



HAL
open science

Parasites zoonotiques transmis par la viande : De la relation hôte/parasite à la détection et l'identification

Grégory Karadjian

► **To cite this version:**

Grégory Karadjian. Parasites zoonotiques transmis par la viande : De la relation hôte/parasite à la détection et l'identification. Life Sciences [q-bio]. 2021. tel-04142821

HAL Id: tel-04142821

<https://anses.hal.science/tel-04142821>

Submitted on 27 Jun 2023

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.

Habilitation à Diriger des Recherches

Parasites zoonotiques transmis par la viande : De la relation hôte/parasite à la détection et l'identification

Présenté par **Grégory Karadjian**
Chef de Projet, Catégorie 1, Anses
Laboratoire de Santé Animale
UMR BIPAR, ANSES, INRAE, ENVA

Soutenue le 10 décembre 2021

Devant le jury composé de :

Pr Isabelle Villena	Rapporteur
Pr Isabelle Florent	Rapporteur
Pr Frédéric Grenouillet	Rapporteur
Dr Sandrine Cojean	Examineur
Dr Laurent Gavotte	Examineur
Dr Corinne Cotinot	Présidente

Table des matières

CURRICULUM VITAE	4
1. Grade et fonctions actuelles.....	4
2. Diplômes.....	4
3. Activités de recherche	4
4. Encadrement	5
5. Financements et contrats de recherche.....	8
6. Activités d'enseignement	8
7. Activité dans des sociétés savantes.....	9
8. Autres activités scientifiques.....	9
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	11
1. Publications	11
2. Communications à des congrès.....	12
ACTIVITES DE RECHERCHE.....	17
PREAMBULE.....	17
INTRODUCTION AUX ZOONOSES PARASITAIRES D'ORIGINE ALIMENTAIRE	17
I. OUTILS DE DETECTION DE TRICHINELLA SPP.....	20
a. Mise en place d'un outil innovant chez <i>T. spiralis</i> pour l'étude des fonctions de protéines : l'interférence à l'ARN.....	20
i. Chez l'adulte	21
ii. Chez les Larves 1 musculaires.....	23
b. Rôle de la protéine NBL1 dans la relation avec son hôte et stratégie d'utilisation pour la détection.....	24
i. Etude de la séquence de NBL1	25
ii. Etude de l'interaction de NBL1 avec des molécules de l'hôte	27
iii. NBL1 modifie l'expression de gènes de la cellule hôte	30
iv. Utilisation de NBL1 pour le diagnostic des trichinelloses animales	31
c. Développement d'un outil innovant de détection basé sur les aptamères.....	33
i. Sélection d'aptamères par whole larvae-SELEX (WL-SELEX).....	34
ii. Détermination d'un biomarqueur/facteur de virulence de <i>Trichinella spiralis</i>	36
d. Caractérisation de nouvelles cibles thérapeutiques et vaccinales dans le système neuronal de <i>Trichinella spiralis</i>	40
i. Détection et localisation tissulaire des neuropeptides de <i>T. spiralis</i>	41
ii. Découverte d'un récepteur muscarinique à l'acétylcholine fonctionnel chez <i>T. spiralis</i>	43
II. Outils d'identification de Nématodes des viandes.....	47
a. Identification d'espèces au sein du genre <i>Trichinella</i>	47

i.	Révision de la PCR multiplexe	47
ii.	Développement d'une base de données MALDI-TOF	49
b.	Identification d'espèces de nématodes n'appartenant pas au genre <i>Trichinella</i> .	53
i.	Stratégie d'identification en deux étapes combinant la morphologie et la biologie moléculaire	53
ii.	Recherche d'espèces sentinelles dans la faune sauvage	56
	CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....	61
	REFERENCES	63

CURRICULUM VITAE

Gregory Karadjian

Chef de Projet, Anses

Tél: 01 49 77 28 18/ 06 11 78 69 09

Fax: 01 49 77 13 16

e-mail: gregory.karadjian@anses.fr

Né le 19 juin 1979, à Brétigny Sur Orge (91)

Nationalité : Française

Situation familiale: marié, 5 enfants

1. Grade et fonctions actuelles

- **Chef de Projet Catégorie 1**, à l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement e du Travail (Anses), affecté à l'Unité Mixte de Recherche en Biologie moléculaire et Immunologie Parasitaires (UMR BIPAR) au sein du Laboratoire de Santé Animale (LSAn).
- **Chef d'Unité Adjoint de l'unité Bipar**
- **Adjoint à la Directrice de l'Unité Mixte de Recherche Bipar**
- **Responsable adjoint du Laboratoire National de Référence** des « Parasites transmis par les aliments, hormis *Echinococcus* ».

2. Diplômes

- 2014 : **Thèse de doctorat**, ED du Muséum National d'Histoire Naturelle (ED227), Paris. Directrice : Dr Coralie Martin. *Mention très honorable avec les félicitations du jury.*

Récompensé par le prix de thèse de la Société Française de Parasitologie.

- 2013 : **DU**: Habilité à l'Expérimentation Animale (Niveau 1), Université de Pharmacie Paris V-René Descartes, Paris.
- 2011 : **Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE)**, EPHE, Paris. Encadrants: Dr Coralie MARTIN and Pr Irène LANDAU.
- 2005 : **DU** : Maladies Parasitaires et Tropicales. Université de Médecine Pitié-Salpêtrière, Paris.
- 2005 : **Certificat** de Capacité aux prélèvements sanguins, DDASS de l'Essonne, Evry.
- 2004 : **BTS** Analyses Biologiques, Ecole Nationale de Chimie-Physique-Biologie, Paris.

3. Activités de recherche

- Depuis Octobre 2015 : **Chargée de Projet Recherche Catégorie 2 puis chef de projet Catégorie 1**. Equipe Paralim « Parasites zoonotiques transmis par les aliments » et Laboratoire National de Référence « Parasites transmis par les aliments, hormis *Echinococcus* » - UMR BIPAR – Laboratoire de Santé Animale – ANSES, INRAE, ENVA. Développement d'outils de détection et d'identification de parasites zoonotiques transmis par l'alimentation, plus particulièrement par les viandes. Participe au développement de nouveaux tests sérologiques pour le diagnostic précoce des trichinelloses porcines. Spécialisé en biologie parasitaire et dans les interactions hôte-parasite par des approches transcriptomiques et protéomiques pour le développement d'outils innovants (interférence à l'ARN) visant le développement de nouvelles cibles diagnostiques et/ou vaccinales.
- Janvier à Septembre 2015 : **Post-doctorat**, Responsables : Dr Isabelle VALLEE et Dr Coralie MARTIN. Développement d'outils innovants de lutte contre les nématodes parasites digestifs.
- 2011-2014 : **Thèse de doctorat**, Directrice de thèse : Dr Coralie MARTIN. Coinfections naturelles et expérimentales : Interactions Hôtes-parasites chez les oiseaux (*Haemosporidia* de rapaces) et chez un modèle murin (*Plasmodium* sp./*Litomosoides sigmodontis*).

- 2010-2011 : **Diplôme de l'École Pratique des Hautes Etudes (EPHE)**, EPHE, Paris. Encadrants: Dr Coralie MARTIN et Pr Irène LANDAU. Pluri-infestations et contrainte parasitaire: aspects parasitologiques, immunologiques et anatomopathologiques dans le modèle souris/ Filaire-*Plasmodium*.

4. Encadrement

Chef d'Unité Adjoint de l'Unité Bipar

- Depuis juillet 2021. L'unité héberge le laboratoire national de référence « Parasites transmis par les aliments hormis *Echinococcus* » constitué de 2 chercheurs, 2 enseignant-chercheurs, 2 technicien et 2 ingénieurs, et le laboratoire National de Référence Besnoitiose constitué d'1 chercheur.

Adjoint à la directrice de l'UMR Bipar pour l'Anses

- Depuis décembre 2020. L'UMR est composée de deux équipes de Recherche hébergeant 40 agents : 5 Professeurs, 3 Chercheurs DR, 6 Enseignant-Chercheurs, 3 Chercheurs CR, 2 Post-doctorants, 6 doctorants, 2 ingénieurs, 11 techniciens et 3 gestionnaires.

Encadrement de Post-doctorat :

- Septembre 2015 – Juin 2016 : Mme Alexandra GRASTEAU a poursuivi les travaux que j'avais initiés lors de mon Post-doctorat. Responsables : Dr Isabelle VALLEE, Dr Coralie MARTIN et Dr Grégory KARADJIAN. Développement d'outils innovants de lutte contre les nématodes parasites digestifs.

Publication : Grégory Karadjian, Cédric Neveu, Aurélie Heckmann, Alexandra Grasteau, Pascal Boireau, Coralie Martin, Alexandra Blanchard and Isabelle Vallée. Investigating anthelmintic targets in adult *Trichinella spiralis* by RNA interference. Soumis dans Parasite.

Co-encadrement de thèses :

- Depuis Septembre 2017 : Anqi WANG. Etude du rôle de NBL1, une sérine protéase spécifique du stade L1 Nouveau-Né de *Trichinella spiralis*. Directrice de thèse : Dr Isabelle VALLEE, Co-directeur : Grégory KARADJIAN. Financement : Ministère chinois de la Recherche.

