyste-mâche. Concernant la mâche, il est connu que les cellules végétales présentent à leur surface des polysaccharides tels que la cellulose et les pectines (Yaron & Römling, 2014). Il serait intéressant de saturer les potentiels récepteurs présents à la surface des oocystes et des feuilles de mâche avec ces sucres. S'ils sont impliqués, une diminution de l'adhérence parasitaire sera observée.

Ce chapitre 2 a permis d'accroître les connaissances sur les interactions qu'il peut y avoir entre les oocystes de *C. parvum* et la feuille de mâche. Les forces électrostatiques et la composition ionique du milieu environnant semblent être impliquées dans l'adhérence du parasite, ainsi que la présence de certains sucres tels que le galactose, le mannose, le GlcNAc et le NANA. Le mannose serait présent à la surface de l'oocyste, et son récepteur sur la mâche. Le NANA, quant à lui, se trouverait à la surface de la matrice végétale et son récepteur sur l'oocyste.

Conclusion générale et perspectives



Conclusion générale et perspectives

Avant ce projet de thèse, la survie et la persistance de *Cryptosporidium* à la surface de végétaux lors de leur production primaire n'ont jamais été explorées. De même, les interactions impliquées entre *Cryptosporidium* et les matrices alimentaires végétales n'étaient pas décrites. Cette thèse a permis d'augmenter les connaissances sur le comportement de *Cryptosporidium* dans les aliments.

D'après l'ensemble des résultats, le danger *Cryptosporidium* est une réalité aux champs (en production primaire) et en industrie agroalimentaire (procédé de lavage/transformation). La contamination des légumes en cours de production peut se faire *via* les eaux d'irrigation, l'utilisation de fumier utilisé comme engrais ; et en industrie agroalimentaire par les eaux de lavage ou celles utilisées lors de la transformation des aliments. Bien que *Cryptosporidium* soit signalé comme danger biologique dans les GBPH Fruit et légumes frais non transformés (*via* les amendements organiques) et dans celles des Végétaux crus prêts à l'emploi (*via* les eaux), aucune mesure de maîtrise spécifique de ce danger, ni de plan de contrôle ne sont précisés (CTIFL 2010 & 2018). Cette étude a permis de démontrer que les oocystes de *C. parvum* sont capables de persister et de survivre à la surface la mâche en production primaire mais également après un lavage de 4^{ème} gamme. Il serait nécessaire de mettre en place des points critiques et de réaliser des contrôles de leur présence dans les mâches fraîchement récoltées, mais également des eaux de lavage et du fumier utilisé comme engrais. Ces points contrôles permettraient de s'assurer qu'il n'y ait aucun danger pour le consommateur.

Dans cette étude, nous avons reproduit une culture de mâche d'hiver. Des inoculations en surface (sur les feuilles de mâche directement) mimaient une contamination de surface, par exemple *via* l'irrigation par aspersion d'eau contaminée ou lessivage de sols contaminés. Actuellement, il existe un intérêt croissant pour la production hydroponique des salades. Ce système permet de cultiver des légumes à feuilles à cycle court (1-2 mois) pour lesquels, seules leurs racines entrent en contact avec les nutriments *via* la solution hydroponique (Manzocco *et al.*, 2011). Dans ce cas, l'irrigation et la contamination des plants par *Cryptosporidium* pourraient se faire par l'intermédiaire de leurs racines. Il serait intéressant de mener une étude, en incluant ce système de production, visant à évaluer la persistance et la survie de *Cryptosporidium* récupéré des plants contaminés dans ces conditions.

Le lavage à l'eau chlorée de la mâche contaminée, utilisé actuellement en industrie 4^{ème} gamme, n'est pas efficace comme mesure de contrôle vis-à-vis du danger *Cryptosporidium*. Le chlore ne va pas permettre de réduire la charge parasitaire, ni de l'inactiver. Trouver d'autres traitements désinfectants alternatifs à l'eau de javel semble crucial pour limiter la transmission parasitaire à l'Homme. L'ozone, un puissant agent oxydant, fait partie des candidats (Guzel-Seydim *et al.*, 2004 ; Keegan *et al.*, 2003). L'utilisation de l'ozone par rapport à d'autres agents oxydants habituellement utilisés dans l'industrie repose sur le fait que ses activités sont moins affectées par le pH et la température. L'ozone permet de réduire la contamination bactérienne des produits frais et est considéré comme une option sûre pour la décontamination bactérienne (Gérard *et al.*, 2019 ; Glowacz & Rees, 2016). A ce jour, l'efficacité de l'ozone sur la persistance et la survie de *Cryptosporidium* dans les matrices alimentaires, à l'exception du cidre (Blackburn *et al.*, 2006), n'a pas été étudiée. Un traitement aux ultraviolets pourrait également être testé directement sur les aliments contaminés. Une unique étude sur des framboises contaminées par des oocystes et exposées à une lumière UV pulsée a montré une réduction de 2 à 3 log d'oocystes (Le Goff *et al.*, 2015). De plus, en industrie agroalimentaire de 4^{ème} gamme, lors du lavage et de la préparation de l'aliment, l'eau peut être un facteur de contamination par *Cryptosporidium*. Les UVs étant déjà utilisés comme traitements des eaux potables et usées (ANSES, 2017), et Clancy *et al.* (2000) ayant montré que l'exposition aux UVs permettrait l'inactivation de 4 log d'oocystes de *C. parvum* présents dans de l'eau, il pourrait être envisagé de les mettre en place en industrie pour la décontamination des eaux avant et après le lavage des aliments. Ces deux traitements de décontamination (ozone et UVs) sont prometteurs et méritent d'être évalués même si le réaménagement des usines aurait un coût.

Le conditionnement 4^{ème} gamme, c'est-à-dire la mise en sachet sous atmosphère modifiée augmentant la durée de conservation des aliments, est variable selon les entreprises et les salades préparées. Le mélange gazeux peut être composé de dioxyde de carbone, d'azote et/ou d'oxygène (Ben-Yehoshua *et al.*, 2005 ; Mir & Beaudry, 2016 ; Witt). A priori, on peut supposer que ce mélange n'est pas d'effet sur la survie et la persistance du parasite à la surface des aliments mais il mériterait d'être évalué. Hormis ce conditionnement, la mâche peut être vendue sans lavage préalable. La charge parasitaire à la surface de la mâche peut ainsi être d'autant plus importante. Il serait intéressant de déterminer l'impact des procédures domestiques de lavage de la salade contaminée sur la persistance et la survie parasitaire. Par exemple, comparé un lavage à l'eau courante (sans essorage), un lavage au vinaigre et un lavage suivi d'un essorage comme décrits par Temesgen *et al.* (2021) sur les fruits à baies.

La méthode d'évaluation de l'infectiosité de *Cryptosporidium* présentée dans cette étude, la CC-qPCR, est un outil prometteur. Elle permet de mener des études de prévalence de *Cryptosporidium* dans les différentes matrices alimentaires consommées crues, peu cuites et/ou peu transformées en donnant directement une information sur l'infectiosité du parasite détecté. De même, cette technique pourrait être pertinente dans les études rétrospectives en cas d'intoxications alimentaires (ou épidémies) pour l'identification de *Cryptosporidium* infectieux dans les aliments suspects. Elle est également déjà utilisée comme méthode d'évaluation de procédés sur d'autres matrices alimentaires. En effet, des projets réalisés en parallèle de cette thèse, utilisent déjà cette technique afin d'évaluer l'impact de procédés industriels sur la survie de *Cryptosporidium* à la surface, notamment d'herbes aromatiques et de certains fruits.

La surface des feuilles végétales est composée de stomates, ouvertures naturelles assurant des échanges gazeux entre la feuille et le milieu extérieur (respiration, excrétion). Macarasin *et al.* (2010b) ont démontré que les oocystes de *Cryptosporidium* peuvent être internalisés au niveau des stomates de feuilles d'épinards. Cette localisation particulière à la surface du végétal favorise probablement la persistance et, étant moins exposé aux agents extérieurs, la survie du parasite. Une étude similaire pourrait être menée avec des feuilles de mâche ainsi qu'avec d'autres végétaux alimentaires pouvant être impliqués dans la transmission parasitaire à l'Homme. Cette étude consisterait à utiliser des microsphères fluorescentes de 5µm (Biovalley, France) puis de les inoculer à la surface des feuilles de mâche. Les microsphères remplaceraient les oocystes de *Cryptosporidium* qui ne sont pas naturellement fluorescents. Après incubation, une analyse de la localisation de ces microsphères pourrait être réalisée par microscopie confocale.

Les résultats obtenus sur les interactions entre *Cryptosporidium* et la mâche sont préliminaires mais peuvent, très certainement, être transférés à d'autres matrices végétales, étant donné que les sucres sont universels et ubiquitaires. Cela ouvre de larges perspectives, notamment s'intéresser aux autres aliments pouvant être impliqués dans cette transmission. Les milieux dans lesquels se trouvent les oocystes lorsqu'ils entrent en contact avec la mâche influencent leur adhérence, donc peuvent impacter sur leur persistance et/ou leur survie. La persistance et la survie parasitaire n'ont pas été déterminées dans cette étude, il serait ainsi appréciable de les évaluer. Les résultats visant à étudier les interactions non spécifiques, permettraient de trouver des solutions applicables en industrie agroalimentaire. Par exemple, il est montré que l'ajout de magnésium réduirait la contamination parasitaire de la mâche. Cependant, dans ces conditions, ce sont les suspensions parasitaires qui ont été enrichies avant

d'être inoculées sur les feuilles. Maintenant, il serait intéressant de réaliser des inoculations de suspensions parasitaires non enrichies sur la mâche, d'effectuer le lavage des feuilles contaminées par une eau riche en magnésium, puis d'observer la charge parasitaire restante. Si ce lavage permet de la réduire, il faudrait ensuite déterminer la concentration de magnésium à utiliser et garantir que cet enrichissement n'ait pas d'impact sur la qualité de la mâche lavée, pour enfin le proposer aux industriels. Ces résultats sont prometteurs et méritent d'être davantage approfondis. Ces informations sont également d'un intérêt purement méthodologique afin d'adapter les tampons d'élution pour récupérer un maximum de parasites lors d'études de leur détection dans les aliments, ce qui est encore, à l'heure actuelle, un réel problème.

Toutes ces études complémentaires sont nécessaires et permettraient d'augmenter davantage la compréhension de la circulation du parasite dans les aliments, et d'estimer plus précisément le danger *Cryptosporidium*. *In fine*, l'objectif est de pouvoir accompagner les producteurs et industriels dans la maîtrise de ce danger émergent (ainsi que les consommateurs) afin de garantir la qualité de leurs produits et réduire la probabilité de transmission parasitaire à l'Homme.

Annexes



Immunomagnetic Separation (IMS) of *Cryptosporidium* Oocysts in Environmental Water Samples

Product No. ZAICS100: 100 test kit

Product No. ZAICS25: 25 test kit

INTENDED USE

Isolate is an *in vitro* procedure for the separation of *Cryptosporidium* oocysts from environmental water samples, in particular, with concentrates of drinking water supplies. Oocysts in the concentrate are captured by anti-*Cryptosporidium* oocyst wall-specific monoclonal antibodies conjugated to magnetic beads and separated from environmental debris using a powerful magnet. Oocysts are released from beads via acid dissociation, and beads are separated from oocysts by magnetic action. Detection of these captured and separated oocysts can then be performed by addition of fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-*Cryptosporidium* oocyst wall-specific monoclonal antibodies, followed by visualization of the labeled oocysts using a fluorescence microscope.

BACKGROUND

Cryptosporidium is a genus of coccidian protozoan parasite that contains several species, the most important of which are *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. Both organisms cause mild to severe gastroenteritis and diarrhoea in humans, and can be life-threatening in immunocompromised persons. *Cryptosporidium* lives part of its life cycle as an oocyst, which survives in the environment for prolonged periods of time, and is unaffected by routine drinking water chlorination¹.

Cryptosporidium hominis is almost exclusively a parasite of humans. *Cryptosporidium parvum* is infectious for virtually all mammals, and is widespread in its distribution². Drinking water supplies, and particularly surface water sources, are at risk of harbouring infectious oocysts and numerous outbreaks have been recorded^{3,4,5,6}. Importantly, there is a poor correlation between particle counts and oocyst occurrence⁷. Thus, while particle counting and turbidity can be used to monitor the overall functioning of a treatment plant, this data should not be used to predict the presence or absence of oocyst contamination, or as a replacement for a reliable and accurate oocyst monitoring method and program.

The importance of *Cryptosporidium* as a serious waterborne threat has prompted various governmental agencies to adopt programs to monitor for its presence. In 1996, the U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) implemented the Information Collection Rule (ICR), which mandated 18 months of testing by the largest water utilities in the United States⁸. Unfortunately, the method adopted in the ICR for *Cryptosporidium* testing is generally acknowledged to be inaccurate, unreliable, and very labour intensive⁹. Since *Cryptosporidium* oocysts are very small and their abundance in water is generally very low (but as few as 30 oocysts can cause infection¹⁰), detection requires concentration of significant volumes of water through small pore filters. Subsequent identification of oocysts in these concentrates is difficult due to the presence of debris, algae, and other organisms. Conventional centrifugation and density gradient techniques used in the separation of oocysts from such environmental debris are very inefficient, and large losses are common¹¹. Immunomagnetic separation (IMS) is a technique used frequently in blood separation applications^{12,13,14,15}. The USEPA adopted IMS as a procedure (Method 1622) that enables more accurate, reliable, and user-friendly determination of the presence of *Cryptosporidium* in water samples^{16,17}. IMS was also the method prescribed for oocyst isolation in the United Kingdom by the Drinking Water Inspectorate under the Water Supply (Water Quality) (Amendment) Regulations 1999¹⁷.

