

Laboratoire BioGAP

Axe Parasitologie animale

Taxonomie biomoléculaire de *Cryptosporidium spp* sur des prélèvements bovins : Etude de prévalence en France.

Cryptosporidium est un protozoaire parasite capable d'infecter tous les groupes de vertébrés. Il est l'agent étiologique de la cryptosporidiose. Il se développe dans l'intestin et plus rarement dans le tractus respiratoire des hôtes qu'il contamine. Chez l'homme, la maladie se marque essentiellement par des diarrhées profuses et des crampes abdominales. Chez les animaux d'élevages comme les bovins, la cryptosporidiose est responsable de baisses de rendements liées à un retard de croissance des animaux par malabsorption voire à une mortalité élevée des individus les plus faibles par déshydratation. Depuis les campagnes de vaccination contre les rotavirus, les coronavirus et *Escherichia coli* K99, les cryptosporidies sont devenus les principaux agents responsables des diarrhées chez les veaux nouveaux nés.

Malgré un risque fort en santé publique et un impact économique non négligeable dans le domaine agricole, aucun traitement n'a été décrit contre ce pathogène. Le contrôle épidémique passe donc par une approche prophylactique visant à limiter la dissémination du parasite dans l'environnement et baisser le risque de transmission des formes infectantes (oocystes) depuis des animaux réservoirs vers des hôtes définitifs tels que l'homme.

Il est à noter que sur les 23 espèces de *Cryptosporidium* actuellement décrites, seules sept d'entre elles ont été retrouvées chez l'Homme. Cinq espèces de *Cryptosporidium* ont été décrites chez les bovins : *C. parvum*, *C. ryanae*, *C. bovis*, *C. andersoni*, *C. ubiquitum*. L'identification commune de *C. parvum* chez l'homme et les bovins a conduit à considérer les animaux d'élevage comme un réservoir de parasites lors des transmissions zoonotiques de ce pathogène. Or en France, l'identité des espèces et des souches de *Cryptosporidium spp* détectées dans les structures d'élevage n'est pas bien connue.

Suite à la caractérisation des espèces de *Cryptosporidium* incriminées chez les veaux en Bretagne par le séquençage d'une portion hypervariable de ADN_r18S, les travaux réalisés cette année ont permis d'achever l'analyse d'un marqueur polymorphe : la GP-60 (correspondant au gène codant une glycoprotéine de surface de 60kD). Les résultats obtenus ont été intégrés à l'article : *Prévalence and moléculaire characterization of Cryptosporidium spp in young veal cattle in France* soumis au journal Parasitology Research. Tous les allèles caractérisés dans la présente étude appartiennent au type IIa. Cette approche a permis de montrer que le sous type IIaA15G2R1 était majoritairement représenté dans la population parasitaire étudiée en Bretagne. Ce sous génotype est en effet observé dans 74.5% des échantillons analysés. Cinq autres sous types ont également été observés : IIaA17G1R1(11.76%), IIaA16G3R1 (5.89%), IIaA16G2R1 (3.92%) IIaA16G1R1 (1.96%) et IIaA13G1R1(1.96%). Il est notable que ces sous types génétiques pour *Cryptosporidium parvum* ont déjà été caractérisés en Hollande et en Angleterre dans des proportions similaires. La prédominance du sous génotype IIaA15G2R1 est particulièrement intéressante car elle est très fréquemment observée dans les populations de *C parvum* infectant les humains. Cette observation faite principalement à partir de prélèvements issus d'animaux âgés de 5 semaines suggère donc un rôle potentiel de ces animaux en tant que réservoir de parasites zoonotiques pour l'homme.