Publication : Anqi Wang, Aurélie Heckmann, Grégory Caignard, Damien Vitour, Mingyan Liu, Sylvia Bruneau, Pascal Boireau, Isabelle Vallée and Grégory Karadjian. *Trichinella spiralis* New Born larvae specific protein interacts with host's cell vimentin. Soumis à Parasitology Research.

Wang A, Yera H, Arie F, Vallée I and Karadjian G. *T. spiralis* NBL1 regulates the expression of two host cells' heat shock proteins. En préparation.

- Depuis novembre 2019 : Noah BROSSEAU. Développement d'un test de détection de *Trichinella* basé sur les aptamères. Directrice de thèse : Dr Isabelle VALLEE, Co-directeur : Grégory KARADJIAN. Financement : European Joint Project - One Health (OH-EJP) 46% - Anses 54%.

Publication : Noah Brosseau, Momar Ndao, Anne Mayer-Scholl, Isabelle Vallée et Grégory Karadjian. Application of Aptamers in Parasite Detection. En préparaion.

Encadrement de thèse vétérinaire :

- 2019-2020 : Solène NIEDERLENDER. Les aptamères, propriétés générales et applications potentielles en Sciences Vétérinaires. Directeur de thèse : Pr Jean-Jacques FONTAINE, Co-directeur : Dr Grégory KARADJIAN. Soutenue le 19 novembre 2020.

Publication : Solène Niederlender, Jean-Jacques Fontaine and Grégory Karadjian. Potential applications of aptamers in Veterinary Sciences. *BMC Veterinary Researches*, 2021. 52:79

Récompensée par la Médaille de bronze du prix de thèse vétérinaire

Encadrement de Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE) :

- 2015-2016 : Aurélie HECKMANN. Étude de NBL1, une protéine de *Trichinella spiralis* présentant un intérêt pour le développement de nouveaux outils de lutte contre ce parasite zoonotique. Co-encadrement avec le Dr Isabelle VALLEE.

Publications : Anqi Wang, Aurélie Heckmann, Grégory Caignard, Damien Vitour, Mingyan Liu, Sylvia Bruneau, Pascal Boireau, Isabelle Vallée and Grégory Karadjian. *Trichinella spiralis* New Born larvae specific protein interacts with host's cell vimentin. Soumis à *Parasitology Research*.

Grégory Karadjian, Aurélie Heckmann, Giuseppe La Rosa, Edoardo Pozio, Pascal Boireau and Isabelle Vallée. Molecular identification of *Trichinella* species by multiplex PCR: new insight for *Trichinella murelli*. *Parasite*. 2017; 24 (52).

Encadrement de Master 2 :

- 2014 : Jaksha CHANDRATAS. Analyse transcriptomique de l'infection filarienne pulmonaire. Master 2 de l'Université de Keele, UK. Co-encadrement avec le Dr. Coralie MARTIN. Financement : bourse ERASMUS.
- 2014 : Delia Doreen DJUICY. Dynamique cellulaire associée à l'amicrofilarémie dans un modèle murin de filariose. Master 2, Université de Franceville, Gabon. Co-encadrement avec le Dr. Coralie MARTIN.
- 2016 : Charlotte CALVET. New proteomic tools for the identification of proteins influencing the infectivity of the parasitic nematode *Trichinella*. Master 2 AgroparisTech, Paris-Saclay PRIAM, France. Co-encadrement avec le Pr Sylvain BELLIER. Financement : Conseil Scientifique de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.
- 2017 : Johan MELE. Mise en place d'un siRNA ciblant la Cathepsine F des larves musculaires de *Trichinella spiralis*. Master 2 A2I, Paris-Saclay - Université de Versailles Saint Quentin, France.
- 2018 : Gohar GRIGORYAN. Recherche de *Trichinella* dans des prélèvements d'Arménie. Master de la faculté de biologie de l'Université de Yerevan, Arménie.

Publication : Gohar Grigoryan, Sargis Aghayan, Hazmik Gevorgyan, Alexander Malkhasyan, Isabelle Vallée and Grégory Karadjian. The first report of *Trichinella britovi* in Armenia. *Iranian Journal of Parasitology*. 2020; 15 (3): 452-456.

- 2020 : Youman AL-BAYDA. Sélection d'aptamères spécifiques de l' α -Gal de la tique. Master 2 A2I, Paris-Saclay - Université de Versailles Saint Quentin, France. Co-encadrement avec le Dr Alejandro CABEZAS-CRUZ.
- 2021 : Caina NING. Etude des Neuropeptides de *Trichinella spiralis* (NeuropepTrich). Master 2 A2I, Paris-Saclay - Université de Versailles Saint Quentin, France. Co-encadrement avec le Dr Ladislav SIMO.

Publication : Ning C, Karadjian G* and Simo L*. A First Insight into the *Trichinella spiralis* Neurobiology. * equal contribution. En préparation.

Encadrement de Master 1 / 2^{ème} année d'Ecole d'Ingénieur :

- 2015 : Mélodie ROUSSEL. Chronobiologie de *Plasmodium*. Master 1, Université de Montpellier, France. Co-encadrement avec le Dr Coralie MARTIN.
- 2016 : Véronique DE CONTO. Clonage de sous-unités de récepteur cholinergique chez le nématode parasitaire *Trichinella* (unc-63). 2^{ème} année Ecole d'Ingénieur Agronomie, Toulouse, France.
- 2017 : Maeva ELOUDZERI. Amélioration de la culture in vitro des Larves 1 Nouveau-Né (L1NN) de *Trichinella spiralis*. Master 1, Paris XIII, France.
- 2018 : Alexandre FERJULE. Etude in vitro de la prolifération ou de la mort des cellules musculaires en présence de L1NN du nématode parasite *Trichinella spiralis* ou d'une de leur protéine spécifique NBL1. Master 1 Sciences Technologie et Santé, Paris VI, France.

Encadrement de BTS/Licence 3^{ème} année :

- 2015 : Baptiste MAHEO. Mise en place d'un protocole expérimental pour l'étude de l'effet du Levamisole sur *Trichinella spiralis*. Licence 3^{ème} année, Ecole Normale Supérieure de Cachan, France.
- 2016 : Eloïse ROUX, Clonage de sous-unités de récepteur cholinergique chez le nématode parasitaire *Trichinella* (UNC-38). 1^{ère} année de BTS, Lycée La Brosse, Auxerre, France.
- 2017 : Lisa LABOUTIERE. Recherche de *Trichinella* chez les rapaces de France. 1^{ère} année de BTS, Lycée La Brosse, Auxerre, France.
- 2018 : Anthony VOISINOT. Recherche et identification de larves de *Trichinella* chez les oiseaux de France. 1^{ère} année de BTS, Lycée La Brosse, Auxerre, France.

Publication : Grégory Karadjian, Lisa Laboutière, Aurélie Chevillot, Anthony Voisinot, Amandine Blaizot, Marie-Pierre Puech, Dominique Aubert, Veronica Risco-Castillo, Radu Blaga and Isabelle Vallée. *Toxocara cati* and *Toxoplasma gondii* in French birds of prey. *Journal of Wildlife Diseases*. Accepté.

- 2018-2019 : Lisa LABOUTIERE. Développement de stratégie d'identification moléculaire d'Helminthes des viandes. Licence professionnelle Bio-industries et Biotechnologies, AFI24-Sorbonne Université, Paris, France.

Publication : Grégory Karadjian, Carolyn Kaestner, Lisa Laboutière, Emilie Adicéam, Tom Wagner, Annette Johne, Myriam Thomas, Bruno Polack, Anne Mayer-Scholl and Isabelle Vallée. A two-step morphology-PCR strategy for the Identification of Nematode larvae recovered from muscles after artificial digestion at meat inspection. *Parasitology Research*. (2020). <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06899-7>.

Accueil de Chercheurs Etrangers :

- Septembre 2018 : Sargis AGHAYAN. Artificial digestion of muscles from wild animals from Armenia and molecular identification of the *Trichinella* spp. researcher at Yerevan State University, Yerevan, Arménie.
- Novembre 2018 : Carolyn KAESTNER. Training of PCR and sequencing methods for the identification of not-*Trichinella* isolates of Nematodes. Doctorante du BfR, Berlin, Allemagne.