MATERIALS PROVIDED

Crypto Magnetic Beads. Concentrated magnetic bead suspension conjugated to oocyst wall-specific anti-*Cryptosporidium* mouse monoclonal IgG in a buffer containing protein stabiliser and detergent.

Reagent A (sample diluent). Concentrated buffer solution used to reduce the interference of inorganic and organic debris.

Reagent B (blocking buffer). Concentrated solution of protein used to reduce the binding of debris and organisms other than *Cryptosporidium* to Crypto Magnetic Beads.

Note: The preservative sodium azide is added to the above reagents. See warning note.

ADDITIONAL MATERIALS SUPPLIED BY TCS BIOSCIENCES LTD

- Variable speed rotator with angle of tilt set at 20° from horizontal (ZAICS1)
- Incu-Clip (ZAICS3), Magna-Clip (ZAICS4), Micro-Clip (ZAICS5)
- Dissociation Block (ZAICS8)
- Glass Leighton tubes (ZAICS6), or equivalent.



Isolate Rotator ZAICS1 with Rotator Disc and Hub ZAICS2



Isolate Incu-Clip (Blue) ZAICS3



Isolate Magna-Clip (White) ZAICS4



Isolate Micro-Clip (White) ZAICS5

OTHER MATERIALS REQUIRED

- Hydrophobic adhesion slides, 9 mm single well, blue coated, available from Hendley, Essex, UK, Part No. PH246
- Vortex mixer
- Polypropylene microcentrifuge tubes, 1.5 ml
- Micropipettes (capable of delivering 5-1000 µl)
- Transfer pipettes
- Aspiration device (vacuum source equipped with liquid trap and pipettor tip, or equivalent)
- 0.1 N HCl, reagent grade
- 1.0 N NaOH, reagent grade
- Purified water (distilled, deionised laboratory grade water, or reverse osmosis water)

PRECAUTIONS

The laboratory must be appropriately equipped for testing for and disposing of *Cryptosporidium*.

Annexe 1 : Protocole de l'IMS selon le fournisseur du kit.

Only qualified laboratory personnel with experience in microbiological techniques should perform and interpret this test.

All reagents are for *in vitro* use only.

Reagents must not be used beyond the expiration date indicated on the kit label.

Reagents must be brought to room temperature before use.

All reagents should be gently agitated prior to use. Use caution to avoid foaming.

Crypto Magnetic Beads should be gently, but thoroughly mixed **immediately prior** to sampling, as the beads settle rapidly.

WARNING: Sodium azide is used as a preservative in all of the provided reagents, at a concentration of 0.05%. Sodium azide is a skin irritant. Avoid skin contact with reagents. Do not mix with acids as this may result in the formation of hydrazoic acid, an extremely toxic gas. Disposal of reagents containing sodium azide into lead or copper plumbing can result in the formation of explosive metal azides. This can be avoided by flushing with a large volume of water during such disposal.

The Magna-Clip, Micro-Clip and Dissociation Block must be used for the magnetic separation of beads from the test sample. Magnetic devices from other manufacturers may not be suitable for this IMS test.

CAUTION: The glass Leighton tubes are fragile and caution must be used when placing them in or removing them from the Clips.

Each time the reagents are used, the components should be visually inspected for signs of contamination, and discarded if contamination is evident.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Isolate IMS aids in the identification of oocysts of the genus *Cryptosporidium*. Many *Cryptosporidium*-specific monoclonal antibodies react with multiple species of *Cryptosporidium*.

All IMS techniques have been shown to be highly dependent on the quality of the specific source water (dissolved substances, quantity and type of suspended solids, mineral content, algal species present, etc.). If difficulty is encountered with a particular sample, contact TCS Biosciences Ltd.

SHELF LIFE AND STORAGE

The expiration date of the kit is indicated on the kit label.

The kit should be stored at 2-8°C and should be returned to the refrigerator after use.

CAUTION: DO NOT FREEZE.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Research has demonstrated that *Isolate* can recover greater than 85% of oocysts seeded into water samples. Recovery will vary with water quality and turbidity. Generally, extremely turbid concentrates (>5000 NTU) containing large amounts of organic matter and algae are associated with lower recoveries, compared to concentrates with relatively more inorganics and lower turbidities (<5000 NTU).

REAGENT PREPARATION

1. The contents of the kit should be brought to room temperature prior to use. If crystals have formed in Reagent A upon 2-8°C storage, warm the bottle to room temperature with end over end mixing to redissolve all the precipitate before using. Providing that Reagent A will then be used within one month, it can be stored at room temperature.
2. Prepare 1.0 ml diluted IMS Reagent A for each sample to be tested by diluting the IMS Reagent A 1:10 in purified water. The diluted IMS Reagent A can be stored at 2-8°C.

SAMPLE PREPARATION

Samples should be prepared by procedures described in government regulatory documents, or by other standard methods. Isolate has been designed to separate oocysts in water samples containing packed pellets of 2.0 ml or less (20%). After centrifugation, remove sample supernatant and add purified water to give a final packed pellet volume of 2.0 ml or less (per 10 ml sample). If the final volume is greater than 10 ml, divide the sample into equal portions that will contain less than 2.0 ml packed pellet per 10 ml, and add purified water to give 10 ml samples for analysis. See specific instructions in regulatory methods for details.

PROCEDURE

NOTE: Various governmental regulations may prescribe additional steps in the IMS, especially regarding the transfer of samples. If performing these analyses under such regulations, please consult the specific published procedure.

A. Oocyst Capture

- Place 1 ml Reagent A and 1 ml Reagent B into a Leighton tube. Add to the Leighton tube the sample to be tested. Use 1 ml of purified water to rinse out the centrifuge tube, and add this also to the Leighton tube. Label the tube with the sample number.
- Mix the Crypto Magnetic Beads thoroughly, avoiding frothing. Ensure that the beads are fully mixed by inverting the bottle to make sure that there is no residual pellet in the bottom. Add 100 µl of Crypto Magnetic Beads to the Leighton tube and replace the cap.

NOTE: Ensure that Leighton tube cap has a sealing wad in place, and is properly tightened.

- Incubate the sample by placing the Leighton tube into a BLUE Incu-Clip with the flat side facing down (A). Slide the Incu-Clip and Leighton tube onto the *Isolate* Rotator Hub (B). Rotate into position, locating the cap of the tube in the *Isolate* Rotator Hub (B). Rotate at 20 rpm for at least 60 minutes at room temperature (C). **IMPORTANT:** Ensure that the Rotator angle is set at 20° from horizontal.



- Carefully remove the Incu-Clip containing the Leighton tube from the *Isolate* Rotator. Remove the tube from the Incu-Clip (D) and place it into a WHITE Magna-Clip with the flat side facing down against the magnets (E). Slot the Magna-Clip onto the *Isolate* Rotator disc until it clicks into position, locating the cap of the tube in the *Isolate* Rotator Hub (F).



TCS Biosciences Ltd
Botolph Claydon
Norfolk
United Kingdom

T +44 (0) 1295 714222
F +44 (0) 1295 714806
W sales@tcsbiosciences.co.uk
www.tcsbiosciences.co.uk

Isolate
cryptosporidium

Manufactured for TCS Biosciences Ltd by
Immucell Corporation
Portland, Maine, USA



- Set the *Isolate* Rotator at 20 rpm and operate for at least 5 minutes. If the pellet was greater than 0.5 ml, operate for at least 10 minutes.



- Switch off the *Isolate* Rotator when the Leighton tube is at the lowest point of the cycle, with its cap upmost.

- Remove the Magna-Clip (with the Leighton tube still in place) from the *Isolate* Rotator. If there are other samples on the *Isolate* Rotator, switch it back on to continue rotating them.

- Immediately remove the cap and, with the flat side of the tube downwards, pour off the supernatant. Without disturbing the bead pellet, aspirate any remaining supernatant with a pipette.

- Remove the tube from the Magna-Clip. Using 0.8 ml of Reagent A diluted 1:10 with purified water, rinse the bead pellet from the side of the tube. Pipette the solution over the beads repeatedly to ensure ALL beads are rinsed from the tube. Transfer the beads to a clean labeled 1.5 ml microcentrifuge tube. Rinse the Leighton tube with a further 0.2 ml of diluted Reagent A and add this to the microcentrifuge tube.

- Cap the microcentrifuge tube and place in the Micro-Clip. Slot the Micro-Clip onto the *Isolate* Rotator and operate at 20 rpm for at least 2 mins. If the pellet was greater than 0.5 ml operate for at least 4 minutes.

- Remove the Micro-Clip (with the tube still inside) from the *Isolate* Rotator. If there are other samples on the *Isolate* Rotator, switch it back on to continue rotating them.

- Immediately remove supernatant from the tube and from the cap using a suitable pipette. Take care not to disturb the beads on the tube wall.

- With samples containing a large amount of particulate material, it may be advantageous to wash the beads. Remove the tube from the Micro-Clip, add a further 1 ml of diluted Reagent A, cap the tube, gently mix the beads and repeat stages 11 - 13.

B. Dissociation of the beads/oocyst complex

- Remove the microcentrifuge tube from the Micro-Clip and add 50 µl 0.1N hydrochloric acid (HCl). Vortex the tube thoroughly for 10 seconds.

- Stand the tube at room temperature for 5 minutes and then vortex the tube again for 10 seconds.

- Place the tube into Dissociation Block and lay the Block flat on the workbench so that the tube is horizontal with the magnet below it. Leave for at least 30 seconds to allow the beads to separate.

- Label a clean 9 mm well slide.

- Add 5 µl 1.0 N sodium hydroxide (NaOH) directly to the sample well of the slide.

- Carefully return the Dissociation Block to the upright position and transfer the supernatant from the tube to the well of the slide without disturbing the beads at the back wall of the tube.

- Gently mix the sample with the NaOH using the transfer pipette.

- Perform a second acid treatment to ensure complete release of oocysts by repeating steps 15 to 17 and 19, and place this onto the same slide well by repeating steps 20 and 21.

REFERENCES

- Fayer R. (1995) Effect of sodium hypochlorite exposure on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts for neonatal BALB/c mice. *Applied Environmental Microbiology* **61**, 844-846.
- O'Donoghue P. (1995) *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis* in man and animals. *International Journal for Parasitology* **25**, 139-195.
- Lisle JT, Rose JB. (1995) *Cryptosporidium* contamination of water in the USA and UK: a mini-review. *Journal of Water SRT - Aqua* **44**, 103-177.
- MacKenzie W, Hoxie N, Proctor M, Grudus M, Blair K, Peterson D, Kazmierczak J, Adliss D, Fox K, Rose J, Davis J. (1994) A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *The New England Journal of Medicine* **331**, 161-167.
- Fricker CR, Crabb JH. (1998) Waterborne *Cryptosporidiosis*: Detection Methods and Treatment Options. *Advances in Parasitology* **40**, 241-278.
- McTigue N, LeChevallier M, Clancy J, Fredrickson D. (1996) Assessment of particle removals by conventional filtration. American Water Works Association Annual Conference, June 23, 1996, Toronto, Canada.
- USEPA (1994) Enhanced surface water treatment requirements. *Federal Register* **59**, 38832-38858.
- USEPA (1996) Monitoring requirements for Public Drinking Supplies: *Cryptosporidium*, *Giardia*, viruses, disinfection by-products, water treatment plant data and other information requirements. *Federal Register* **61**, 24353-24388.
- Clancy JL, Gollnitz WD, Tabib Z. (1994) Commercial labs: how accurate are they? *Journal of the American Water Works Association* **86**, 89-97.
- Dupont HL, Chappell CL, Sterling CR, Okhuysen PC, Rose JB, Jakubowski W. (1995) The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *New England Journal of Medicine* **332**, 855-859.
- LeChevallier MW, Norton WD, Siegel JE, Abbaszadegan M. (1995) Evaluation of the immunofluorescence procedure for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 690-697.
- Vardal F, Gaudernack G, Funderud S, Bratlie A, Lea T, Ugelstad J, Thorsby E. (1996) HLA class I and II typing using cells positively selected from blood by immunomagnetic isolation—a fast and reliable technique. *Tissue Antigens* **28**, 301.
- Bifulco JM, Shafer FW. (1993) Antibody-magnetite method for selective concentration of *Giardia lamblia* cysts from water samples. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 772-776.
- Fricker CR, Turner NB, Rolchigo PM, Margolin AB, Crabb JH. (1995) Improved recovery of *Cryptosporidium* oocysts from drinking water using vortex-flow filtration combined with immunomagnetic separation. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Suppl. **53**, 285.
- Jonas A, Crabb J, Murrin K, Slade JS, Fricker CR. (1997) Simultaneous concentration and separation of protozoan parasites and viruses using vortex flow filtration and immunomagnetic separation. Proceedings of the 1996 Water Quality Technology Conference. American Water Works Association. (9/8/98)
- USEPA (1999) Method 1622: *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/IFA. Office of Water, Washington, DC.
- Drinking Water Inspectorate, Department of the Environment, Transport and the Regions, United Kingdom (1999) Standard Operating Protocol for the Monitoring of *Cryptosporidium* Oocysts in Treated Water Supplies to Satisfy Water Supply (Water Quality) (Amendment) Regulations 1999, SI No. 1524.

www.tcsbiosciences.co.uk

Annexe 2 : Publication dans la revue à comité de lecture Food and Waterborne Parasitology.