Cette analyse génétique se poursuit actuellement par le séquençage de 5 autres marqueurs : HSP-70, MS5, MSC6-7, MS9 et DZHRGP. Cette approche vise à déterminer un profil génétique des populations de *C parvum* présentes dans les élevages de veaux en Bretagne et de comparer de profil parasitaire avec celui obtenu à partir de prélèvements humains (travail réalisé par l'équipe d'Eduardo Dei-cas à

l'Institut Pasteur de Lille). Le croisement des données issues de ces deux études pourrait au final permettre de déterminer si les populations parasitaires incriminées dans les cas de cryptosporidiose humaines sont réellement d'origine zoonotique.

Elaboration d'un microlaboratoire sur puces à cellules pour tester le pouvoir infectieux de parasites du genre *Cryptosporidium*.

Actuellement, il n'existe pas de système automatisable permettant d'évaluer en routine le pouvoir infectieux d'un grand nombre d'échantillons de parasites du genre *Cryptosporidium*. Ce test est réalisé par gavage intragastrique de souriceaux nouveaux nés ou par infestation *in-vitro* de lignées cellulaires sensibles au parasite. Ces deux stratégies nécessitent beaucoup de main d'œuvre qualifiée et dans le cadre des expérimentations animales le recours à une infrastructure lourde associée à des limitations d'ordre réglementaires et éthiques.

Afin de palier à ces problèmes, un programme de recherche a été initié pour créer un micro-laboratoire permettant de détecter de manière automatisée le pouvoir infectieux des oocystes de *Cryptosporidium*. Pour cela, une stratégie d'ingénierie, en partenariat avec des électroniciens, a été développée. Le prototype final (Fig. 1) doit permettre de concentrer les oocystes, d'extraire une goutte de quelques micro-litres (fortement chargée en oocystes), de transporter cette goutte jusqu'à une zone de culture de cellules sous forme de patches et ainsi de mettre en contact les oocystes en forte concentration avec les cellules biologiques. Si les oocystes sont infectieux, ils doivent infecter les cellules ce qui va se traduire par une modification des propriétés des tapis cellulaires qui peut être suivie par une mesure électrique.

Le micro-laboratoire réside, *in fine*, en l'apposition de trois modules millimétriques : un concentrateur, un convoyeur et un analyseur.

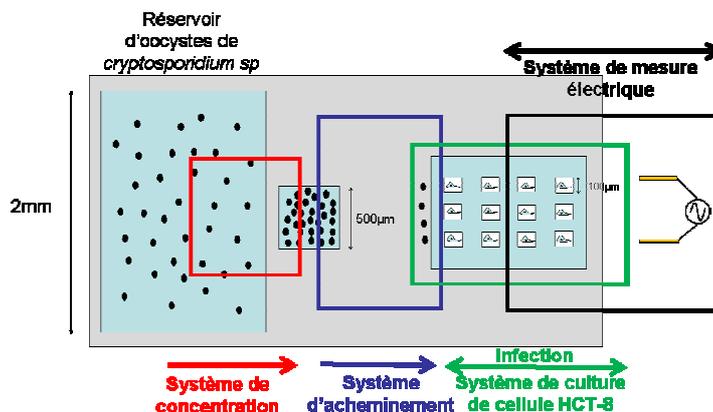


Fig. 1 : Schéma du micro-laboratoire d'analyse du pouvoir infectieux d'agents pathogènes.

Le concentrateur vise à localiser de manière très focalisée les particules d'intérêt (parasite) dans une microgoutte pour obtenir après extraction un volume final de solution le plus petit possible (quelques centaines de micro-litres) contenant le plus grand nombre de particules d'intérêt.

A ce jour, des méthodes de concentration de particules en suspension ont déjà été développées sur la base des propriétés diélectrophorétiques des particules qu'elles soient organiques ou inorganiques. Toutefois, la géométrie des électrodes employées n'avait pas permis de positionner les particules d'intérêt dans une zone permettant leur analyse ou leur transport vers un analyseur. L'originalité du travail conduit a donc été de modifier la géométrie des électrodes pour positionner au final les particules d'intérêt dans une zone périphérique du dispositif rendant leur manipulation par une approche en microfluidique discrète réalisable (Type EWOD). Les travaux effectués ont permis d'élaborer un module de concentration particulaire fonctionnel et efficace. Les paramètres physiques expliquant le comportement particulaire observé ont ensuite été recherchés par une approche en modélisation informatique. Cette étape de modélisation a permis de déterminer l'impact de l'architecture des électrodes dans ces constructions microniques. Elle a également mis en