5. Financements et contrats de recherche

- 2020-2023 : Parasites dans les produits de la pêche : étude de leur distribution, de leur potentiel zoonotique et de la perception par le consommateur (PaPerFish). Financement par la région Haut-de-France – AAP S (Total cost : 299 441 euros / Anses cost: 149 482 euros).
Coordination : Mélanie Gay (Anses Boulogne); G. Karadjian est Partenaire, **leader du WP2**.
- 2020-2021: Armenian National Science and Education Fund Grant (ANSEFG); project: Trichinellosis in Armenia: a hidden risk for outbreak. (Total cost: 4949 euros).
Coordination : Sargis Aghayan; G. Karadjian est partenaire.
- 2020-2022: European Consortium PARADISE; project: PARAsite Detection, ISolation and Evaluation. EJP One Health support: JRP, priority topic ET2.2. (22 partners; Total cost: 2 456 442 euros /Anses total costs: 243 559 euros). **Core Group member and Task 4.1 deputy leader**.
- 2019: Financial support of a 3 years PhD student by EJP One Health (44% for 3 years) – Anses (56%); project: « Development of an aptamer-based test for trichinella detection (AptaTrich) » (Total cost: 135 000 euros). **Leader**.
- 2018: Obtention d'une bourse de mission courte "STSM" dans le cadre de l'action Cost Euro-FBP; Projet: « Training of MALDI-TOF MS for the identification of *Trichinella* isolates » au BfR, Berlin. **Leader**.
- 2017: Acquisition of a MALDI-TOF (Alfort-TOF), DIM 1-Health Call (Total cost: 238 000 euros).
Coordination: Henri-Jean Boulouis et Sylvain Bellier ; G Karadjian est partenaire.
- 2017: Acquisition of a confocal microscope (SAMiCAI), DIM 1-Health Call (Total cost: 232 000 euros). **Leader**.
- 2017: Strengthening of the -omics potential for the study of pathogens in animal health at JRU Bipar and at the alfort site (PARA-DIM), DIM 1-Health Call (Total cost: 94 000 euros).
Coordination: Nadia Haddad ; G Karadjian est partenaire.
- 2015: Financial support for a Master 2 student (Alfort Veterinary School). **Leader**.
- 2014 : Action Transversale du Muséum (ATM) « MICROORGANISMES, ACTEURS CLÉS DES ÉCOSYSTÈMES ». Project: « Molecular characterization of inflammation during lung migration of infective stages filarial ». **Leader**.
- 2013: Travel Grant from Malaria RCN to present a poster at the "the International Conference on Malaria and Related Haemosporidian Parasites of Wildlife". **Leader**.

6. Activités d'enseignement

- Depuis 2017 : Cours « Les Hématozoaires aviaires », Diplôme d'Etat de Pathologies Aviaires, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. *Bi-annuel*.
- Depuis 2016 : Cours « Les trichinelloses », Master 2 Zoonoses et environnement, UE1 zoonoses, Faculté de Pharmacie de Limoges. *Annuel*.
- Depuis 2016 : Co-organisateur du stage de formation des Techniciens d'Analyse Vétérinaire au « diagnostic règlementaire des trichinelloses animales » pour les laboratoires agréés et accrédités (9 stages, 10 participants/stage). *1 à 2 stages par an*.
- De 2011 à 2014 : TP/TD « Ecdysozoaires, parasites et vecteurs de maladie », Licence SdV 2ème et 3ème année, Université UPMC-Paris VI.
- 2013 : Cours UDV22 « Diversité fonctionnelle et structurale des protozoaires », MASTER 2 « Évolution, Patrimoine Naturel et Sociétés », spécialité « Unité et Diversité du Vivant », MNHN / Université UPMC-Paris VI.
- 2013 : Cours « Biodiversité et adaptation des parasites », Master « Ecologie, Biodiversité, Evolution », MNHN / Université UPMC-Paris VI.

7. Activité dans des sociétés savantes

- Depuis 2020 : **Vice-Président élu** de la Société Française de Parasitologie
- Depuis 2018 : Membre de la Société Européenne des Nématologistes
- Depuis 2017 : Membre de la commission International de la Trichinellose
- Depuis 2017 : Membre du Conseil d'Administration élu de la Société Française de Parasitologie
- 2014-2017 : Membre de la Société Britannique de Parasitologie
- Depuis 2013 : Membre de la Société Française de Parasitologie

8. Autres activités scientifiques

- 2018, 2020 et 2021: Expertise de projets de Recherche dans le cadre de l'Appel à Projet de Recherche de l'Institut Français du Cheval et de l'Equitation (IFCE)
- 2018 : Président du jury d'attribution des bourses Boehringer Ingelheim Veterinary Scholars Program
- 2017 : Co-organisation du symposium CLIPS2017
- Depuis 2016 : Re-lecteur pour des journaux à comité de lecture (44 articles) :
 - Animals, 1 article
 - Antibiotics, 1 article
 - Biochimie, 1 article
 - Biologia, 1 article
 - Food Microbiology, 1 article
 - Infection, genetics and Evolution, 1 article
 - International Journal for Parasitology, 1 article
 - International Journal of Biological Macromolecules, 1 article
 - JIRSc, 1 article
 - Journal of Fish Diseases, 1 article
 - Journal of Microbiology & experimentation, 3 articles
 - Journal of Wildlife Diseases, 1 article
 - Life, 1 article
 - Microorganisms, 2 articles
 - Nature Scientific reports, 2 articles
 - Open Life Sciences, 1 article
 - Open Veterinary Science, 1 article
 - Parasite, 11 articles
 - Parasites & Vectors, 3 articles
 - Parasitology International, 1 article
 - Parasitology Research, 4 articles
 - Pathogens, 4 articles
 - PLOs NTD, 2 articles
 - Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 1 article
 - Vaccines, 1 article
 - The Raffles Bulletin, 1 article
 - Veterinary Parasitology, 2 articles
- 2016 : Membre du jury de thèse de Pharmacie (Dr Charlotte Calvet)
- Depuis 2016 : Correspondant Hygiène et Sécurité de l'UMR Bipar
- 2015-2018 : Membre du comité d'éthique Recherche Clinique (COMERC) de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA)
- Depuis 2015 : Organisateur des séminaires scientifiques de l'UMR Bipar (Co-organisateur avec Ladislav Simo depuis 2018)
- Membre de comités de suivi de thèses :

- 2015-2017 : Frédéric Fercoq (Directrice: Dr Coralie Martin), MNHN, Paris
- Depuis 2019 : Sirine Militi (Directeur : Olivier Verneau), Perpignan
- Depuis 2019 : Maureen Duflot (Directrice : Mélanie Gay), Boulogne-sur-Mer
- Depuis 2021 : Lisa le Dortz (Directeur : Henri-Jean Boulouis), Maisons-Alfort
- Depuis 2021 : Jimmy Fedna (Directeur :Jimmy Raoul), Besançon

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

1. Publications

19 articles publiés dont **10 en premier auteur et 3 en dernier auteur**, et 2 chapitres de livres.

- [Publications dans des journaux internationaux à comité de lecture](#)

1. **Karadjian G**, Laboutière L, Chevillot A, Voisinot A, Blaizot A, Puech MP, Aubert D, Risco-Castillo V, Blaga R and Vallée I. *Toxocara cati* and *Toxoplasma gondii* in French birds of prey. *Journal of Wildlife Diseases*. Accepted.
2. Niederlender S, Fontaine JJ, **Karadjian G**. Potential applications of aptamers in Veterinary Sciences. *BMC Veterinary Researches*, 2021. 52:79
3. Ait-Ammar N, **Karadjian G**, Foulet F, Chouk R, Gautier F, Ortonne N, Yera H, Botterel F. Really had it on the tip of the tongue. *Clinical Microbiology and Infection*, 2021, ISSN 1198-743X
4. **Karadjian G**, Kaestner C, Laboutière L, Adicéam E, Wagner T, Johné A, Thomas M, Polack B, Mayer-Scholl A, Vallée I. A two-step morphology-PCR strategy for the Identification of Nematode larvae recovered from muscles after artificial digestion at meat inspection. *Parasitology Research*. (2020).
5. **Karadjian G**, Bilska-Zajac E, Bahn P, Py JS, Johné A, Gassilloud B, Rózycki M, Cencek T, Mayer-Scholl A, Vallée I. Species identification of *Trichinella* originated from various host and different geographical location by MALDI-TOF. *Experimental parasitology*. 2020, 107890.
6. Barriet R, Devez A, Dupouy-Camet J, **Karadjian G**, Plavsa D, Chyderiotis G, Vallee I, Sofronic-Miloslavjevic L, Year H. A common source for a trichinellosis outbreak reported in France and Serbia in 2017. *Eurosurveillance*. 2020;25(24):pii=1900527.
7. Grigoryan G, Aghayan S A, Gevorgyan H, Malkhasyan A, Vallée I and **Karadjian G**. The first report of *Trichinella britovi* in Armenia. *Iranian Journal of Parasitology*. 2020; 15 (3): 452-456.
8. Puech MP, Chavatte JM, Landau I, **Karadjian G**. Haemoparasites of falcons in France: a two years survey in the Cevennes, with description of two new Haemoprotozoan species from poly-parasitized birds. *Journal of Natural History*. 2019; 53 (33–34): 2023–2037.
9. Chavatte JM, **Karadjian G**, Landau I. Half a century after its discovery, new insights on *Anthemiosoma garnhami* (Sporozoa, Piroplasmida): morphology, molecular characterisation and phylogenetic position. *Parasitology Research*. 2018 Oct 15.
10. **Karadjian G**, Heckmann A, La Rosa G, Pozio E, Boireau P, Vallée I. Molecular identification of *Trichinella* species by multiplex PCR: new insight for *Trichinella murelli*. *Parasite*. 2017; 24 (52).
11. **Karadjian G**, Fercoq F, Pionnier N, Vallarino-Lhermitte N, Lefoulon E, Nieguitsila A, Specht S, Carlin LM, Martin C. Migratory phase of *Litomosoides sigmodontis* filarial infective larvae is associated with pathology and transient increase of S100A9 expressing neutrophils in the lung. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2017;11(5).
12. **Karadjian G**, Hassanin A, Saintpierre B, Gembu Tungaluna G-C, Arieu F, Ayala F J, Landau I and Duval L. A highly rearranged mitochondrial genome in *Nycteria* parasites (Haemosporidia) from bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016 ; 113(35):9834-9.
13. Pionnier N, Brotin E, **Karadjian G**, Hemon P, Gaudin-Nomé F, Vallarino-Lhermitte N, Nieguitsila A, Fercoq F, Aknin M.-L, Marin-Esteban V, Chollet-Martin S, Schlecht-Louf G, Bachelerie F and Martin C. Neutropenic Mice Provide Insight into the Role of Skin-Infiltrating Neutrophils in the Host Protective Immunity against Filarial Infective Larvae. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2016; 10(4)
14. **Karadjian G**, Chavatte J-M and Landau I. Systematic revision of the Adeleid hemogregarines, with creation of *Bartazoon* n. g., reassignment of *Hepatozoon argantis* Garnham, 1954 to *Hemolivia*, and molecular data on *Hemolivia stellata*. *Parasite*. 2015; 22:31.