**Evaluation of a modified method for the detection of
Cryptosporidium oocysts on spinach leaves**

Romy Razakandrainibe, Sophie Kubina, Damien Costa, Guy Robinson,
Stephanie Carbona, Dominique Aubert, Adonis David, Gilles Gargala, Isabelle
Villena, Loïc Favennec, et al.

► **To cite this version:**

Romy Razakandrainibe, Sophie Kubina, Damien Costa, Guy Robinson, Stephanie Carbona, et al..
Evaluation of a modified method for the detection of Cryptosporidium oocysts on spinach leaves.
Food and Waterborne Parasitology, Elsevier, 2020, 21, pp.e00097. 10.1016/j.fawpar.2020.e00097 .
hal-02985218

HAL Id: hal-02985218

<https://hal-normandie-univ.archives-ouvertes.fr/hal-02985218>

Submitted on 2 Nov 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives| 4.0
International License



Contents lists available at ScienceDirect

Food and Waterborne Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fawparEvaluation of a modified method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts on spinach leaves

Romy Razakandrainibe^{a,f,*}, Sophie Kubina^{b,f}, Damien Costa^{a,f}, Guy Robinson^{c,d},
Stephanie La Carbona^{b,f}, Dominique Aubert^{e,f}, Adonis David^{a,f}, Gilles Gargala^{a,f}, Isabelle Villena^{e,f},
Loïc Favennec^{a,f}, Rachel M. Chalmers^{c,d}

^a Centre National de Référence -Laboratoire Expert-Cryptosporidioses, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Rouen, France^b ACTALIA, Food Safety Department, 310 Rue Popielujko, 50000 Saint-Lô, France^c Cryptosporidium Reference Unit, Public Health Wales Microbiology, Singleton Hospital, Swansea SA2 8QA, UK^d Swansea University Medical School, Singleton Park, Swansea SA2 8PP, UK^e Centre National de Référence de la Toxoplasmose, Centre de Ressources Biologiques Toxoplasma, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Reims, Université de Reims, Champagne-Ardenne, EA 7510 ESCAPE, France^f UMT ACTIA PROTORISK 2 - Université de Rouen, Normandie, EA 7510 ESCAPE, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 July 2020

Received in revised form 21 September 2020

Accepted 30 September 2020

Keywords:

Cryptosporidium parvum

Spinach

Spinacia oleracea

Oocyst recovery

Modified method

ABSTRACT

Despite the infection risk associated with the consumption of contaminated food, techniques for recovering and detecting *Cryptosporidium* oocysts from fruit and vegetables are generally inadequate due to the variable recovery efficiencies and high reagent costs, such as those presented by ISO 18744:2016 "Microbiology of the food chain -Detection and enumeration of *Cryptosporidium* and *Giardia* in fresh leafy green vegetables and berry fruits". Although an improved method for recovering these parasites from Iceberg lettuce, which reported increased recovery efficiency as well as lower costs, has been published, it appears to have limitations for the recovery of *Cryptosporidium* from saponin-rich leaves such as spinach (*Spinacia oleracea*), which have previously been implicated in *Cryptosporidium parvum* outbreaks. In this study, we refined the method to improve its use with these more challenging samples. The use of alkaline elution buffer (1 M glycine) of different pH values was evaluated for their effectiveness in removing *C. parvum* from spinach leaves. The refinement of Utaaker's method showed, from spinach leaves inoculated with 100 oocysts, an increased oocyst recovery rate with an overall mean recovery rate of $33.79\% \pm 2.82\%$. The emergence of parasitic foodborne illnesses and outbreaks associated with the consumption of fresh produce demonstrates the need for the development of an optimal recovery process for parasites from suspected foods. Results showed that refinement of existing protocols could improve the retrieval of *Cryptosporidium* oocysts from these more challenging leafy greens.

© 2020 Published by Elsevier Inc. on behalf of International Association of Food and Waterborne Parasitology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Corresponding author at: Centre National de Référence Laboratoire Expert Cryptosporidioses, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Rouen, Université de Rouen, Normandie, EA 7510 ESCAPE, France.

E-mail address: Romy.razakandrainibe@univ-rouen.fr (R. Razakandrainibe).

<https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2020.e00097>

2405-6766/© 2020 Published by Elsevier Inc. on behalf of International Association of Food and Waterborne Parasitology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Consumption of fruit and vegetables is associated with a healthy lifestyle, as they support the normal functioning of different body systems. The World Health Organization (World Health Organization, 2002) estimated that worldwide, insufficient intake of fruit and vegetables is linked with around 14% of gastrointestinal cancer deaths, 11% of ischaemic heart disease deaths, about 9% of stroke deaths and that 2.6 million deaths could be averted by adequate fruit and vegetable consumption (Lock et al., 2005). Healthier lifestyles have driven changes in eating habits over the last decade, resulting in an increasing demand for leafy green vegetables and ready-to-eat (RTE) salads (Mercanoglu Taban and Halkman, 2011). An increasing number of foodborne illnesses caused by a wide range of pathogens linked to fresh vegetables have been reported (Beuchat, 1996, 2006). Protozoan parasites such as *Giardia duodenalis* (Mintz et al., 1993), *Cryptosporidium parvum* (Åberg et al., 2015; McKerr et al., 2015; Millard, 1994) and *Cyclospora cayentanensis* (Murphy et al., 2017) have caused vegetable or fruit-borne outbreaks of gastro-intestinal illness. At multiple points along the farm-to-fork production/supply chain, fresh produce is susceptible to contamination by human pathogens. Potential sources of contamination include human, livestock and wildlife faeces, soil and amendments (e.g. to improve physical properties), water used in irrigation, chemical applications, washing and processing, and pickers, handlers and food preparation workers (Julien-Javaux et al., 2019; Matthews, 2009).

Despite the health risk associated with the consumption of contaminated food, techniques for recovering *Cryptosporidium* oocysts from fruit and vegetables are generally inadequate, being laborious and time-consuming, presenting variable recovery efficiencies, and high reagent costs (Chalmers et al., 2020). One international standard method currently exists for *Cryptosporidium* in food: ISO 18744:2016 "Microbiology of the food chain — Detection and enumeration of *Cryptosporidium* and *Giardia* in fresh leafy green vegetables and berry fruits" which is largely based on methods for analysing water samples (ISO 15553:2006 and U.S. EPA Method 1623). The method is based on paddle-beating the leaves in buffer to elute the oocysts from the surface, retrieval from the resulting eluate by immunomagnetic separation (IMS), and detection by immunofluorescence microscopy (IFM). In 2015, Utaaker et al. described a cheaper modification, by maximizing the paramagnetic beads used for IMS to retrieve oocysts spiked onto Iceberg lettuce, and incorporating alternative buffer solutions (Utaaker et al., 2015).

To contribute to the design of a low cost, robust method for *Cryptosporidium* detection in food, COST Action FA1408 funded a Short-Term Scientific Mission (STSM) at the *Cryptosporidium* Reference Unit (Swansea, UK). Utaaker's method was modified and applied to a wider variety of leafy greens (see the STSM report at https://www.euro-fbp.org/uploads/6/5/9/0/65903825/stsm_report_romy_2018.pdf). However, this preliminary work showed that recovery from spinach leaves was 9%, lower than the mean of 53% (range 4% to 88%) which had been previously reported for Iceberg lettuce (Utaaker et al., 2015). While oocysts might be trapped in the stomata of spinach leaves (Macarasin et al., 2010), other factors also appeared to have influenced the poor recovery, such as foaming that occurred during processing. Chandra et al. (2014) mentioned that the foam produced during the recovery process might contribute to a loss of oocysts and we observed that fleshy leaves such as spinach produced more foam (see the STSM report at https://www.euro-fbp.org/uploads/6/5/9/0/65903825/stsm_report_romy_2018.pdf). Spinach leaves contain relatively large amounts of the surface-active glycoside saponin which has detergent properties and can cause distinctive foaming during processing. It has been reported that 1 kg of dried spinach leaves contain 100 g saponin (Cho et al., 2011) and that just 150 g fresh spinach had the equivalent haemolytic activity of 0.1 g pure saponin (Kofler, 1931). Saponins are characterized by their structure containing triterpene or steroid aglycone and one or more sugars, and may act as an anionic detergent like sodium dodecyl sulfate (SDS) which, at concentrations above 0.2% w/v has been reported to inhibit the reaction between antigen and antibody by more than 90% (Dimitriadis, 1979). These results may explain the low recovery (9%) obtained during the preliminary work, as both the oocyst recovery by IMS and detection by IFM rely on such reactions. A spiking experiment of spinach eluate (obtained from the paddle-beating step of the process), to exclude the possibility of trapping oocysts in stomata, also showed poor recovery at 13% compared to 86% from reagent grade water. These data prompted the further refinements of the Utaaker method described here to reduce the foaming and improve oocyst recovery from saponin-rich leaves (Kregiel et al., 2017). Stabilization of foams strongly depends on the intrinsic properties and concentration of the surface-active substances and the environmental conditions such as pH and temperature (Narsimhan and Xiang, 2018; Qiao et al., 2020). In this present study, influence of pH on the recovery of *Cryptosporidium* oocysts from spinach leaves were assessed by replacing the acidic 1 M glycine buffer (pH 5.5) with 1 M glycine buffer at the alkaline pH range.

2. Materials and methods

During a preliminary study, different variety of leafy greens (including spinach leaves) were spiked with approximately 100 oocysts and left to dry overnight at ambient temperature. Elution of *Cryptosporidium* oocysts was performed using 1 M glycine buffer pH 5.5. Utaaker's method was modified by reducing the elution buffer volume from 240 to 200 ml to facilitate centrifugation (see the STSM report at https://www.euro-fbp.org/uploads/6/5/9/0/65903825/stsm_report_romy_2018.pdf). Specific results from spinach leaves, during this preliminary study, were used as a control to evaluate the further refinements of Utaaker's method described in this present study.

2.1. Parasites

C. parvum oocysts were passaged in neonatal calves (INRA, Nouzilly, France) and faeces collected and stored without preservatives at 4 °C for less than 3 months until oocyst purification by IMS (Isolate®, TCS Biosciences) as per the manufacturer's instructions.

Working suspensions of oocysts were prepared by dilution in PBS to contain approximately 100 oocysts per 5 µl. The mean concentration of the working suspension was checked by spotting 5 µl suspension onto each of 10 single-welled glass microscope slides, fixing with methanol, and staining with Crypto-Cel FITC stain (TCS Biosciences) according to the manufacturer's instructions. The nuclear fluorochrome 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was also used to aid the identification of *C. parvum* oocysts. Slides were examined using an epifluorescence microscope fitted with 450–490 nm excitation and 520 nm emission filters; for DAPI observation, the excitation wavelength was changed to 330–380 nm. *Cryptosporidium* oocysts were counted under a ×20 objective.

2.2. Matrix spiking

Spinach leaves (*Spinacia oleraceae*) were purchased as sealed bags labelled “washed” or “ready-to-eat”. For sample spiking and for optimal recovery, according to Robertson and Gjerde (2001), 30 g of spinach leaves were weighed into a homogenizer bag (Bagpage R) with a filter porosity < 250 µm (Interscience) and the 5 µl spike containing 100 oocysts was deposited by spotting across the leaves. Inoculated leaves were incubated at room temperature (21 °C ± 2 °C) for 1 h and then at 4 °C overnight with the bag sealed by securing the folded openings with binder clips. Non-spiked leaves were incubated in the same way and tested as a control for natural contamination. As an oocyst recovery control, 20 ml of reverse osmosis (RO) water was spiked with 5 µl containing 100 oocysts in filter bags and processed the same way as the bags containing spinach leaves.

2.3. Recovery and isolation of *Cryptosporidium* oocysts

The method published by Utaaker et al. (2015) was used with the following modifications designed to reduce foaming and improve oocyst recovery. The 1 M glycine elution buffer (pH 5.5) was replaced with 1 M alkaline glycine-NaOH buffer at a range of pH values (pH = 7.2; 8; 8.5; 9 and 10), each tested in sextuplicate. The volume of buffer added to homogenizer bags was reduced from 200 ml to 160 ml. Bags were vigorously shaken by hand in an upside-down manner until leaves were completely wetted, before paddle-beating for 1 min. The eluate was distributed evenly between four 50 ml tubes, the bags rinsed out twice with an additional 20 ml of buffer and squeezed by hand to remove as much of the eluate as possible, which was distributed between the 50 ml tubes. Samples were centrifuged at 1550 rcf for 10 min at 4 °C and the supernatant discarded by pipetting and leaving a volume of 10 ml. Pellets were resuspended, combined in a single 50 ml tube and again subjected to centrifugation at 1550 rcf for 10 min, after which the supernatant was aspirated to a volume of 10 ml. A weak detergent solution (2 ml) containing 1% SDS (71736, Sigma-Aldrich), 0.1% Tween 80 (P1754, Sigma-Aldrich) and 0.001% antifoam Y (A5758, Sigma-Aldrich) was added, and the pellet resuspended. Antifoam Y is an aqueous emulsion of antifoam A concentrate, also known as a defoamer and more easily dispersed in aqueous systems than Antifoam A.

The total volume of suspension was adjusted to 50 ml with RO water, mixed, centrifuged as above and the supernatant discarded. The final sample, with a packed pellet volume of less than 2 ml, was resuspended in 7 ml of RO water and oocysts were recovered by IMS (Isolate®, TCS Biosciences) with the following modification to the manufacturer's instructions based on the method described by Utaaker et al. (2015). Reagent A (1000 µl) was replaced with 200 µl reagent A mixed with 800 µl of 0.05% PBS-Tween 20, 1000 µl of reagent B buffer was replaced with 200 µl of reagent B mixed with 800 µl of StabilZyme AP buffer (SM-SZ, SurModics) and only 20 µl anti-*Cryptosporidium* coated magnetic beads were used per sample.