évidence le rôle de la fréquence du courant appliqué dans la formation des amas d'oocystes. Elle a montré l'implication de forces diélectrophorétiques, électroosmotiques, gravitationnelles et thermiques dans le déplacement des oocystes. Les données collectées ont été présentées en conférence à Glasgow et sont en cours de valorisation scientifique par la rédaction d'un article dans un journal international à comité de lecture.

Les travaux menés dans le cadre du module concentrateur ont enfin montré une concentration différentielle entre des oocystes de *C. parvum* et de *C. muris* lorsqu'ils étaient présents dans le même échantillon. Toutefois, il n'a pas été observé de séparation différentielle entre des oocystes de *C. parvum* et de *C. hominis*. Ces résultats seraient ici liés à la différence de taille observée ou non entre les oocystes de chaque espèce (oocystes de *C. muris* : 6µm à 8µm ; oocystes de *C. parvum* et *C. hominis* : 4µm et 6µm).

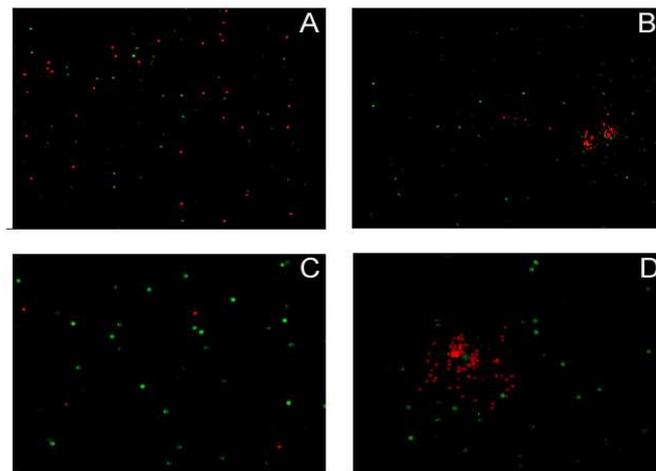


Fig 2. Répartition des oocystes de *Cryptosporidium* avant (A, C) et après application des champs électriques (B, D) sur les électrodes non parallèles. Les parasites ont été immunomarqués avec un anticorps anti-oocystes couplé à de la FITC (Vert) pour les oocystes de *C. muris* ou couplé avec de la rhodamine (Rouge) pour les oocystes de *C. parvum*. Les résultats obtenus montrent une répartition aléatoire des parasites en mélange avant traitement et une concentration des oocystes de *C. parvum* spécifique des paramètres électriques appliqués. Grossissement x100 (A, B), x200 (C, D)

Le convoyeur vise à déplacer de façon automatisée les oocystes concentrés sur des cultures cellulaires pour réaliser une infestation *in vitro*. Cette seconde partie est basée sur une technologie de microfluidique discrète, à base de gouttes, dont les déplacements sont assurés par champ électrique (EWOD). Le couplage du concentrateur avec le convoyeur a été le travail principal de l'étudiant en thèse chargé du projet. Les premiers résultats obtenus ont permis de réaliser des microgouttes issues d'un réservoir (qui contiendra *in fine* les parasites) et de les déplacer par technique EWOD.

L'analyseur consiste à infecter des cultures cellulaires sensibles au parasite (lignées cellulaires : HCT-8, MDCK, ou Caco2). Ces cellules auront été mises en culture au préalable sur des microélectrodes interdigitées. Le développement de ce troisième module a été initié en testant le comportement des cellules sur les micro-patches (quelques µm²). Parallèlement à cela, des tests d'infestations ont été entrepris afin d'appréhender les paramètres limitant de cette étape.