15. **Karadjian G**, Martinsen E, Duval L, Chavatte J.-M and Landau I. *Haemoproteus ilanpapernai* n. sp. (Apicomplexa, Haemoproteidae) in *Strix seloputo* from Singapore: morphological description and reassignment of molecular data. *Parasite*. 2014; 21:17.
16. **Karadjian G**, Berrebi D, Dogna N, Vallarino-Lhermitte N, Bain O, Landau I, Martin C. Co-infection restrains *Litomosoides sigmodontis* filarial load and plasmodial *P. yoelii* but not *P. chabaudi* parasitaemia in mice. *Parasite*. 2014; 21:16.
17. **Karadjian G**, Puech MP, Duval L, Chavatte JM, Snounou G, Landau I. *Haemoproteus syrnii* in *Strix aluco* from France: morphology, stages of sporogony in a hippoboscid fly, molecular characterization and discussion on the identification of *Haemoproteus* species. *Parasite*. 2013; 20:32.
18. Bouchery T, Lefoulon E, **Karadjian G**, Nieguitsila A, Martin C. The symbiotic role of *Wolbachia* in Onchocercidae and its impact on filariasis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013;19(2):131-40.
19. Landau I, Chavatte JM, **Karadjian G**, Chabaud A, Beveridge I. The haemosporidian parasites of bats with description of *Sprattiella alecto* gen. nov., sp. nov. *Parasite*. 2012;19(2):137-46
 - [Chapitre de livre](#)
20. Boireau P, Vallée I, **Karadjian G**, Wang X and Mingyuan L. Chapter 16. Antigenic shift during *Trichinella* cycle, consequences for vaccine developments. *Editeur: Fabrizio Bruschi*. In *Trichinella and Trichinellosis*, 2021, Pages 455-516.
21. Yera H., **Karadjian G**., Dupouy-Camet J. *Trichinella*. in Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier, 2021. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00177-4>.
 - [Articles dans des journaux professionnels](#)
22. Vallée I, Blaizot A, Heckmann A, Chevillot A, **Karadjian G**, Zanella G, Laborieux J et Goulinet M. Bilan de surveillance de *Trichinella* spp chez les animaux de boucherie sur la période 2017 – 2019 : évolution de la réglementation. *Bulletin Epidémiologique Santé Animale –Alimentation*. Mai 2021.
 - [Articles soumis dans des journaux internationaux à comité de lecture](#)
23. **Karadjian G**, Neveu C, Heckmann A, Gasteau A, Boireau P, Martin C, Blanchard A and Vallée I. Investigating anthelmintic targets in adult *Trichinella spiralis* by RNA interference. Soumis à *Parasite*, en révision.
24. Aghayan SA, Grigoryan G, Harutyunyan T, Gevorgyan H, Rukhkyan M, Muradyan V, **Karadjian G**, Marsot M, Moutailler S and Pollet T. Drivers of Diversity and Distribution of Bacterial and Parasitic Tick-Borne Pathogens in Armenia, Transcaucasia. Soumis à *Parasitology International*.
25. Wang A, Heckmann A, Caignard G, Vitour D, Liu M, Bruneau S, Boireau P, **Karadjian G*** and Vallée I*. *Trichinella spiralis* New Born larvae specific protein interacts with host's cell vimentin. Soumis à Parasitology Research. * equal contribution.
 - [Articles en préparation pour soumission proche](#)
25. Wang A, Yera H, Arieu F, Vallée I and **Karadjian G**. *T. spiralis* NBL1 regulates the expression of two host cells' heat shock proteins. En préparation.
26. Ning C, **Karadjian G*** and Simo L*. A First Insight into the *Trichinella spiralis* Neurobiology. * equal contribution. En préparation.
27. Application of aptamers in Parasite detection. Brosseau N., Mayer-Scholl A., Vallée I., Ndao M., **Karadjian G**. en préparation.

2. Communications à des congrès

- [Modérateur de sessions](#)

- Co-chair of “Genomics and proteomics” session. *Fifteenth International Conference on Trichinellosis, Cluj-Napoca, Romania, 26-30 août 2019*.

- Co-chair of “Applied Research Probes in vivo” session. *CLIPS2017 “Multiscale Live imaging in Human, Animal and Plant Health”*, Gif-sur-Yvette, France, 12-13 septembre 2017.
 - Co-chair of “A moment of transdisciplinary exchanges and sharing: how to anticipate the future?” round table. *CLIPS2017 “Multiscale Live imaging in Human, Animal and Plant Health”*, Gif-sur-Yvette, France, 12-13 septembre 2017.
- [Communications invitées](#)
 1. [Vallée I](#), Boireau P, **Karadjian G**, Polack B. Zoonotic foodborne parasites in wild boar meat: how *Trichinella* inspection allows identification of other helminths. *7th Belgian Wildlife Diseases Society Symposium "Food-Borne Pathogens"*, Brussell, Belgium, 19 octobre 2018.
 2. **Karadjian G**. New proteomic and molecular tools for the identification and the functional characterization of target proteins for therapeutic, vaccine and diagnostics in the parasitic nematode *Trichinella*. *Workshop - Science from the first hand: Parasitology scientists school*, Erevan, Armenia, 05-07 juin 2017.
 3. **Karadjian G**. Use of innovative tools for the identification and functional characterization of protein involved in the virulence of *Trichinella* spp. *Liverpool School of Tropical Medicine Seminar Program*, Liverpool, UK, 26 octobre 2016.
 - [Communications orales](#)
 4. [Simone M Cacciò](#) (on behalf of the Paradise Consortium). A brief excursion to PARADISE. *EMOP, changing climate, changing parasites*, Belgrade, Serbie, 12-16 octobre 2021.
 5. [Simone M Cacciò](#) (on behalf of the Paradise Consortium). Comparative genomics of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* isolates from Europe: steps towards the development of novel genotyping schemes. *EMOP, changing climate, changing parasites*, Belgrade, Serbie, 12-16 octobre 2021.
 6. [Vallée I](#), Adjou K, Blaga R, Boireau P, Thomas M, Polack B, **Karadjian G**. OIE Collaborating centre for Foodborne Zoonotic parasites (European region): overview of activities. *EMOP, changing climate, changing parasites*, Belgrade, Serbie, 12-16 octobre 2021.
 7. [Brosseau N](#), Vallee I, Mayer-Scholl A, Ndao M, **Karadjian G**. Development of an aptamer based test for *Trichinella* detection. *3rd Annual Scientific Meeting of the One Health EJP*, Copenhagen (Danemark) and Online, 9-11 juin 2021.
 8. [Caccio S](#), Troell K, Klotz C, Ostlund E, Vatta P, Sroka J, Gomes J, Betson M, Plutzer J, Jokelainen P, Stensvold CR, Davidson R, **Karadjian G**, Bujila Y, Blanchard Y. Comparative genomics of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* isolates from Europe: towards the development of novel genotyping schemes. *3rd Annual Scientific Meeting of the One Health EJP*, Copenhagen (Danemark) and Online, 9-11 juin 2021.
 9. **Karadjian G**. WP4_T1 / Development of pre-DNA extraction enrichment strategies : aptamers. « PARADISE » *Kick-off meeting*, Rome, Italy, 10-11 février 2020.
 10. **Karadjian G**. Species identification by MALDI-TOF, the example of *Trichinella*. *First French-Czech Tick Meeting 1 (FCTM 1)*, Maisons-Alfort, France, 24-25 octobre 2019.
 11. **Karadjian G**. Aptamer-detection of pathogens. *First French-Czech Tick Meeting 1 (FCTM 1)*, Maisons-Alfort, France, 24-25 octobre 2019.
 12. [Wang A](#), Heckmann A, Caignard G, Vitour D, Liu M, Bruneau S, Boireau P, Vallée I, **Karadjian G**. The New-Born Larvae stage specific serine protease NBL1 interacts with the host's cell Vimentin. *Fifteenth International Conference on Trichinellosis*, Cluj-Napoca, Romania, 26-30 août 2019.
 13. Barruet R, Devez A, Dupouy-Camet J, Gely F, **Karadjian G**, Plavsca D, Chydériotis G, Vallée I, Sofronic-Milosavljevic L, [Yera H](#). Backyard pigs: a common source for a trichinellosis outbreak reported in France and Serbia in 2017. *Fifteenth International Conference on Trichinellosis*, Cluj-Napoca, Romania, 26-30 août 2019.