The bead–oocyst complexes were resuspended in 50 µl 0.1 N HCl, vortexed thoroughly for 10 s to separate the oocysts from beads, incubated for 5 min at room temperature, and re-vortexed for 10 s. Beads were captured by a magnet, and oocysts in suspension transferred to single-welled glass microscope slides containing 5 µl 1.0 N NaOH. This dissociation procedure was repeated as per the manufacturer's instructions. The staining procedure, microscopic detection and oocyst enumeration were performed as described above.

2.4. Statistical analysis

The recovery rates (range, median, mean, standard deviation) obtained with the different pH buffers were compared by the Kruskal-Wallis test with Bonferroni correction for multiple testing and unpaired Student's *t*-test was used for comparison between groups using R (version 3.6.3). A *P*-value of 0.05 or less was considered significant.

3. Results and discussion

The emergence of parasitic foodborne illnesses and outbreaks associated with the consumption of fresh produce, highlights the need for validated detection methods (Chalmers et al., 2020). We used a spiking study to investigate a range of elution buffers and measures aimed to reduce foaming and improve oocyst recovery from spinach leaves. For spiking studies, guidance is being developed for standardisation of incubation conditions (Chalmers et al., in preparation). While Robertson and Gjerde

Table 1Comparison of oocyst recovery efficiencies from spinach leaves seeded with 100 *Cryptosporidium* oocysts using 1 M glycine buffers of different pH values.

Buffer	Mean % ($\pm$ SD)	Range	P-value
pH 5.5 (n = 2)	6.5 (3.53)	4–9	–
pH 7.2 (n = 6)	33.33 (6.05)	27–44	<0.001
pH 8 (n = 6)	36.33 (5.53)	30–43	<0.001
pH 8.5 (n = 6)	30.00 (6.87)	21–38	<0.001
pH 10 (n = 6)	35.50 (5.20)	29–40	<0.001

(2000, 2001) mention 1 h, Utaaker et al. (2015) opted for at least 5 h or overnight at ambient temperature, and the US Food and Drug Administration suggested longer time under refrigerated conditions (U.S. Food and Drug Administration, Office of Foods, 2019). In the current study, instead of letting the samples dry overnight at ambient temperature, inoculated spinach leaves were kept at room temperature ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) for an hour to dry and then stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight, replicating the normal storage conditions for these food products, before testing the recovery efficiency.

The recovery rates using different pH buffers are shown in Table 1. No natural occurrence of *Cryptosporidium* oocyst contamination was detected in any spinach samples, as all non-spiked leaves were negative. The highest mean recovery rate was obtained using buffer at pH 8 but this was not significantly different from the baseline (pH 7.2).

Recovery of *Cryptosporidium* from spiked water resulted in a mean recovery of $91.25 \pm 2.21\%$. These data highlight the effect of the matrix and its impact on the recovery rate. Indeed, the difference between the spinach leaves and the water matrix recovery rate was highly significant ($P = 0.013$). Reduced foam formation during the elution process was observed in bags containing alkaline buffer (Fig. 1 right), compared to those using acidic buffer (Fig. 1 left).

Although data from this study indicate no significant differences between the recovery rate among alkaline 1 M glycine buffer solutions ($P = 0.384$), compared to the preliminary research using pH 5.5, the recovery efficiencies were significantly improved ($P < 0.001$) (Fig. 2).

In addition to the composition of wash solutions, differences in food matrices and the surface morphology could influence the oocysts adherence, which can affect the efficacies of the removal process (Chandra et al., 2014). Macarasin et al. (2010) reported that *Cryptosporidium* oocysts were capable of firmly adhering to spinach leaves after being sprayed with a spiking suspension (1000 *C. parvum* oocysts/ml) and were also internalized within the stomata. They also stated that prolonged and intensive washing of spinach roots and leaves in an elution buffer developed and recommended for testing fresh produce for *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* contamination was unable to dislodge all oocysts. Stomata crucially permit plants to regulate transpirational water loss from leaves during the uptake of CO_2 for photosynthesis. Oocyst recovery may be influenced by stomata behaviour (opening and closing the stomata), and this might be different between types of leaves. Temperature is one of the most variable factors in the environment, and it affects many plant physiological processes, yet little is known about its effect on stomatal behaviour. However, studies provided conflicting results. While some evidence suggested that stomata opening increased with increasing temperature (Lu et al., 2000; Mott and Peak, 2010), other studies found that temperature had no effect on stomata (Cerasoli et al., 2014; von Caemmerer and Evans, 2015), or that increased temperature triggered stomatal closure. Further research should focus on verifying these results in a controlled environmental condition as well as discovering the principles of temperature dependency of stomatal regulation. In Winter Spinach, stomata are large with an elliptical shape, and the average number is more than $100/\text{mm}^2$ of the leaf surface. In contrast, other lettuce, such as the butterhead

**Fig. 1.** Effect of glycine buffer pH on foam formation with spinach leaves during the elution process.

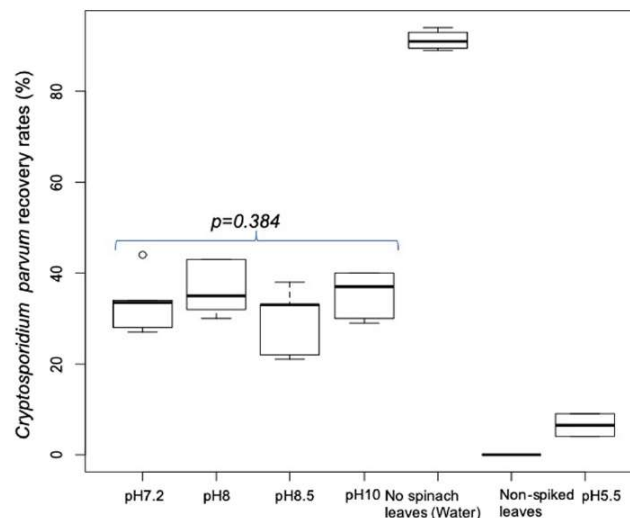


Fig. 2. Boxplot distribution of *C. parvum* recovery with buffers of different pH. In each boxplot, the solid horizontal line denotes the median value, while the upper and lower edges of the boxes represent the.

lettuce (belonging to the same complex “*Lactuca sativa*” as the Iceberg lettuce), has smaller stomata and the density is lower (<50/mm²) (Lawson, 2014).

The results obtained in this study from spiking experiments showed significantly improved recovery from spinach leaves, using the alkaline 1 M glycine buffer. Further refinement of the elution buffer may yet show additional improvements in the sensitivity of detection of *Cryptosporidium* from leaves with different characteristics. Each leafy green with a potential to be associated with foodborne outbreaks has their own characteristics and chemical compositions (lipids, saponins). Therefore, more studies are needed to determine the recovery efficiencies from other leafy green matrices.

Funding

This article is based upon work conducted during a short-term scientific mission as part of COST Action FA1408 - A European Network for Foodborne Parasites in Europe (Euro-FBP), supported by COST (European Cooperation in Science and Technology; www.cost.eu).

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- Åberg, R., Sjöman, M., Hemminki, K., Pirnes, A., Räsänen, S., Kalanti, A., Pohjanvirta, T., Caccio, 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 (8), 618–624. <https://doi.org/10.1111/zph.12190>.
- Beuchat, L.R., 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *J. Food Prot.* 59 (2), 204–216. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.2.204>.
- Beuchat, L.R., 2006. Vectors and conditions for preharvest contamination of fruits and vegetables with pathogens capable of causing enteric diseases. *Br. Food J.* 108 (1), 38–53. <https://doi.org/10.1108/00070700610637625>.
- Cerasoli, S., Wertin, T., McGuire, M.A., Rodrigues, A., Aubrey, D.P., Pereira, J.S., Teskey, R.O., 2014. Poplar saplings exposed to recurring temperature shifts of different amplitude exhibit differences in leaf gas exchange and growth despite equal mean temperature. *AoB Plants* 6. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plu018>.
- Chalmers, R.M., Robertson, L.J., Dorny, P., Jordan, S., Kärssin, A., Katzer, F., La Carbona, S., Lalle, M., Lassen, B., Mladineo, I., Rozycki, M., Bilka-Zajac, E., Schares, G., Mayer-Scholl, A., Trevisan, C., Tysnes, K., Vasilev, S., Klotz, C., 2020. Parasite detection in food: current status and future needs for validation. *Trends Food Sci. Technol.* 99, 337–350. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.011>.
- Chandra, V., Torres, M., Ortega, Y.R., 2014. Efficacy of wash solutions in recovering *Cyclospora cayentanensis*, *Cryptosporidium parvum*, and *Toxoplasma gondii* from basil. *J. Food Prot.* 77 (8), 1348–1354. <https://doi.org/10.4315/0362-028XJFP-13-381>.
- Cho, H.-J., Choi, S.-A., Kim, C.-G., Jung, T.-S., Hong, J.-H., Rhee, M.-H., Park, H.-J., Park, H.-J., 2011. Spinach saponin-enriched fraction inhibits platelet aggregation in cAMP- and cGMP-dependent manner by decreasing TXA₂ production and blood coagulation. *Biomol. Ther.* 19 (2), 218–223. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2011.19.2.218>.
- Dimitriadis, G.J., 1979. Effect of detergents on antibody-antigen interaction. *Anal. Biochem.* 98 (2), 445–451. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90165-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90165-9).
- Julien-Javaux, F., Gérard, C., Campagnoli, M., Zuber, S., 2019. Strategies for the safety management of fresh produce from farm to fork. *Curr. Opin. Food Sci.* 27, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.01.004>.
- Kofler, L., 1931. Action of saponin in spinach. *Wien. Klin. Wochenschr.* 852–855.
- Kregiel, D., Berłowska, J., Witonska, I., Antolak, H., Proestos, C., Babic, M., Babic, L., Zhang, B., 2017. Saponin-based, biological-active surfactants from plants. In: Najjar, R. (Ed.), *Application and Characterization of Surfactants*. InTech <https://doi.org/10.5772/68062>.
- Lawson, P., 2014. Development and Evaluation of Iodine Biofortification Strategies for Vegetables. University of Osnabrück-Germany.

- Lock, K., Pomerleau, Joceline, Causer, Louise, Altmann, Dan, McKee, Martin, 2005. The global burden of disease attributable to low consumption of fruit and vegetables: implications for the global strategy on diet. *Bull. World Health Organ.* 100–108.
- Lu, Z., Quiñones, M.A., Zeiger, E., 2000. Temperature dependence of guard cell respiration and stomatal conductance co-segregate in an F2 population of Pima cotton. *Funct. Plant Biol.* 27 (5), 457. <https://doi.org/10.1071/PP98128>.
- Macarasin, D., Bauman, G., Fayer, R., 2010. *Spinacia oleracea* L. leaf stomata harboring *Cryptosporidium parvum* oocysts: a potential threat to food safety. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (2), 555–559. <https://doi.org/10.1128/AEM.02118-09>.
- Matthews, K.R., 2009. Leafy vegetables. The Produce Contamination Problem. Elsevier, pp. 165–187 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374186-8.00008-2>.
- 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 (5), e0125955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125955>.
- Mercanoglu Taban, B., Halkman, A.K., 2011. Do leafy green vegetables and their ready-to-eat [RTE] salads carry a risk of foodborne pathogens? *Anaerobe* 17 (6), 286–287. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.04.004>.
- Millard, P.S., 1994. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. *JAMA* 272 (20), 1592. <https://doi.org/10.1001/jama.1994.03520200048034>.
- Mintz, E.D., Wragg, M.H., Mshar, P., Cartter, M.L., Hadler, J.L., 1993. Foodborne giardiasis in a corporate office setting. *J. Infect. Dis.* 167 (1), 250–253. <https://doi.org/10.1093/infdis/167.1.250>.
- Mott, K.A., Peak, D., 2010. Stomatal responses to humidity and temperature in darkness. *Plant Cell Environ.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02129.x>.
- Murphy, H.R., Lee, S., da Silva, A.J., 2017. Evaluation of an improved U.S. Food and Drug Administration method for the detection of *Cyclospora cayentanensis* in produce using real-time PCR. *J. Food Prot.* 80 (7), 1133–1144. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-492>.
- Narsimhan, G., Xiang, N., 2018. Role of proteins on formation, drainage, and stability of liquid food foams. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 9 (1), 45–63. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-030009>.
- Qiao, X., Miller, R., Schneck, E., Sun, K., 2020. Influence of pH on the surface and foaming properties of aqueous silk fibroin solutions. *Soft Matter* 16 (15), 3695–3704. <https://doi.org/10.1039/C9SM02372K>.
- Robertson, L.J., Gjerde, B., 2000. Isolation and enumeration of giardia cysts, *Cryptosporidium* oocysts, and ascaris eggs from fruits and vegetables. *J. Food Prot.* 63 (6), 775–778. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.6.775>.
- Robertson, L.J., Gjerde, B., 2001. Factors affecting recovery efficiency in isolation of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from vegetables for standard method development. *J. Food Prot.* 64 (11), 1799–1805. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.11.1799>.
- U.S. Food and Drug Administration, Office of Foods, 2019. Guidelines for the validation of analytical methods for the detection of microbial pathogens in foods and feeds, edition 3.0. <https://www.fda.gov/media/83812/download>.
- Utaaker, K.S., Huang, Q., Robertson, L.J., 2015. A reduced-cost approach for analyzing fresh produce for contamination with *Cryptosporidium* oocysts and/or *Giardia* cysts. *Food Res. Int.* 77, 326–332. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.010>.
- von Caemmerer, S., Evans, J.R., 2015. Temperature responses of mesophyll conductance differ greatly between species: temperature responses of mesophyll conductance. *Plant Cell Environ.* 38 (4), 629–637. <https://doi.org/10.1111/pce.12449>.
- World Health Organization, 2002. Resolution WHA55.23. Diet, physical activity and health. Fifty-fifth World Health Assembly, Geneva, 13–18 May 2002. (document WHA55/2002/REC/1:28-30) https://apps.who.int/gb/archive/pdf_files/WHA55/ewha5523.pdf?ua=1.