14. **Karadjian G**, Heckmann A, Blanchard A, Grasteau A, Boireau P, Neveu C, Martin C, Vallée I. Transient inactivation of *Trichinella spiralis* adults unc-63 by RNA interference. *Fifteenth International Conference on Trichinellosis, Cluj-Napoca, Romania, 26-30 août 2019*.
15. **Karadjian G**, Bahn P, Johne A, Gassiloud B, Py J-S, Mayer-Scholl A, Vallée I. *Trichinella* species identification by MALDI-TOF. *Final meeting for COST Action Euro-FBP (FA1408) and FoodBorne Parasites Conference, Oeiras, Portugal, 13-14 février 2019*.
16. **Boireau P**, Vallée I, Wang X, **Karadjian G**, Liu M. Host pathogen interaction: antigenic shift in *Trichinella* invasion. *14th International COngress of Parasitology (ICOPA), Daegu, South Korea, 19-24 août 2018*.
17. **Karadjian G**, Bahn P, Johne A, Gassiloud B, Py J-S, Mayer-Scholl A, Vallée I. MALDI-TOF pour l'identification d'espèces de *Trichinella*. *Congrès de la Société Française de Parasitologie, Nice, France, 16-18 mai 2018*.
18. **Martin C**, **Karadjian G**, Fercoq F, Vallarino-Lhermitte N, Swartz M, Specht S, Carlin L. Lessons from *Litomosoides sigmodontis*: Filarial larvae entry into lymphatics and cardiopulmonary migration. *26th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Kuala Lumpur, Malaysia, 04-08 septembre 2017*.
19. **Vallée I**, **Karadjian G**, Marrucci G. Detection of *Toxocara cati* larvae in meat: potential source of human contamination? *Twelfth Workshop of National Reference Laboratories for Parasites, Rome, Italy, 18-19 mai 2017*.
20. **Barruet R**, Van Cauteren D, Chydériotis G, **Karadjian G**, Vallée I, **Yera H**. Investigation of the last trichinellosis outbreak in France: February-March 2017. *COST Action FA1408 / European Network for Foodborne Parasites in Europe (EURO-FBP), WG discussion and MC meeting / Outbreaks and outbreak investigations, Rome, Italy, 16-17/05/2017*.
21. **Karadjian G**, Adicéam E, Thomas M, Polack B, Vallée I. *Toxocara cati* chez le sanglier, hôte paraténique: potentielle source de contamination humaine en France? *Congrès de la Société Française de Parasitologie, Toulouse, France, 29-30 mars 2017*.
22. **Fercoq F**, **Karadjian G**, Pionnier N, Vallarino-Lhermitte N, Specht S, Carlin L, Martin C. Filarial infection and pulmonary inflammation in the *Litomosoides sigmodontis* murine model of filariasis. *EMOP XII – the 12th European Multicolloquium of Parasitology, Turku, Finland, 20-24 juillet 2016*.
23. **Karadjian G**, Heckmann A, Grasteau A, Calvet C, Boireau P, Bellier S, Vallée I. New proteomic and molecular tools for the identification and the functional characterization of target proteins for therapeutic, vaccine and diagnostics in the parasitic nematode *Trichinella*. *Journées LUNEPAR (Lutte contre les Nématodes Parasites), Tours, France, 12-13 mai 2016*.
24. **Karadjian G**, Fercoq F, Pionnier N, Vallarino-Lhermitte N, Specht S, Carlin L, Martin C. Migration des stades infestant de la filaire murine *Litomosoides sigmodontis* et réponse inflammatoire associée chez la souris BALB/c. *Congrès de la Société Française de Parasitologie, Grenoble, France, 23-24 mars 2016*.
25. **Karadjian G**, Heckmann A, Martin C, Blanchard A, Bellier S, Boireau P, Vallée I. Développement de nouvelles stratégies de lutte contre les nématodes parasites: vers la caractérisation fonctionnelle de cibles thérapeutiques ou vaccinales chez *Trichinella*. *Congrès de la Société Française de Parasitologie, Bordeaux, France, 21-22 mai 2015*.
26. **Pionnier N**, Brotin E, **Karadjian G**, Hemon P, Gaudin-Nomé F, Vallarino-Lhermitte N, Nieguitsila A, Aknin ML, Marin-Esteban V, Chollet-Martin S, Schlecht-Louf G, Bachelerie F, Martin C. Protective immunity against filarial infective larvae requires skin resident neutrophils. *British Society for Parasitology Spring Meeting, Liverpool, UK, 16-18 avril 2015*.
27. **Pionnier N**, Brotin E, **Karadjian G**, Hemon P, Gaudin-Nomé F, Vallarino-Lhermitte N, Nieguitsila A, Aknin ML, Marin-Esteban V, Chollet-Martin S, Schlecht-Louf G, Bachelerie F, Martin C. Protective immunity against filarial infective larvae requires skin resident neutrophils. *First Meeting of the Neutrophil Club, Paris, France 10 avril 2015*.

28. Pionnier N, Brotin E, **Karadjian G**, Vallarino-Lhermitte N, Nieguitsila A, Hemon P, Aknin ML, Bachelerie F, Martin C. Importance de l'axe de signalisation CXCL12/CXCR4 dans le processus de résistance à l'infection filarienne. *Congrès de la Société Française de Parasitologie, Reims, France, 21–23 mai 2014*.

29. **Karadjian G**, Berrebi D, Landau I, Bain O, Martin C. Parasitology and inflammation in kidneys and lungs in a murine model of co-infection *Plasmodium*/filarial nematode. *British Society for Parasitology, Cambridge, UK, 06-09 avril 2014*.

30. Pionnier N, Brotin E, **Karadjian G**, Vallarino-Lhermitte N, Nieguitsila A, Hemon P, Aknin ML, Bachelerie F, Martin C. Impaired CXCR4/CXCL12 chemokine receptor/ligand axis limits filarial infection. *LabEx LERMIT Annual Symposium, Orsay, France, 26 novembre 2013*.

31. **Karadjian G**, Landau I, Bain O, Martin C. Etude cinétique des lésions rénales et pulmonaires d'un modèle murin de co-infection paludisme – filariose. *Congrès de la Société française de parasitologie, Dijon, France, 16 mai 2013*.

32. **Karadjian G**, Landau I, Bain O, Martin C. Etude des lésions anatomo-pathologiques sur un modèle murin de co-infection paludisme – filariose. *Congrès Carrefour Pathologie, Paris, France, 19 novembre 2012*.

- [Communications affichées](#)

33. N. Brosseau, I. Vallée, A. Mayer-Scholl, M. Ndao, **G. Karadjian**. Development of an aptamer-based test for *Trichinella* detection. *One Health EJP Annual Scientific Meeting, Virtual Event/Online, 27-29 août 2020*.

34. **Paradise Consortium**. PARASiteDetection, Isolation and Evaluation –PARADISE. *One Health EJP Annual Scientific Meeting, Virtual Event/Online, 27-29 août 2020*.

35. Aghayan S, Grigoryan G, Harutyunyan T, Grevorgyan H, Rukayan M, Muradyan V, **Karadjian G**, Marsot M, Moutailler S, Pollet T. Diversity and distribution of tick-borne bacteria and parasites in Armenia. *2nd Asian Pacific Rickettsia conference, Chiang Rai, Thailand 03-06 novembre 2019*.

36. Wang Anqi, Heckmann A, Caignard G, Vitour D, Liu MY, Bruneau S, Boireau P, Vallée I, **Karadjian G**. *Trichinella spiralis* stage specific serine protease NBL1 interacts with the host's cell Vimentin. *Journée « Sciences de la Vie », Ecole doctorale SVS, UPE, France, 09 octobre 2019*.

37. **Karadjian G**, Bahn P, Johne A, Gassiloud B, Py J-S, Mayer-Scholl A, Vallée I. *Trichinella* species identification by MALDI-TOF. *Fifteenth International Conference on Trichinelosis, Cluj-Napoca, Romania, 26-30 août 2019*.

38. Grigoryan G, Aghayan SA, Grevorgyan H, Malkhasyan A, Vallée I, **Karadjian G**. The first report of *Trichinella britovi* in Armenia. *Fifteenth International Conference on Trichinelosis, Cluj-Napoca, Romania, 26-30 août 2019*.

39. Ammar NA, **Karadjian G**, Foulet F, Chouk R, Gaultier F, Ortonne N, Yera H, Botterel F. *Trichinella spiralis* stayed more than 30 years in human tongue. *Fifteenth International Conference on Trichinelosis, Cluj-Napoca, Romania, 26-30 août 2019*.

40. **Karadjian G**, Bahn P, Johne A, Gassiloud B, Py J-S, Mayer-Scholl A, Vallée I. *Trichinella* species identification by MALDI-TOF. *Fourteenth Workshop of National Reference Laboratories for Parasites, Rome, Italy, 23-24 mai 2019*.

41. **Karadjian G**, Bahn P, Johne A, Gassiloud B, Py J-S, Mayer-Scholl A, Vallée I. *Trichinella* species identification by MALDI-TOF. *1st Annual Scientific Meeting of the One Health European Joint Programme on Food-borne Zoonoses, Antimicrobial Resistance and Emerging Threats, Dublin, Ireland 21-24 mai 2019*.

42. Vallée I, Boireau P, **Karadjian G**, Polack B. How *Trichinella* spp. Inspection allows identification of other helminths zoonotic foodborne parasites in wild boar meat. *Final meeting for COST Action Euro-FBP (FA1408) and FoodBorne Parasites Conference, Oeiras, Portugal, 13-14 février 2019*.

43. Grigoryan G, Aghayan S, Grevorgyan H, Malkhasian A, Vallée I, **Karadjian G**. The first report of *Trichinella britovi* in Armenia.. *Final meeting for COST Action Euro-FBP (FA1408) and FoodBorne Parasites Conference, Oeiras, Portugal, 13-14 février 2019*.
44. Vallée I, **Karadjian G**, Boireau P, Polack B. Epidemiological activities of the French NRL for 2017. *Thirteenth Workshop of National Reference Laboratories for Parasites, Rome, Italy, 23-24 mai 2018*.
45. Vallée I, **Karadjian G**, Adicéam E, Blaizot A, Chevillot A, Ducry T, Heckmann A, Thomas M, Boireau P, Polack B. Recent epidemiological activities of the French National Reference Laboratory. *Twelfth Workshop of National Reference Laboratories for Parasites, Rome, Italy, 18-19 mai 2017*.
46. Bellier S, Calvet C, **Karadjian G**, Henry C, Heckmann A, Chevillot A, Boireau P, Vallée I. Etude comparative de deux espèces de Trichine par « shotgun proteomics ». *Congrès de la Société Française de Parasitologie, Toulouse, France, 29-30 mars 2017*.
47. Pionnier N, Tamarozzi F, Johnston K, Midgley A, Brotin E, **Karadjian G**, Martin C, Hemon P, Gaudin-Nomé F, Bachelerie F, Edwards S, Turner J, Taylor M. The role of neutrophils and NETs in the innate immune response to filarial infection. *British Society for Immunology / NVVI Congress 2016, Liverpool, UK, 06-09 décembre 2016*.
48. Calvet C, **Karadjian G**, Henry C, Heckmann A, Chevillot A, Boireau P, Vallée I, Bellier S. New proteomic tools for the identification of proteins influencing the infectivity of the parasitic nematode *Trichinella*. *2nd international symposium of microgenomics, Paris, France, 2-3 juin 2016*.
49. **Karadjian G**, Fercoq F, Pionnier N, Vallarino-Lhermitte N, Specht S, Carlin L, Martin C. *Litomosoides sigmodontis* filarial infective larvae migrate through the lungs increasing s100A9 in neutrophils. *Molecular and Cellular Biology of Helminth Parasites XI, Hydra, Greece, 31 août – 05 septembre 2015*.
50. **Karadjian G**, Fercoq F, Vallarino-Lhermitte N, Specht S, Carlin L, Kilarski V, Swartz M, Martin C. Unravelling the filarial larvae migrations: lessons from *Litomosoides sigmodontis* mouse model. *Molecular and Cellular Biology of Helminth Parasites XI, Hydra, Greece, 31 août – 05 septembre 2015*.
51. **Karadjian G**, Landau I, Bain O, Martin C. A murine model of *Plasmodium* and filariasis co-infection: parasitology and immune responses. *Pathobiome : Pathogens in microbiotas in hosts, Maisons-Alfort, France, 24-26 juin 2015*.
52. Pionnier N, Brotin E, **Karadjian G**, Vallarino-Lhermitte N, Nieguitsila A, Hemon P, Aknin ML, Bachelerie F, Martin C. Impaired CXCR4/CXCL12 chemokine receptor/ligand axis limits filarial infection. *British Society for Parasitology, Cambridge, UK, 06-09 avril 2014*.
53. Pionnier N, Brotin E, **Karadjian G**, Vallarino-Lhermitte N, Nieguitsila A, Hemon P, Aknin ML, Bachelerie F, Martin C. Impaired CXCR4/CXCL12 chemokine receptor/ligand axis limits filarial infection. *15th International Congress of Immunology, Milan, Italy, 26 août 2013*.
54. **Karadjian G**, Puech MP, Duval L, Chavatte JM, Snounou G, Landau I. *Haemoproteus syrnii* in *Strix aluco* from France: morphology, molecular characterisation, and sporogony in a Hippoboscid fly (*Ornithomyia* sp.). *International Conference on Malaria and Related Haemosporidian Parasites of Wildlife, Vilnius, Lithuania, 09 août 2013*.

ACTIVITES DE RECHERCHE

PREAMBULE

Durant le stage réalisé au Museum National d'Histoire Naturelle de Paris (sous la direction du Dr Coralie Martin et du Pr Irène Landau), dans le cadre de mon Diplôme de l'EPHE (Ecole Pratique des Hautes Etudes), équivalent à un Master 2, je me suis initié à la parasitologie comparée et à l'étude des relations hôtes-parasites dans la faune sauvage et sur modèles expérimentaux. J'ai poursuivi ces travaux passionnant pendant ma thèse dans la même équipe. J'ai alors pu décrire/re-décrire des espèces d'Apicomplexes du genre *Haemoproteus*, proche de *Plasmodium*, chez leurs hôtes rapaces ainsi que chez le vecteur invertébré. L'étude de la co-infection expérimentale murine par *Plasmodium chabaudi/Plasmodium yoelii* et la filaire *Litomosoides sigmodontis* a permis de démontrer un impact de la présence du protozoaire sur l'infection filarienne quelle que soit l'espèce de *Plasmodium* mais que l'impact du nématode sur l'infection plasmodiale, et sur les pathologies et l'inflammation associées, était dépendant de l'espèce de *Plasmodium*. D'autre part, la première phase du cycle de la filaire murine, la migration du point d'inoculation au niveau de la peau jusqu'à sa localisation tissulaire dans la cavité pleurale, a pu être complétée, avec notamment un passage par la circulation générale puis trans-pulmonaire par les larves infestantes. Il a été possible de montrer que ce phénomène génère une inflammation locale au niveau des poumons, caractérisée par des pétéchies, la formation de granulomes et le recrutement de polynucléaires neutrophiles associés à la libération dès les premières heures de molécules inflammatoires telle que S100A9 et l'IL-1 β . Les jours suivants, des polynucléaires éosinophiles et des macrophages sont recrutés dans les espaces broncho-alvéolaires et pleuraux, sous l'influence de l'IL-4 et de MCP-1, suggérant le début de la mise en place de la réparation des tissus lésés. Ces travaux de thèse ont été récompensés par le prix de thèse de la Société Française de Parasitologie.

A l'issue de ma thèse, j'ai intégré l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation de l'Environnement et du Travail (Anses) tout d'abord pour un contrat post-doctoral, en janvier 2015, financé par le DIM (Domaine d'Intérêt Majeur) « Maladies Infectieuses », de la région Ile-de-France, puis, en octobre 2015, en tant que Chargé de Projet de Recherche. J'ai ainsi intégré le Laboratoire de Santé Animale (LSAn), dirigé par le Dr Pascal Boireau, affecté à l'équipe Paralim (Parasites zoonotiques transmis par les aliments), au sein de l'Unité Mixte de Recherche en Biologie moléculaire et Immunologie Parasitaires (UMR BIPAR).

INTRODUCTION AUX ZONOSSES PARASITAIRES D'ORIGINE ALIMENTAIRE

À l'ère moderne, caractérisée par la mondialisation, qui transforme le marché alimentaire en une pratique de production et de distribution intégrée à grande échelle, les consommateurs ou les producteurs ordinaires ignorent l'origine de leurs aliments et les risques potentiels pour la santé qu'ils comportent (Gajadhar, 2015). Les réglementations gouvernementales ou internationales (avec la FOA et le *Codex Alimentarius*) supervisent la sécurité alimentaire, en particulier dans le cas des bactéries et des résidus chimiques ; la législation actuelle fournit des critères de sécurité alimentaire qui concernent les principaux agents pathogènes bactériens d'origine alimentaire. Cependant, l'attention portée aux parasites d'origine alimentaire dans les pays développés a diminué et tend à être négligée parmi les maladies infectieuses (Utaaker & Robertson, 2015).

Les zoonoses parasitaires sont des infections causées par des agents pathogènes protozoaires ou helminthes, qui sont transmissibles entre les animaux vertébrés et les humains. Les agents parasitaires peuvent passer de l'animal à l'homme de plusieurs façons : par contact direct, par vecteur, par des stades infectieux libérés dans l'environnement ou par voie alimentaire (Hubalek, 2003), voie d'infection la plus courante (Gajadhar, 2015).