Annexe 3 : Survie des oocystes de *C. parvum* en condition témoin, lors de la croissance de la mâche.

	J ₁	J ₈	J ₁₅	J ₂₂	J ₂₉	J ₃₆	J ₄₃	J ₅₀	J ₅₇
Nombre de lot	3	3	2	2	2	3	3	2	2
Reproductibilité	4	4	3	3	2	3	3	2	2
Répétabilité	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Présence de parasites infectieux (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>p</i> -value	1	0,83	0,51	0,51	0,16	0,51	0,51	0,16	0,51
Cq +HCT-8	27,32	27,05	27,02	27,86	28,28	27,12	26,91	27,49	27,04
ET + HCT-8	0,79	0,76	0,28	0,54	0,50	0,85	1,17	0,22	0,37
Cq -HCT-8	33,63	33,64	33,22	33,33	33,87	33,63	33,65	33,87	33,85
ET -HCT-8	0,97	0,65	1,76	0,55	0,94	0,38	0,52	0,94	0,83

Une cinétique d'incubation d'oocystes de *C. parvum* conservés dans du PBS, dans les mêmes conditions que la culture de la mâche a été réalisée pendant deux mois. Chaque semaine, l'infectiosité des oocystes a été évaluée par la méthode CC-qPCR. La présence de parasites infectieux est estimée par calcul du ΔCq ($\Delta Cq \geq 1$: parasites infectieux).

Annexe 4 : Survie des oocystes de *C. parvum* en suspension et récupérés de la mâche après incubation à température ambiante.

	En suspension	Récupérés de la mâche
Nombre de lot	1	1
Reproductibilité	1	1
Répétabilité	3	3
Présence de parasites infectieux (%)	100	0
<i>p</i> -value	1	< 0,01
Cq +HCT-8	26,71	36,05
ET + HCT-8	0,11	0,57
Cq -HCT-8	32,77	35,99
ET -HCT-8	0,49	0,00

Les oocystes ont été inoculés à la surface de la mâche ou conservés dans du PBS. Après incubation à température ambiante pendant 12h, l'infectiosité des oocystes a été évaluée par la méthode CC-qPCR. La présence de parasites infectieux est estimée par la valeur du ΔCq ($\Delta Cq \geq 1$: parasites infectieux).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abd-Ella, O.H., 2014. Diagnosis and treatment of cryptosporidiosis: an update review. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 44, 455–466.
- Ahmad, S.O., El Fadaly, H.A., Mona, S.Z., Barakat, A.M.A., 2016. Incidence of zoonotic parasites in egyptian raw vegetable salads. *Life Sciences*. 13.
- Alcock, F., Webb, C.T., Dolezal, P., Hewitt, V., Shingu-Vasquez, M., Likić, V.A., Traven, A., Lithgow, T., 2012. A small tim homohexamer in the relict mitochondrion of *Cryptosporidium*. *Mol. Biol. Evol.* 29, 113–122.
- Aldeyarbi, H.M., Karanis, P., 2016. The fine structure of sexual stage development and sporogony of *Cryptosporidium parvum* in cell-free culture. *Parasitology*. 143, 749–761.
- Alemu, G., Mama, M., Misker, D., Haftu, D., 2019. Parasitic contamination of vegetables marketed in Arba Minch town, southern Ethiopia. *BMC Infectious Diseases*. 19, 410.
- Alvarez-Pellitero, P., Quiroga, M.I., Sitjà-Bobadilla, A., Redondo, M.J., Palenzuela, O., Padrós, F., Vázquez, S., Nieto, J.M., 2004. *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Dis. Aquat. Org.* 62, 133–145.
- Alvarez-Pellitero, P., Sitjà-Bobadilla, A., 2002. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *Int. J. Parasitol.* 32, 1007–1021.
- Amadi, B., Mwiya, M., Musuku, J., Watuka, A., Sianongo, S., Ayoub, A., Kelly, P., 2002. Effect of nitazoxanide on morbidity and mortality in Zambian children with cryptosporidiosis: a randomised controlled trial. *Lancet*. 360, 1375–1380.
- Amorós, I., Alonso, J.L., Cuesta, G., 2010. *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts on salad products irrigated with contaminated water. *J. Food Prot.* 73, 1138–1140.
- ANOFEL, Houzé, S., Botterel-Chartier, F., 2018. Parasitologie et mycologie médicales - Guide des analyses et des pratiques diagnostiques, Elsevier Masson.
- ANSES, 2017. Traitement des eaux de distribution publique | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.
- ANSES, 2020. Le Paquet hygiène | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

- Arockia Jeyaprakash, A., Katiyar, S., Swaminathan, C.P., Sekar, K., Surolia, A., Vijayan, M., 2003. Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin: an x-ray and modeling study. *J. Mol. Biol.* 332, 217–228.
- Arrowood, M.J., Sterling, C.R., 1987. Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *J. Parasitol.* 73, 314–319.
- Avazpoor, M., Yousefipoor, M., Dusty, M., Mehdipour, M., Seifipour, F., Gholami, Z., 2015. Determination of the level of parasitic infection (*Cryptosporidium* and *Giardia*) of the vegetables marketed in Ilam city. *Environ. Eng. Manag. J.* 2, 37-40.
- Bailenger, J., 1966. Les méthodes diphasiques de concentration parasitaire en coprologie. *Annales de Parasitologie.* 41.
- Baishanbo, A., Gargala, G., Delaunay, A., François, A., Ballet, J.-J., Favenec, L., 2005. Infectivity of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* Genotype 2 Isolates in Immunosuppressed Mongolian Gerbils. *Infect. Immun.* 73, 5252–5255.
- Belli, S.I., Smith, N.C., Ferguson, D.J.P., 2006. The coccidian oocyst: a tough nut to crack! *Trends Parasitol.* 22, 416–423.
- Ben-Yehoshua, S., Beaudry, R., Fishman, S., Jayanty, S., Mir, N., 2005. 4 Modified Atmosphere Packaging and Controlled Atmosphere Storage. *Environmentally Friendly Technologies for Agricultural Produce Quality.* 61-112.
- Bhadauria, D., Goel, A., Kaul, A., Sharma, R.K., Gupta, A., Ruhela, V., Gupta, A., Vardhan, H., Prasad, N., 2015. *Cryptosporidium* infection after renal transplantation in an endemic area. *Transpl. Infect. Dis.* 17, 48–55.
- Bhat, N., Joe, A., PereiraPerrin, M., Ward, H.D., 2007. *Cryptosporidium* p30, a galactose/N-acetylgalactosamine-specific lectin, mediates infection *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 282, 34877–34887.
- Blackburn, B.G., Mazurek, J.M., Hlavsa, M., Park, J., Tillapaw, M., Parrish, M., Salehi, E., Franks, W., Koch, E., Smith, F., Xiao, L., Arrowood, M., Hill, V., da Silva, A., Johnston, S., Jones, J.L., 2006. Cryptosporidiosis associated with ozonated apple cider. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 684–686.
- Bohaychuk, V.M., Bradbury, R.W., Dimock, R., Fehr, M., Gensler, G., King, R., Rieve, R., Romero Barrios, P., 2009. A microbiological survey of selected Alberta-grown fresh produce from farmers' markets in Alberta, Canada. *J. Food. Prot.* 72, 415–20.

- Bouzid, M., Hunter, P.R., Chalmers, R.M., Tyler, K.M., 2013. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 115–134.
- Brush, C.F., Walter, M.F., Anguish, L.J., Ghiorse, W.C., 1998. Influence of pretreatment and experimental conditions on electrophoretic mobility and hydrophobicity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4439–4445.
- Cacciò, S.M., Chalmers, R.M., 2016. Human cryptosporidiosis in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 471–480.
- Calderaro, A., Montecchini, S., Gorrini, C., Dettori, G., Chezzi, C., 2011. Similar diagnostic performances of antigen detection and nucleic acid detection of *Cryptosporidium* spp. in a low-prevalence setting. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 70, 72–77.
- Call, S.A., Heudebert, G., Saag, M., Wilcox, C.M., 2000. The changing etiology of chronic diarrhea in HIV-infected patients with CD4 cell counts less than 200 cells/mm³. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 3142–3146.
- Cama, V.A., Ross, J.M., Crawford, S., Kawai, V., Chavez-Valdez, R., Vargas, D., Vivar, A., Ticona, E., Ñavincopa, M., Williamson, J., Ortega, Y., Gilman, R.H., Bern, C., Xiao, L., 2007. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *J. Infect. Dis.* 196, 684–691.
- Caradonna, T., Marangi, M., Del Chierico, F., Ferrari, N., Reddel, S., Bracaglia, G., Normanno, G., Putignani, L., Giangaspero, A., 2017. Detection and prevalence of protozoan parasites in ready-to-eat packaged salads on sale in Italy. *Food Microbiol.* 67, 67–75.
- Castro-Hermida, J.A., Pors, I., Méndez-Hermida, F., Ares-Mazás, E., Chartier, C., 2006. Evaluation of two commercial disinfectants on the viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Vet. J.* 171, 340–345.
- Chalmers, Rachel M., Campbell, B.M., Crouch, N., Charlett, A., Davies, A.P., 2011b. Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven *Cryptosporidium* assays used in the UK. *J. Med. Microbiol.* 60, 1598–1604.
- Chalmers, R.M., Davies, A.P., 2010. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Exp. Parasitol.* 124, 138–146.
- Chalmers, R. M., Smith, R., Elwin, K., Clifton-Hadley, F.A., Giles, M., 2011a. Epidemiology of anthroponotic and zoonotic human cryptosporidiosis in England and Wales, 2004–2006. *Epidemiol. Infect.* 139, 700–712.

- Chambres d'agriculture Pays de la Loire, 2016. Etat des lieux de la filière légumière en Pays de la Loire.
- Chappell, C.L., Okhuysen, P.C., Langer-Curry, R., Widmer, G., Akiyoshi, D.E., Tanriverdi, S., Tzipori, S., 2006. *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 851–857.
- Chappell, C. L., Okhuysen, P. C., Sterling, C. R., Wang, C., Jakubowski, W. et Dupont, H. L. 1999. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy adults with pre-existing anti-*C. parvum* serum immunoglobulin G. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60, 157-64.
- Chartier, C., Mallereau-Pellet, M., Mancassola, R., Nussbaum, D., 2002. Détection des oocystes de *Cryptosporidium* dans les fèces de caprins : comparaison entre un test d'agglutination au latex et trois autres techniques conventionnelles. *Vet. Res.* 33, 169-177.
- Chau, H.L.Q., Thong, H.T., Chao, N.V., Hung, P.H.S., Hai, V.V., An, L.V., Fujieda, A., Ueru, T., Akamatsu, M., 2014. Microbial and parasitic contamination on fresh vegetables sold in traditional markets in Hue city, Vietnam. *J. Food. Nutri. Res.* 2, 959-964.
- Checkley, W., White, A.C., Jaganath, D., Arrowood, M.J., Chalmers, R.M., Chen, X.-M., Fayer, R., Griffiths, J.K., Guerrant, R.L., Hedstrom, L., Huston, C.D., Kotloff, K.L., Kang, G., Mead, J.R., Miller, M., Petri, W.A., Priest, J.W., Roos, D.S., Striepen, B., Thompson, R.C.A., Ward, H.D., Voorhis, W.A.V., Xiao, L., Zhu, G., Houpt, E.R., 2015. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *Lancet Infect. Dis.* 15, 85–94.
- Chen, W., Harp, J.A., Harmsen, A.G., 2003. *Cryptosporidium parvum* infection in gene-targeted B cell-deficient mice. *J. Parasitol.* 89, 391–393.
- Chen, X.-M., Keithly, J.S., Paya, C.V., LaRusso, N.F., 2002. Cryptosporidiosis. *N. Engl. J. Med.* 346, 1723–1731.
- Cioci, G., 2006. Etude structure-fonction de glycoconjugués et de lectines bactériennes et fongiques (Biologie structurale et fonctionnelle). Joseph Fourier.
- Clancy, J.L., Bukhari, Z., Hargy, T.M., Bolton, J.R., Dussert, B.W., Marshall, M.M., 2000. Using UV to inactivate *Cryptosporidium*. *Journal AWWA.* 92, 97–104.
- Collins, M.V., Flixk, G.J., Smith, S.A., Fayer, R., Rubendall, E., Lindsay, D.S., 2005a. The effects of e-beam irradiation and microwave energy on eastern oysters (*Crassostrea virginica*) experimentally infected with *Cryptosporidium parvum*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52, 484-488.

Collins, M.V., Flick, G.J., Smith, S.A., Fayer, R., Croonenberghs, R., O’Keefe, S., Lindasay, D.S., 2005b. The effect of high-pressure processing on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from experimentally exposed Eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Eukaryot. Microbiol.* 52, 500-504.

Cook, N., Nichols, R.A.B., Wilkinson, N., Paton, C.A., Barker, K., Smith, H.V., 2007. Development of a method for detection of *Giardia duodenalis* cysts on lettuce and for simultaneous analysis of salad products for the presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7388–7391.