Les zoonoses parasitaires sont répertoriées dans le monde entier ; certaines d'entre elles peuvent avoir un caractère endémique et d'autres peuvent provoquer de vastes épidémies, menaçant gravement non seulement la santé et la vie humaine, mais pouvant également être responsables de la propagation de maladies infectieuses dans la production animale (Grisi, 1990). Cela peut également affecter de manière significative l'économie de l'industrie alimentaire car des sommes considérables doivent être consacrées à l'élimination des aliments contaminés du marché (Slaný et al., 2015).

En général, les parasites qui créent des stades infectieux dans les tissus de leurs hôtes sont transmis par l'ingestion de tissus crus ou insuffisamment traités, principalement contaminés (Dawson, 2005). La cuisson de ces tissus avant consommation est un moyen efficace d'éliminer les formes de vie infectieuses des parasites. Si la température adéquate est atteinte dans les tissus entiers, la congélation et la surgélation, le séchage et le salage, réduisent ou éliminent les chances de transmission lorsqu'ils sont correctement appliqués ; d'autre part, les traitements tels que le fumage ou la marinade ne sont pas toujours efficaces (Dorny et al., 2009).

En ce qui concerne les préférences culinaires pour les aliments frais, crus et prêts à consommer, les risques posés par les parasites zoonotiques d'origine alimentaire (FBP) sont en augmentation ; cependant, les mesures obligatoires d'inspection des matières premières et des denrées alimentaires destinées à la consommation humaine pour la présence de parasites n'ont pas encore été établies, à l'exception de l'inspection des viandes pour les cysticerques taeniidés (EC, 2004), le genre *Trichinella* (EC, 2015), le genre *Sarcocystis* et les Anisakidae. En outre, des données précises prenant en compte l'occurrence, les sources de contamination et la transmission des maladies parasitaires ne sont pas disponibles dans les pays développés en raison de la longue période d'incubation, des symptômes légers ou non spécifiques de la maladie et de l'absence ou de l'inadéquation des méthodes de diagnostic en laboratoire (Robertson, 2018). Par conséquent, des programmes de contrôle pratiques et efficaces, comprenant l'éducation concernant la biologie et l'épidémiologie du parasite, la recherche de méthodes d'analyse appropriées et des mesures d'atténuation telles qu'un assainissement et une hygiène appropriée sont cruciales (FAO/OMS, 2014).

À la fin des années 2000, les aliments exempts de parasites sont devenus l'une des orientations prioritaires de la recherche stratégique de l'Union européenne, comme l'indique le cadre d'une vaste coopération internationale de sites scientifiques de premier plan au sein du septième programme-cadre - programme spécifique "Coopération" : Alimentation, agriculture et biotechnologie (FP7-KBBE ; <https://cordis.europa.eu/programme/rcn/851/en>), de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA ; www.efsa.europa.eu) et la Coopération européenne en science et technologie (COST ; www.cost.eu). Les projets résolus dans le cadre de ces programmes devraient contribuer à la production d'aliments meilleurs pour la santé et réduire les risques de leur contamination. Par exemple, l'approche holistique "One Health" est devenue l'esprit du COST ACTION EURO-FBP (A European Network for Foodborne Parasites; www.euro-fbp.org), dont l'objectif principal était de diminuer l'impact des FBP sur

la santé humaine, en établissant un programme de contrôle basé sur les risques pour les FBP contenant des stratégies de protection robustes et appropriées.

Les infections parasitaires alimentaires sont considérées comme négligées en termes de surveillance, de prévention et de traitement (Jones et al., 2014). Ce statut est donné par le fait que la majorité des maladies qu'elles provoquent ont un caractère progressif et chronique plutôt qu'une forme aiguë et sont souvent associées à la pauvreté et aux populations marginalisées. Néanmoins, avec le phénomène de la mondialisation (Robertson et al, 2014), le changement climatique (Utaaker & Robertson, 2015) et les habitudes alimentaires modernes, la situation a changé au cours des dernières années ; les FBP ont eu l'opportunité (Robertson, 2018) de se propager dans de nouveaux endroits (par exemple, la population hôte définitive d'*Echinococcus multilocularis* se propage et augmente en Europe et en Amérique du Nord), d'obtenir de nouvelles voies de transmission (par ex. *Cryptosporidium* spp. sur les produits frais via les engrais organiques), d'affecter de nouvelles populations (par exemple, la popularité croissante des sushis et les infections par *Anisakis* spp.) et même de se manifester par des symptômes inattendus (par exemple, *T. cruzi* provoquant une maladie aiguë après une transmission d'origine alimentaire). Les maladies d'origine alimentaire ont donc fait l'objet d'une attention accrue ces derniers temps et connaissent une "émergence". En 2014, l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) ont dressé une liste des maladies d'origine alimentaire les plus préoccupantes au niveau mondial, en tenant compte du nombre annuel élevé de cas humains touchés par des maladies alimentaires dans le monde et du contexte de la santé animale et de la consommation humaine (FAO/OMS, 2014). Dans cette liste se trouvaient les parasites *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis*, *Trichinella* spp. (autres espèces de *Trichinella*) et *Cryptosporidium*, parasites sur lesquels l'équipe PARALIM travaille.

L'une des thématiques de recherche de l'équipe porte sur le nématode parasite, *Trichinella* spp., responsable d'une zoonose appelée la trichinellose. *Trichinella* spp. est présent dans les viandes (porcs, chevaux, sangliers essentiellement) et responsable de zoonoses alimentaires. Bien que sa détection soit obligatoire (réglementation européenne et internationale) dans les viandes, des cas humains sont régulièrement rapportés. Ceci souligne la complexité des tests de détection de ces parasites dans les aliments. En effet, leur détection repose sur une identification directe du parasite à partir de la matrice carnée, nécessitant une mise en œuvre coûteuse et rigoureuse des procédures associée à une expertise individuelle des analystes. Dans ce contexte, la lutte contre *Trichinella* spp. reste une priorité nationale et internationale et l'évolution vers de nouvelles stratégies est nécessaire afin d'abandonner les tests directs coûteux, ayant une mise en œuvre délicate et dont la fiabilité n'est pas totale et repose essentiellement sur l'expertise des analystes. Dans le contexte international du concept « Une seule santé » (One World, One Health), la lutte contre ces parasites chez l'animal ou chez l'homme est une nécessité afin d'améliorer les conditions sanitaires des populations animales et/ou humaines et de limiter *in fine* la contamination humaine à l'échelle mondiale.

Les outils de lutte contre les parasites nématodes reposent sur plusieurs stratégies :

- L'amélioration des moyens de détection par l'identification de nouvelles cibles antigéniques permettant de définir de nouveaux tests;
- L'ouverture vers de nouvelles perspectives thérapeutiques chez l'Homme et/ou l'animal infecté puisque les résistances aux antihelminthiques classiques sont de plus en plus fréquentes et entraînent des échecs thérapeutiques;

- Le développement de nouvelles stratégies vaccinales afin de contourner les traitements et d'induire une protection des hôtes sensibles et bloquer le cycle parasitaire.

La mise en œuvre de ces trois stratégies nécessite la sélection de protéines candidates qui doivent répondre à plusieurs critères :

- 1/ présenter une fonction clé dans l'invasion de l'hôte ou dans la physiologie du parasite;
- 2/ cette fonction ne doit pas pouvoir être contournée par une autre voie ;
- 3/ être suffisamment distante de la physiologie de l'hôte pour que son ciblage n'ait pas d'impact sur les fonctions biologiques de celui-ci.

Mes travaux de recherche portent sur le développement de ces outils de détection de *Trichinella* spp. mais également sur l'amélioration des outils d'identification d'espèce du genre *Trichinella* lorsque ce parasite est détecté mais également d'outils de détection et d'identification d'autres parasites rencontrés dans des matrices alimentaires.

I. OUTILS DE DETECTION DE TRICHINELLA SPP.

Le test actuel de détection de *Trichinella* est une digestion artificielle pepsique en milieu acide qui nécessite une forte expertise des personnels qui le réalisent, notamment au moment de la lecture finale. Il serait alors idéal de pouvoir développer un test sérologique permettant non seulement d'avoir des résultats plus homogènes et de les multiplier facilement, en travaillant en plaques multi-puits. Une des premières étapes pour développer ces tests est l'identification de cibles utilisables comme biomarqueurs. Certaines de ces molécules peuvent également être des cibles thérapeutiques et vaccinales. Elles sont en lien avec le cycle biologique du parasite puisqu'elles interviennent à chaque étape de son développement. Il est donc essentiel d'en comprendre les interactions avec l'hôte.