Cook, N., Paton, C.A., Wilkinson, N., Nichols, R. a. B., Barker, K., Smith, H.V., 2006. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 1: development and optimization of methods. *Int. J. Food Microbiol.* 109, 215–221.

Costa, D., Razakandrainibe, R., Sautour, M., Valot, S., Basmaciyan, L., Gargala, G., Favennec, L., Dalle, F., Debourgogne, A., Angoulvant, A., Agnamey, P., Bonhomme, J., Degeilh, B., Chemla, C., Garnaud, C., Lollivier, C., Angebault, C., Delaunay, P., Desoubieux, G., Frealle, E., Grenouillet, F., Morio, F., Botterel, F., Belkadi, G., Yera, H., Nevez, G., Iriart, X., Accoceberry, I., Brunet, J., Thellier, M., Lemeteil, D., Rabodonirina, M., Sasso, M., Miossec, C., Nicolas, M., Desbois, N., Poirier, P., Pomares, C., Houzé, S., Govic, Y.L., Bellanger, A.P., Labbe, F., Dardé, M.L., Duquesnoy, O., Flori, P., Bastien, P., Gueudet, T., Villena, I., Aubert, D., Cateau, E., Bougnoux, M.-E., Kapel, N., Dannaoui, E., Valentin, A., Totet, A., Menotti, J., Blanchet, D., Demar, M., Dutoit, E., Piarroux, R., Sitterlé, E., Magne, D., Hamane, S., Berry, A., Ramade, C., 2018. Human cryptosporidiosis in immunodeficient patients in France (2015–2017). *Exp. Parasitol.* 192, 108.

Costa, D., Razakandrainibe, R., Valot, S., Vannier, M., Sautour, M., Basmaciyan, L., Gargala, G., Viller, V., Lemeteil, D., Ballet, J.-J., French National Network on Surveillance of Human Cryptosporidiosis, Dalle, F., Favennec, L., 2020. Epidemiology of Cryptosporidiosis in France from 2017 to 2019. *Microorganisms.* 8, 1358.

Craun, G.F., Calderon, R.L., Craun, M.F., 2005. Outbreaks associated with recreational water in the United States. *Int. J. Environ. Health Res.* 15, 243–262.

CTIFL, 2010. Guide de Bonnes Pratiques d'Hygiène Fruits et légumes frais non transformés. *Interfel.*

CTIFL, 2018. Guide de Bonnes Pratiques d'Hygiène Végétaux crus prêts à l'emploi. *Interfel.*

- Current, W.L., Upton, S.J., Haynes, T.B., 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *J. Protozool.* 33, 289–296.
- Dawson, D., 2005. Foodborne protozoan parasites. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 207–227.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4315–4317.
- Dellamonica, P., 2003. Diarrhées et infection à VIH. *Med. Mal. Infect.* 33, 105–110.
- Delling, C., Lendner, M., Müller, U., Dauschies, A., 2017. Improvement of *in vitro* evaluation of chemical disinfectants for efficacy on *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Vet. Parasitol.* 245, 5–13.
- Divoux, E., Szajner, S., Moal, G.L., Venisse, N., Faucher-Grassin, J., Dupuis, A., 2016. Mise au point sur le traitement de la cryptosporidiose : intérêt du nitazoxanide Focus on cryptosporidiosis treatment: place of nitazoxanid. undefined.
- Dixon, B., Parrington, L., Cook, A., Pollari, F., Farber, J., 2013. Detection of *Cyclospora*, *Cryptosporidium*, and *Giardia* in ready-to-eat packaged leafy greens in Ontario, Canada. *J. Food Prot.* 76, 307–313.
- Dong, S., Yang, Ya, Wang, Y., Yang, D., Yang, Yu, Shi, Y., Li, C., Li, L., Chen, Y., Jiang, Q., Zhou, Y., 2020. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in the global population: A systematic review and meta-analysis. *Acta. Parasit.* 65, 882–889.
- Drozd, C., Schwartzbrod, J., 1996. Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of *Cryptosporidium parvum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1227–1232.
- Duedu, K.O., Yarnie, E.A., Tetteh-Quarcoo, P.B., Attah, S.K., Donkor, E.S., Ayeh-Kumi, P.F., 2014. A comparative survey of the prevalence of human parasites found in fresh vegetables sold in supermarkets and open-aiared markets in Accra, Ghana. *BMC Research Notes.* 7, 836.
- Duhain, G.L.M.C., Minnaar, A., Buys, E.M., 2012. Effect of chlorine, blanching, freezing, and microwave heating on *Cryptosporidium parvum* viability inoculated on green peppers. *J. Food Prot.* 75, 936–941.
- Dziedzinska, R., Vasickova, P., Hrdy, J., Slany, M., Babak, V., 2018. Foodborne bacterial, viral, and protozoan pathogens in field and market strawberries and environment of strawberry farms. *J. Food Sci.* 83, 3069-3075.

- ECDC, 2019. Cryptosporidiosis - Annual Epidemiological Report for 2017.
- EFSA & ECDC, 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 19, e06406.
- EFSA & ECDC, 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 17, e05926.
- EFSA & ECDC, 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal* 16, e05500.
- 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, e05077.
- EFSA & ECDC, 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal* 14, e04634.
- EFSA & ECDC, 2015a. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 13, 3991.
- EFSA & ECDC, 2015b. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 13, 4329.
- EFSA & ECDC, 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 12, 3547.
- EFSA & ECDC, 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 11, 3129.
- EFSA & ECDC, 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal* 10, 2597.
- El-Sherbini, G., Kamel, N., Geneedy, M., Temsah, A., 2016. A comparative study of the occurrence of *Cryptosporidium parvum* oocysts found on fresh fruits and vegetables sold in supermarkets and open-aired markets. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 5, 760-768.
- Elwin, K., Hadfield, S.J., Robinson, G., Crouch, N.D., Chalmers, R.M., 2012. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the indian subcontinent, 2007–2011. *Int. J. Parasitol.* 42, 675–682.
- Fayer, R., 1995. Effect of sodium hypochlorite exposure on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts for neonatal BALB/c mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 844–846.

- Fayer, R., 1994. Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2732–2735.
- Fayer, R., Nerad, T., 1996. Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1431–1433.
- Fayer, R., Orlandi, P., Perdue, M.L., 2009. Virulence factor activity relationships for hepatitis E and *Cryptosporidium*. *J. Water Health.* 7, S55–S63.
- Fayer, R., Santín, M., 2009. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Vet. Parasitol.* 164, 192–200.
- Fayer, R., Santín, M., Macarisin, D., 2010. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet. Parasitol.* 172, 23–32.
- Fayer, R., Santín, M., Trout, J.M., 2008. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet. Parasitol.* 156, 191–198.
- Fayer, R., Santín, M., Xiao, L., 2005. *Cryptosporidium bovis* N. Sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J. Parasitol.* 91, 624–629.
- Fayer, R., Trout, J.M., Xiao, L., Morgan, U.M., Lal, A.A., Dubey, J.P., 2001. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J. Parasitol.* 87, 1415–1422.
- Fontaine, M., Guillot, E., 2002. Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 214, 13–17.
- Fournet, N., Deege, M.P., Urbanus, A.T., Nichols, G., Rosner, B.M., Chalmers, R.M., Gorton, R., Pollock, K.G., van der Giessen, J.W., Wever, P.C., Dorigo-Zetsma, J.W., Mulder, B., Mank, T.G., Overdevest, I., Kusters, J.G., van Pelt, W., Kortbeek, L.M., 2013. Simultaneous increase of *Cryptosporidium* infections in the Netherlands, the United Kingdom and Germany in late summer season, 2012. *Euro. Surveill.* 18.
- Freyre, A., Falcón, J., 2004. Massive excystation of *Toxoplasma gondii* sporozoites. *Exp. Parasitol.* 107, 72–77.
- Garcia, L.S., Current, W.L., 1989. Cryptosporidiosis: clinical features and diagnosis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 27, 439–460.
- Gargala, G., Delaunay, A., Li, X., Brasseur, P., Favennec, L., Ballet, J.J., 2000. Efficacy of nitazoxanide, tizoxanide and tizoxanide glucuronide against *Cryptosporidium parvum*

development in sporozoite-infected HCT-8 enterocytic cells. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 57–60.

Gérard, D., Franssen, F., La Carbona, S., Monteiro, S., Cozma-Petrut, A., Utaaker, K., Rezek Jambrak, A., Rowan, N., Rodriguez-Laz, D., Nasser, A., Tysnes, K., Robertson, L.J., 2019. Inactivation of parasite transmission stages: efficacy of treatments on foods of non-animal origin. *Trends Food Sci. Technol.* 91, 12-23.

Glowacz, M., Rees, D., 2016. The practicality of using ozone with fruit and vegetables. *J. Sci. Food Agric.* 96, 4637-4643.

Gold, D., Stein, B., Tzipori, S., 2001. The utilization of sodium taurocholate in excystation of *Cryptosporidium parvum* and infection of tissue culture. *J. Parasitol.* 87, 997–1000.

Gomez-Couso, H., Mendez-Hermida, F., Castro-Hermida, J.A., Ares-Mazas, E., 2006. Cooking mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by steam does not destroy the infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *J. Food Prot.* 69, 948-950.

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. *Parasitol. Res.* 100, 247–253.

Guiguet Leal, D.A., Pereira, M.A., Bueno Franco, R.M., Branco, N., Neto, R., 2008. First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and cockles (*Tivela mactroides*) in Brazil. *J. Water Health.* 6, 527–532.

Gullino, M.L., Gilardi, G., Garibaldi, A., 2019. Ready-to eat salad crops: a plant pathogen's heaven. *Plant Dis.* 103, 2153–2170.

Guyot, K., Sarfati, C., Derouin, F., 2012. Actualités sur l'épidémiologie et le diagnostic de la cryptosporidiose. *Feuillet de Biologie*, 9.

Guzel-Seydim, Z.B., Greene, A.K., Seydim, A.C., 2004. Use of ozone in the food industry. *LWT.* 37, 453–460.

Hanes, D.E., Worobo, R.W., Orlandi, P.A., Burr, D.H., Miliotis, M.D., Robl, M.G., Bier, J.W., Arrowood, M.J., Churey, J.J., Jackson, G.J., 2002. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in fresh apple cider by UV irradiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4168-4172.

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. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2866–2868.

- Hashim, A., Mulcahy, G., Bourke, B., Clyne, M., 2006. Interaction of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* with primary human and bovine intestinal cells. *Infect. Immun.* 74, 99–107.
- 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. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 64, 668–672.
- HM.Clause, 2015. L'innovation en toute confiance.
- Hohweyer, J., Cazeaux, C., Travaillé, E., Languet, E., Dumètre, A., Aubert, D., Terryn, C., Dubey, J.P., Azas, N., Houssin, M., Loïc, F., Villena, I., La Carbona, S., 2016. Simultaneous detection of the protozoan parasites *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* and *Giardia* in food matrices and their persistence on basil leaves. *Food Microbiol.* 57, 36–44.
- Hong, S., Kim, K., Yoon, S., Park, W.-Y., Sim, S., Yu, J.-R., 2014. Detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental soil and vegetables. *J. Korean Med. Sci.* 29, 1367–1371.
- Hoover, D.M., Hoerr, F.J., Carlton, W.W., Hinsman, E.J., Ferguson, H.W., 1981. Enteric cryptosporidiosis in a naso tang, *Naso lituratus* bloch and schneider. *J. Fish Dis.* 4, 425–428.
- Huang, J., Xu, Z., Wang, D., Ogata, C.M., Palczewski, K., Lee, X., Young, N.M., 2010. Characterization of the secondary binding sites of *Maclura pomifera* agglutinin by glycan array and crystallographic analyses. *Glycobiology.* 20, 1643–1653.
- Hunter, P.R., Nichols, G., 2002. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 145–154.
- Huvarova, V., Kralik, P., Vasickova, P., Kubankova, M., Verbikoca, V., Slany, M., Babak, V., Moravkova, M., 2018. Tracing of selected viral, bacterial, and parasitic agents on vegetables and herbs originating from farms and markets. *J. Food Sci.* 83, 3044–3053.
- Imberty, A., Gautier, C., Lescar, J., Pérez, S., Wyns, L., Loris, R., 2000. An unusual carbohydrate binding site revealed by the structures of two *Maackia amurensis* lectins complexed with sialic acid-containing oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 275, 17541–17548.
- Inman, L.R., Takeuchi, A., 1979. Spontaneous Cryptosporidiosis in an adult female rabbit. *Vet. Pathol.* 16, 89–95.
- Interfel, La mâche : présentation, production, consommation - Les fruits et légumes frais.

- Iseki, M., 1979. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *JPN J. Parasitol.*
- Janjaroen, D., Liu, Y., Kuhlenschmidt, M., Kuhlenschmidt, T., Nguyen, T., 2010. Role of divalent cations on deposition of *Cryptosporidium parvum* oocysts on natural organic matter surfaces. *Environ. Sci. Technol.* 44, 4519–24.
- Jenkins, M.B., Eaglesham, B.S., Anthony, L.C., Kachlany, S.C., Bowman, D.D., Ghiorse, W.C., 2010. Significance of wall structure, macromolecular composition, and surface polymers to the survival and transport of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1926–1934.
- Jirků, M., Valigurová, A., Koudela, B., Křížek, J., Modrý, D., Šlapeta, J., 2013. New species of *Cryptosporidium tyzzer*, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitol.* 55, 81–94.
- JORF - Journal Officiel de la République Française, 2006. Arrêté du 19 octobre 2006 relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires - Légifrance.
- Jousseaume, V., Margetic, C., 2007. Autre légume, autres lieux. La mâche dans le bassin maraîcher nantais. Méditerranée. *Revue géographique des pays méditerranéens / Journal of Mediterranean geography*, 47–53.
- Kar, S., Gawłowska, S., Dauschies, A., Bangoura, B., 2011. Quantitative comparison of different purification and detection methods for *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Vet. Parasitol.* 177, 366–370.
- Karanis, P., Kimura, A., 2002. Evaluation of three flocculation methods for the purification of *Cryptosporidium parvum* oocysts from water samples. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 444–449.
- Kaushik, K., Khurana, S., Wanchu, A., Malla, N., 2008. Evaluation of staining techniques, antigen detection and nested PCR for the diagnosis of cryptosporidiosis in HIV seropositive and seronegative patients. *Acta. Trop.* 107, 1–7.
- Keegan, A.R., Fanok, S., Monis, P.T., Saint, C.P., 2003. Cell culture-taqman PCR assay for evaluation of *Cryptosporidium parvum* disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2505–2511.
- Khramtsov, N.V., Tilley, M., Blunt, D.S., Montelone, B.A., Upton, S.J., 1995. Cloning and analysis of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a protein with homology to cytoplasmic form Hsp70. *J. Eukaryot. Microbiol.* 42, 416–422.

- KleinJan, G.H., Buckle, T., Van Willigen, D.M., Oosterom, M.N. van, Spa, S.J., Kloosterboer, H.E., Van Leeuwen, F.W.B., 2014. Fluorescent lectins for local *in vivo* visualization of peripheral nerves. *Molecules*. 19, 9876–9892.
- Klokouzas, A., Shahi, S., Hladky, S., Barrand, M., Van Veen, H.W., 2003. ABC transporters and drug resistance in parasitic protozoa. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 22, 301–17.
- Kniel, K.E., Sumner, S.S., Lindsay, D.S., Hackney, C.R., Pierson, M.D., Zajac, A.M., Golden, D.A., Fayer, R., 2003. Effect of organic acids and hydrogen peroxide on *Cryptosporidium parvum* viability in fruit juices. *J. Food Prot.* 66, 1650-1657.
- Kopacz, Ż., Kváč, M., Piesiak, P., Szydłowiec, M., Hendrich, A.B., Sak, B., McEvoy, J., Kicia, M., 2020. *Cryptosporidium baileyi* pulmonary infection in immunocompetent woman with benign neoplasm. *Emerg. Infect. Dis.* 2, 1958-1961.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 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., 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.
- Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., Cesare, A.D., Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cacciò, S., Chalmers, R., Deplazes, P., Devleeschauwer, B., Innes, E., Romig, T., Giessen, J. van der, Hempen, M., Stede, Y.V. der, Robertson, L., 2018. Public health risks associated with food-borne parasites. *EFSA Journal*. 16, e05495.
- Kubina, S., Costa, D., Favennec, L., Gargala, G., Rousseau, A., Villena, I., La Carbona, S., Razakandrainibe, R. 2021. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts from lamb's lettuce: CC-qPCR's intake. *Microorganism*. 9, 215.

- Kuczynska, E., Shelton, D.R., 1999. Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures, and soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2820–2826.
- Kudah, C., Sovoe, S., Baiden, F., 2018. Parasitic contamination of commonly consumed vegetables in two markets in Ghana. *Ghana Med. J.* 52, 88-93.
- Kuznar, Z.A., Elimelech, M., 2005. Role of surface proteins in the deposition kinetics of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Langmuir.* 21, 710–716.
- Kváč, M., Hofmannová, L., Hlásková, L., Květoňová, D., Vítovec, J., McEvoy, J., Sak, B., 2014. *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Vet. Parasitol.* 201, 9–17.
- Kváč, M., Kestránová, M., Pinková, M., Květoňová, D., Kalinová, J., Wagnerová, P., Kotková, M., Vítovec, J., Ditrich, O., McEvoy, J., Stenger, B., Sak, B., 2013. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Vet. Parasitol.* 191, 218–227.
- L'académie du gout. Bouquets de mâche. <https://www.academiedugout.fr>.
- Lalonde, L., Gajadhar, A.A., 2016. Detection of *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii* on imported leafy green vegetables in Canadian survey. *Food Waterborne Parasitol.* 2, 8-14.
- Lanternier, F., Amazzough, K., Favennec, L., Mamzer-Bruneel, M.-F., Abdoul, H., Turret, J., Decramer, S., Zuber, J., Scemla, A., Legendre, C., Lortholary, O., Bournoux, M.-E., ANOFEL *Cryptosporidium* national network and transplant *Cryptosporidium* study group, 2017. *Cryptosporidium* spp. infection in solid organ transplantation: the nationwide “TRANSCRYPTO” study. *Transplantation.* 101, 826–830.
- Laxer, M.A., Timblin, B.K., Patel, R.J., 1991. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45, 688–694.
- Le Goff, L., Hubert, B., Favennec, L., Villena, I., Ballet, J.J., 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. *J. Food Prot.* 78, 2247–2252.
- Lendner, M., Daughies, A., 2014. *Cryptosporidium* infections: molecular advances. *Parasitology.* 141, 1511-32.

- Leitch, G.J., He, Q., 2011. Cryptosporidiosis-an overview. *J. Biomed. Res.* 25, 1–16.
- 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. *Can. J. Microbiol.* 56, 968–977.
- Levine, N.D., 1980. Some corrections of Coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *J. Parasit.* 66, 830–834.
- Li, X., Zhang, X., Jian, Y., Wang, G., Ma, L., Schou, C., Karanis, P., 2020. Detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in vegetables from street markets from the Qinghai tibetan plateau area in China. *Parasitol. Res.* 119, 1847–1855.
- Lim, L., McFadden, G.I., 2010. The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365, 749–763.
- Lindsay, D.S., Upton, S.J., Owens, D.S., Morgan, U.M., Mead, J.R., Blagburn, B.L., 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from Cattle, *Bos taurus*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47, 91–95.
- Llorente, M., Clavel, A., Varea, M., Olivera, S., Castillo, F., Sahagún, J., Rubio, M., Gómez-Lus, R., 2002. Evaluation of an immunochromatographic dip-strip test for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in stool specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21, 624–625.
- Loris, R., De Greve, H., Dao-Thi, M.H., Messens, J., Imberty, A., Wyns, L., 2000. Structural basis of carbohydrate recognition by lectin II from *Ulex europaeus*, a protein with a promiscuous carbohydrate-binding site. *J. Mol. Biol.* 301, 987–1002.
- Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J., Wyns, L., 1998. Legume lectin structure. *Biochim. Biophys. Acta.* 1383, 9–36.
- Loury, P., Gross, L., Dugast, F., Favennec, L., Dalle, F., de Rougemont, A., Polack, B., Giraudeau, D., Valot, S., Costa, D., Hubert, B., 2018. Épidémie de cryptosporidiose dans un collège de l'ouest de la France, novembre 2017. *BEH.* 16, 295–300.
- Luo, X., Jedlicka, S., Jellison, K., 2016. Pseudo-second-order calcium-mediated *Cryptosporidium parvum* oocyst attachment to environmental biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e02339-16.
- Lyons, R.E., Johnson, A.M., 1995. Heat shock proteins of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 17, 353–359.

- Ma, P., 1984. *Cryptosporidium* and the enteropathy of immune deficiency. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 3, 488–490.
- Mac Kenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B., Davis, J.P., 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.* 331, 161–167.
- Macarisin, D., Santín, M., Bauchan, G., Fayer, R., 2010a. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts after storage of experimentally contaminated apples. *J. Food Prot.* 73, 1824–1829.
- Macarisin, D., Bauchan, G., Fayer, R., 2010b. *Spinacia oleracea* L. leaf stomata harboring *Cryptosporidium parvum* oocysts: a potential threat to food safety. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 555–559.
- Maikai, B.V., Baba-Onoja, E., Elisha, I.A., 2013. Contamination of raw vegetables with *Cryptosporidium* oocysts in markets within Zaria metropolis, Kaduna State, Nigeria. *Food Control.* 31, 45–48.
- Manzocco, L., Foschia, M., Tomasi, N., Maifreni, M., Dalla Costa, L., Marino, M., Cortella, G., Cesco, S., 2011. Influence of hydroponic and soil cultivation on quality and shelf life of ready-to-eat lamb's lettuce (*Valerianella locusta* L. Laterr). *J. Sci. Food Agric.* 91, 1373–1380.
- 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. *Mol. Cell. Probes.* 29, 122–125.
- Martínez-Ocaña, J., Maravilla, P., Olivo-Díaz, A., 2020. Interaction between human mucins and parasite glycoproteins: the role of lectins and glycosidases in colonization by intestinal protozoa. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* 62.
- Medema, G.J., Schets, F.M., Teunis, P.F.M., Havelaar, A.H., 1998. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4460–4466.
- Meisel, J.L., Perera, D.R., Meligro, C., Rubin, C.E., 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology.* 70, 1156–1160.

- Ministère de l'agriculture et de l'alimentation, 2020. La réglementation sur l'hygiène des aliments.
- Mir, N., Beaudry, R., 2016. Modified atmosphere packaging. United States Department of Agriculture 42–53.
- Monge, R., Arias, M.L., 1996. Presence of various pathogenic microorganisms in fresh vegetables in Costa Rica. *Arch. Latinoam. Nutr.* 46, 292–294.
- Mor, S.M., Tumwine, J.K., Ndeezi, G., Srinivasan, M.G., Kaddu-Mulindwa, D.H., Tzipori, S., Griffiths, J.K., 2010. Respiratory cryptosporidiosis in HIV-seronegative children in Uganda: potential for respiratory transmission. *Clin. Infect. Dis.* 50, 1366–1372.
- Morgan, U.M., Pallant, L., Dwyer, B.W., Forbes, D.A., Rich, G., Thompson, R.C.A., 1998. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. *J. Clin. Microbiol.* 36, 995–998.
- Naitza, S., Spano, F., Robson, K.J.H., Crisanti, A., 1998. The thrombospondin-related protein family of Apicomplexan parasites: the gears of the cell invasion machinery. *Parasitology Today*. 14, 479–484.
- Nanduri, J., Williams, S., Aji, T., Flanigan, T.P., 1999. Characterization of an immunogenic glycocalyx on the surfaces of *Cryptosporidium parvum* oocysts and sporozoites. *Infect. Immun.* 67, 2022–2024.
- Naughton, P., Kelly, D., Geaghan-Murray, S., Middleton, S., Cosgrove, C., Petty-Saphon, N., 2021. A foodborne outbreak of cryptosporidiosis likely linked to salad leaves. *Ir. Med. J.* 114, 381.
- NF EN 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.
- Nime, F.A., Burek, J.D., Page, D.L., Holscher, M.A., Yardley, J.H., 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*. 70, 592–598.
- Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., Crabb, J.H., Sterling, C.R., DuPont, H.L., 1999. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J. Infect. Dis.* 180, 1275–1281.
- Osman, M., Safadi, D.E., Cian, A., Benamrouz, S., Nourrisson, C., Poirier, P., Pereira, B., Razakandrainibe, R., Pinon, A., Lambert, C., Wawrzyniak, I., Dabboussi, F., Delbac, F.,

- Favennec, L., Hamze, M., Viscogliosi, E., Certad, G., 2016. Prevalence and risk factors for intestinal protozoan infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *Plos Neglect. Trop. Dis.* 10, e0004496.
- Pancier, R.J., Thomassen, R.W., Garner, F.M., 1971. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.* 8, 479–484.
- Paperna, I., Vilenkin, M., 1996. Cryptosporidiosis in the gourami *Trichogaster leeri*: description of a new species and a proposal for a new genus, *Piscicryptosporidium*, for species infecting fish. *Dis. Aquat. Org.* 27, 95–101.
- Pavlas, I., 1999. Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. *Remedia Klin. Mikrobiol.* 3, 290–301.
- Pavlas, I., 1995. *Cryptosporidium varaninii* sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in *Emerald monitor* (*Varanus prasinus* Schlegel, 1893) in captivity in Prague zoo. *Gazella.* 22, 99–108.
- Pecková, R., Stuart, P.D., Sak, B., Květoňová, D., Kváč, M., Foitová, I., 2016. Statistical comparison of excystation methods in *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Vet. Parasitol.* 230, 1–5.
- Peeters, J.E., Mazás, E.A., Masschelein, W.J., Maturana, I.V.M. de, Debacker, E., 1989. Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1519–1522.
- Perkins, M.E., Riojas, Y.A., Wu, T.W., Blancq, S.M.L., 1999. CpABC, a *Cryptosporidium parvum* ATP-binding cassette protein at the host–parasite boundary in intracellular stages. *PNAS.* 96, 5734–5739.
- Peron, J.Y., Rees, D.C., 1998. High-tech production of corn salad (*Valerianella locusta* (L) laterr.), a local, French vegetable crop. *Acta horticulturae.*
- Power, M.L., Ryan, U.M., 2008. A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *J. Parasitol.* 94, 1114–1117.
- Pumipuntu, N., Piratae, S., 2018. Cryptosporidiosis: A zoonotic disease concern. *Vet. World.* 11, 681–686.
- Rahman, M.M., Hossain, M.A., Paul, S.K., Ahmed, S., Islam, A., Ehsan, M.A., Alam, M.M., Kabir, M.R., Sarkar, S.R., 2014. Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* by direct immunofluorescence assay in stool specimen. *Mymensingh Med. J.* 23, 426–429.

- Ranjbar-Bahadori, S., Mostoophi, A., Shemshadi, B., 2013. Study on *Cryptosporidium* contamination in vegetable farms around Tehran. *Trop. Biomed.* 30, 193–198.
- Razakandrainibe, R., Kubina, S., Costa, D., Robinson, G., La Carbona, S., Aubert, D., David, A., Gargala, G., Villena, I., Favenneec, L., Chalmers, R.M., 2020. Evaluation of a modified method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts on spinach leaves. *Food Waterborne Parasitol.* 21, e00097.
- Razakandrainibe, R., Mérat, C., Kapel, N., Sautour, M., Guyot, K., Gargala, G., Ballet, J.-J., Le Pape, P., French Cryptosporidiosis Network, Dalle, F., Favenneec, L., 2021. Multicenter Evaluation of an ELISA for the detection of *Cryptosporidium* spp. antigen in clinical human stool samples. *Microorganisms.* 9, 209.
- Reina, F.T.R., Ribeiro, C.A., De Araujo, R.S., Matté, M.H., Castanho, R.E.P., Tanaka, I.I., Viggiani, A.M.F.S., Martins, L.P.A., 2016. Intestinal and pulmonary infection by *Cryptosporidium parvum* in two patients with HIV/AIDS. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 58.
- Robertson, L.J., Campbell, A.T., Smith, H.V., 1992. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3494–3500.
- Robertson, L.J., Chalmers, R.M., 2013. Foodborne cryptosporidiosis: is there really more in Nordic countries? *Trends Parasitol.* 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. *J. Food Prot.* 71, 959–966.
- Robertson, L.J., Gjerde, B., 2001. Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. *J. Food Prot.* 64, 1793–1798.
- Robinson, G., Chalmers, R.M., 2020. *Cryptosporidium* diagnostic assays: microscopy. *Methods Mol. Biol.* 2052, 1–10.
- Robinson, G., Wright, S., Elwin, K., Hadfield, S.J., Katzer, F., Bartley, P.M., Hunter, P.R., Nath, M., Innes, E.A., Chalmers, R.M., 2010. Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Morphology, biology and phylogeny. *Int. J. Parasitol.* 40, 1539–1548.
- Rousseau, A., La Carbona, S., Dumètre, A., Robertson, L.J., Gargala, G., Escotte-Binet, S., Favenneec, 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.
- Roux, B., 2010. Exploring the ion selectivity properties of a large number of simplified binding site models. *Biophys. J.* 98, 2877–2885.
- Ryan, U., Hijjawi, N., Xiao, L., 2018. Foodborne cryptosporidiosis. *Int. J. Parasitol.* 48, 1–12.
- Ryan, U., Paparini, A., Monis, P., Hijjawi, N., 2016. It's official – *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? *Water Research*. 105, 305–313.
- Ryan, U.M., Fall, A., Ward, L.A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Payer, R., Thompson, R.C.A., Olson, M., Lal, A., Xiao, L., 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49, 433–440.
- Ryan, U.M., Monis, P., Enemark, H.L., Sulaiman, I., Samarasinghe, B., Read, C., Buddle, R., Robertson, I., Zhou, L., Thompson, R.C.A., Xiao, L., 2004. *Cryptosporidium suis* N. Sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus Scrofa*). *J. parasitol.* 90, 769–773.
- Ryan, U.M., Power, M., Xiao, L., 2008. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *J. Eukaryot. Microbiol.* 55, 22–26.
- 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. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 100, 240–244.
- 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. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 189–194.
- Shahiduzzaman, M., Dyachenko, V., Obwaller, A., Unglaube, S., Dauschies, A., 2009. Combination of cell culture and quantitative PCR for screening of drugs against *Cryptosporidium parvum*. *Vet. Parasitol.* 162, 271–277.
- Shirley, D.-A.T., Moonah, S.N., Kotloff, K.L., 2012. Burden of disease from cryptosporidiosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25, 555–563.
- Sim, S., Won, J., Kim, J.-W., Kim, K., Park, W.-Y., Yu, J.-R., 2017. Simultaneous molecular detection of *Cryptosporidium* and *Cyclospora* from raw vegetables in Korea. *Korean J. Parasitol.* 55, 137–142.

- Šlapeta, J., 2013. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow? *Int. J. Parasitol.* 43, 957–970.
- Šlapeta, J., 2006. *Cryptosporidium* species found in cattle: a proposal for a new species. *Trends Parasitol.* 22, 469–474.
- Slavin, D., 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J. Comp. Pathol. Therap.* 65, 262.
- Sleman Ali, H., Mageed, S.N., Jahed Khaniki, G.R., Shariatifar, N., Yunesian, M., Rezaeian, M., Saleh, K.K., 2018. Contamination of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw vegetables produced in Koya city, Iraq. *J. Food Qual. Hazards Control.* 5, 89-93.
- Smith, H.V., Nichols, R.A.B., Grimason, A.M., 2005. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends Parasitol.* 21, 133–142.
- Smith, R.P., Clifton-Hadley, F.A., Cheney, T., Giles, M., 2014. Prevalence and molecular typing of *Cryptosporidium* in dairy cattle in England and Wales and examination of potential on-farm transmission routes. *Vet. Parasitol.* 204, 111–119.
- 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.
- 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. *Parasitol. Res.* 114, 4655–4667.
- Stein, B., Stover, L., Gillem, A., Winters, K., Leet, J.H., Chauret, C., 2006. The effect of lectins on *Cryptosporidium parvum* oocyst *in vitro* attachment to host cells. *J. Parasitol.* 92, 1–9.
- Sulaiman, I.M., Hira, P.R., Zhou, L., Al-Ali, F.M., Al-Shelahi, F.A., Shweiki, H.M., Iqbal, J., Khalid, N., Xiao, L., 2005. Unique endemicity of Cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2805–2809.
- Tamburrini, A., Pozio, E., 1999. Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int. J. Parasitol.* 29, 711–715.
- Tei, F.F., Kowalyk, S., Reid, J.A., Presta, M.A., Yesudas, R., Mayer, D.C.G., 2016. Assessment and molecular characterization of human intestinal parasites in bivalves from Orchard Beach, NY, USA. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 13, 381.

- Temesgen, T., Robertson, L.J., Stigum, V.M., Tysnes, K., 2021. Removal of parasite transmission stages from berries using washing procedures suitable for consumers. *Foods*. 10, 481.
- Tetley, L., Brown, S.M.A., McDonald, V., Coombs, G.H., 1998. Ultrastructural analysis of the sporozoite of *Cryptosporidium parvum*. *Microbiology*. 144, 3249–3255.
- Traversa, D., 2010. Evidence for a new species of *Cryptosporidium* infecting tortoises: *Cryptosporidium ducismarci*. *Parasites & Vectors*. 3, 21.
- Turton, K., Natesh, R., Thiyagarajan, N., Chaddock, J.A., Acharya, K.R., 2004. Crystal structures of *Erythrina cristagalli* lectin with bound N-linked oligosaccharide and lactose. *Glycobiology*. 14, 923–929.
- Tyzzer, E.E., 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.* 26, 394–412.
- Tyzzer, E.E., 1907. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 5, 12–13.
- Tzipori, S., Ward, H., 2002. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect.* 4, 1047–1058.
- Upton, S.J., Tilley, M., Brillhart, D.B., 1995. Effects of select medium supplements on *in vitro* development of *Cryptosporidium parvum* in HCT-8 cells. *J. Clin. Microbiol.* 33, 371–375.
- Upton, S.J., Tilley, M., Brillhart, D.B., 1994. Comparative development of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa) in 11 continuous host cell lines. *FEMS Microbiol. Lett.* 118, 233–236.
- Utaaker, K.S., Huang, Q., Robertson, L.J., 2015. A reduced-cost approach for analyzing fresh produce for contamination with *Cryptosporidium* oocysts and/or *Giardia* cysts. *Food Res. Int.* 77, 326–332.
- Utaaker, K.S., Kumar, A., Joshi, H., Chaudhary, S., Robertson, L.J., 2017a. Checking the detail in retail: occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* on vegetables sold across different counters in Chandigarh, India. *Int. J. Food Microbiol.* 263, 1-8.
- Utaaker, K.S., Skjerve, E., Robertson, L.J., 2017b. Keeping it cool: Survival of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts on lettuce leaves. *Int. J. Food Microbiol.* 255, 51–57.

- Valigurová, A., Jirků, M., Koudela, B., Gelnar, M., Modrý, D., Šlapeta, J., 2008. Cryptosporidia: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. *Int. J. Parasitol.* 38, 913–922.
- Verdin, E., Marais, A., Wipf-Scheibel, C., Faure, C., Pelletier, B., David, P., Svanella-Dumas, L., Poisblaud, C., Lecoq, H., Candresse, T., 2018. Biological and genetic characterization of new and known necroviruses causing an emerging systemic necrosis disease of corn salad (*Valerianella locusta*) in France. *Phytopathology*. 108, 1002–1010.
- Vermeulen, L.C., Benders, J., Medema, G., Hofstra, N., 2017. Global *Cryptosporidium* loads from livestock manure. *Environ. Sci. Technol.* 51, 8663–8671.
- Vetterling, J.M., Jervis, H.R., Merrill, T.G., Sprinz, H., 1971. *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. *J. Protozool.* 18, 243–247.
- Wanyiri, J., Ward, H., 2006. Molecular basis of *Cryptosporidium*–host cell interactions: recent advances and future prospects. *Future Microbiology*. 1, 201–208.
- Ward, B.K., Irving, L.G., 1987. Virus survival on vegetables spray-irrigated with wastewater. *Water Research*. 21, 57–63.
- Wetzel, D.M., Schmidt, J., Kuhlenschmidt, M.S., Dubey, J.P., Sibley, L.D., 2005. Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infection and Immunity*. 73, 5379–5387.
- Wirth, D., Gustin, P., Drion, P., Dessy-Doize, C., Christians, E.S., 2002. Heat shock proteins. I: Classification and roles in pathological processes. *Annales de Médecine Vétérinaire* 146.
- Witt. Emballage sous atmosphère modifiée. wittgas.com. <https://www.wittgas.com/fr/>
- Woods, K.M., Tilley, M., Iselp, A., Upton, S.J., Montelone, B.A., Khramtsov, N.V., 1999. Sequence of the gene encoding *hsp90e* from *Cryptosporidium parvum*. *DNA Sequence* 10. 339–342.
- World Health Organization, 2015. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne diseases burden epidemiology reference group 2007-2015.
- Xiao, L., 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp. Parasitol.* 124, 80–89.

Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J., 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 72–97.

Yaron, S., Römling, U., 2014. Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. *Microb. Biotechnol.* 7, 496–516.

Zahedi, A., Paparini, A., Jian, F., Robertson, I., Ryan, U., 2016. Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: critical insights into better drinking water management. *Int. J. Parasitol.* 5, 88–109.

Zahedi, A., Ryan, U., 2020. *Cryptosporidium* – An update with an emphasis on foodborne and waterborne transmission. *Res. Vet. Sci.* 132, 500–512.

Étude de la survie et de l'adhérence des oocystes de *Cryptosporidium parvum* sur une matrice alimentaire végétale : la mâche.

Résumé. La survie et l'adhérence de *Cryptosporidium* à la surface des matrices alimentaires végétales sont peu documentées. Or, la contamination de l'Homme peut se faire, entre autres, par la consommation d'aliments contaminés consommés crus, peu cuits ou peu transformés. Des épidémies d'origine alimentaires liées à la consommation de végétaux à feuilles vertes contaminés par *C. parvum* sont ainsi régulièrement rapportées. La transmission du parasite à l'Homme est liée à la capacité du parasite à adhérer, persister et survivre sur les aliments. Aussi, les travaux présentés ici visent à étudier la survie des oocystes à la surface de la mâche, source potentielle de contamination, dans les conditions de croissance du végétal et en industrie agroalimentaire (procédé de lavage). Les interactions mises en œuvre permettant l'adhérence du parasite sur ces matrices ont également été étudiées. Les résultats montrent que le parasite persiste tout au long de la croissance de la mâche mais perd son infectiosité après deux semaines. Le lavage tel que réalisé en industrie agroalimentaire ne permet pas de réduire totalement la charge parasitaire et n'a aucun impact sur son infectiosité. De plus, le milieu dans lequel se trouve *Cryptosporidium* lorsqu'il entre en contact avec la mâche médie son adhérence, qui peut se faire par l'intermédiaire de certains sucres et de leurs récepteurs présents à la surface du parasite et/ou du végétal.

Mots clés : *Cryptosporidium parvum*, mâche, survie, persistance, adhérence

Survival and adherence of *Cryptosporidium parvum* oocysts on lamb's lettuce leaves.

Abstract. Survival and adherence of *C. parvum* on vegetable food matrices are poorly investigated. However, human contamination can occur through consumption of raw or under-cooked food. Food-borne outbreaks related to the consumption of green leafy food contaminated with *C. parvum* are regularly reported. Transmission of the parasite to humans is associated with the parasite ability to adhere, persist and survive in food, but data are scarce. This project aimed to study the survival of oocysts onto lamb's lettuce leaves, a potential source of contamination, under the growing conditions of vegetables and the food industry (washing process) and studied involved interactions in the parasite adherence on vegetable matrix. Results show that the parasite persists throughout the growth of lamb's lettuce but loses its infectivity after two weeks. Washing as performed in the food industry neither reduces the parasitic load nor impacts its infectivity. Moreover, the environment in which *Cryptosporidium* is found when it comes into contact with the lamb's lettuce mediates its adherence, which can be done through certain carbohydrates and their receptors present on both or each surface of the parasite and/or the plant.

Mots clés : *Cryptosporidium parvum*, lamb's lettuce, survival, persistence, adherence