Le cycle de vie de *T. spiralis* se déroule au sein d'une seule espèce hôte mais peut toucher tous les mammifères monogastriques, des reptiles et des oiseaux. L'infection commence par l'ingestion de larves musculaires (ML) infectieuses contenues dans les muscles et la digestion de la capsule protectrice dans l'estomac de l'hôte. Les ML migrent vers l'intestin grêle où elles pénètrent dans l'épithélium intestinal et subissent quatre mues sur une période de 30 heures pour atteindre la maturité sexuelle. Les adultes s'accouplent à l'intérieur de l'épithélium intestinal et l'embryogenèse a lieu 4 jours après l'infection (pi). Chaque femelle libère des larves nouvelles (NBL) environ 4-6 jours pi (Gagliardo, et al., 2002 ; Gottstein, et al., 2009). Les NBL sortent de l'épithélium par la surface baso-latérale, migrent dans la circulation sanguine et lymphatique et envahissent les cellules des muscles squelettiques striés. Les principales cellules sécrétrices des parasites, les stichocytes, augmentent en nombre d'environ 20 au jour 1 à environ 50-55 au jour 19. De multiples protéases ont été signalées dans les produits excrétoires/sécrétoires des nématodes parasites, leurs rôles potentiels impliquant la pénétration des tissus de l'hôte, la mue et l'évasion des défenses innées de l'hôte (Hewitson, Grainger et Maizels, 2009 ; Yang et al., 2015 ; Abuzeid et al., 2020). La plupart des protéases de *Trichinella spiralis*, comme TsSerP (Trap et al., 2006) ou TspSP-1.2 (Wang et al., 2013, p. 5), sont excrétées à tous les stades, mais quelques-unes sont spécifiques à un stade, comme TspSP1, excrétée par les stichocytes des larves musculaires (Romaris et al., 2002).

a. Mise en place d'un outil innovant chez *T. spiralis* pour l'étude des fonctions de protéines : l'interférence à l'ARN

i. Chez l'adulte

Afin d'étudier les fonctions des protéines de *T. spiralis*, différents outils peuvent être utilisés dont l'ARN interférence (RNAi) qui permet d'obtenir des organismes transitoirement KO pour certaines cibles. L'objectif de mes travaux de post-doctorat, et que j'ai poursuivis ensuite, a été de mettre en place le RNAi chez *T. spiralis* par utilisation de petits ARN interférents (siRNA). Pour l'utilisation du siRNA par absorption en milieu liquide, il a d'abord fallu vérifier la capacité de *T. spiralis* d'absorber en solution. Tous les stades de *T. spiralis* en sont capables (Figure 1). Les trajets des intestins sont bien visibles après absorption de fluorochrome par *T. spiralis* en milieu liquide ce qui suggère une absorption active.

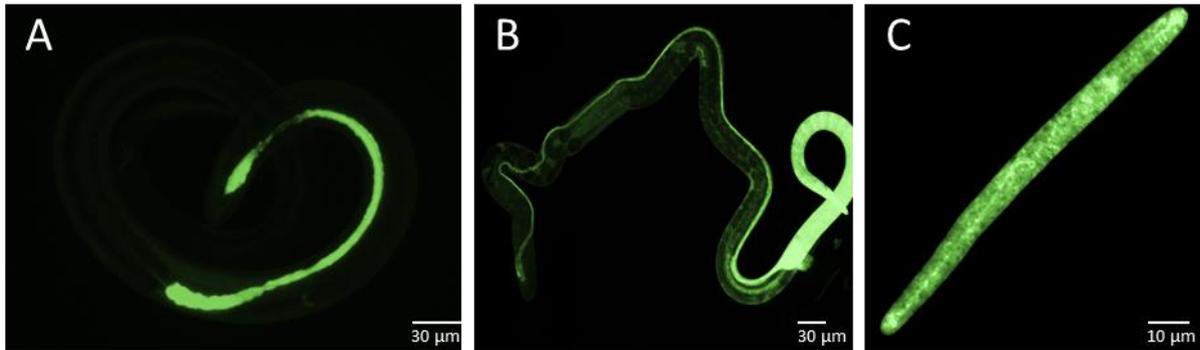


Figure 1 : Absorption d'un fluorochrome par différents stades de *T. spiralis*.
Les larves musculaires (A), les adultes (B) et les larves nouveau-nées (C) ont été incubées pendant 3 heures avec du FITC.

Puis l'absorption d'un siRNA non relevant couplé à un fluorochrome a permis d'établir une cinétique d'absorption d'un siRNA en milieu liquide avec une forte absorption dès la quinzième heure (Figure 2).

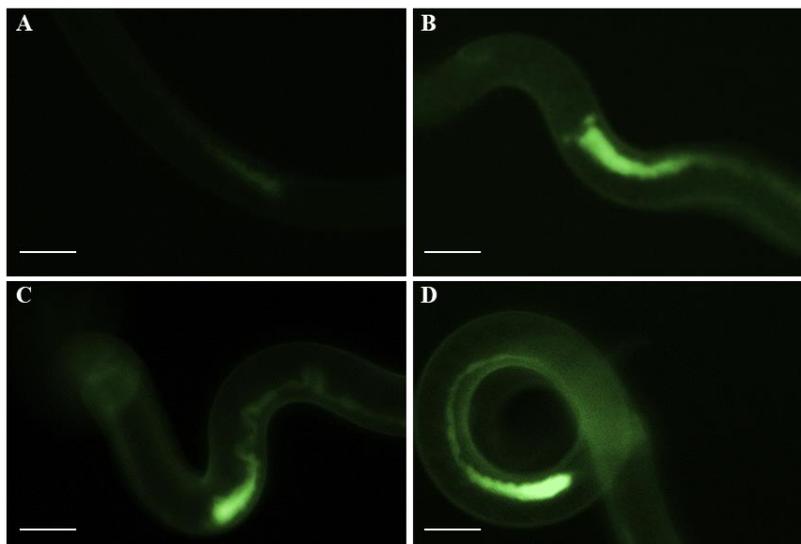


Figure 2 : Essais d'absorption d'un siRNA irrelevante couplé à un fluorochrome par différents stades de *T. spiralis*.
Des adultes de *T. spiralis* ont été incubés avec un siRNA non spécifique couplé à un Alexa Fluor 488, pendant 6 h (A), 15 h (B), 2 jours (C) ou 3 jours (D).

A partir de ces résultats, la meilleure cible pour la preuve de concept a été déterminée. Un phénotype facilement observable est le mouvement du ver. Il a donc été choisi de cibler une

sous-unité d'un récepteur cholinergique nicotinique (nAChR). Afin d'avoir une idée de la composition d'un des récepteurs possibles chez *T. spiralis*, différents anthelminthiques ont été testés, *in vitro*, sur les différents stades du parasite. Le plus efficace est le levamisole avec des concentrations basses (dès 1 μ M et optimal à 10 μ M). Chez les nématodes, les récepteurs les plus sensibles au levamisole comprennent la sous-unité unc63. Cette sous-unité a alors été séquencée puisque dans les bases de données la séquence était erronée, puis le siRNA la ciblant a pu être dessiné. La mise en contact *in vitro* d'adultes de *T. spiralis* avec le siRNA anti-unc63 a permis de diminuer significativement la mobilité du ver mais pas le nombre de NBL libérées par les adultes femelles. En revanche, il a permis de diminuer l'effet du levamisole sur la libération des NBL (Figure 3).

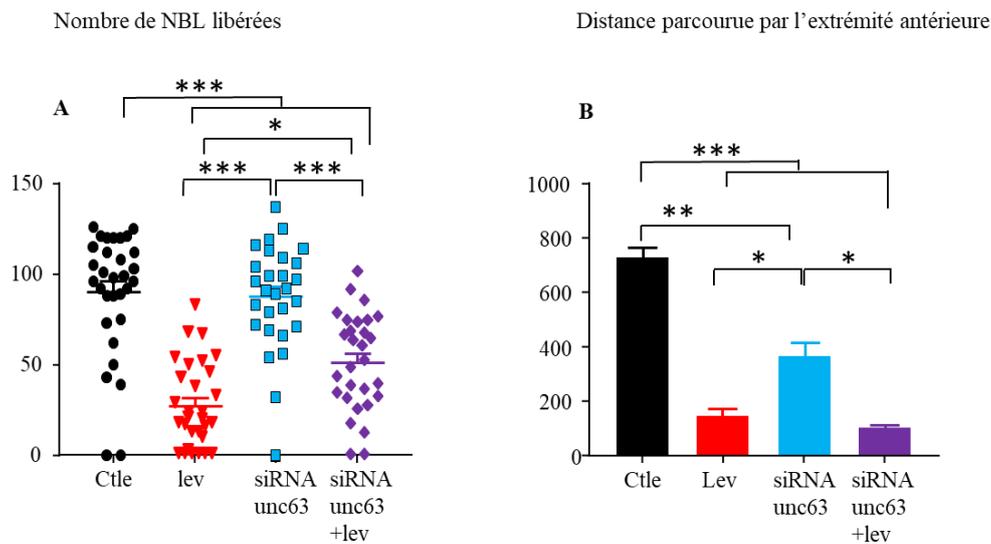


Figure 3 : Effet du siRNA ciblant unc63 sur la mobilité des vers et sur l'efficacité du levamisole.

Des femelles adultes de *T. spiralis* ont été incubées dans des plaques de 96 puits avec du milieu seul (noir), du milieu supplémenté avec du lévamisole (rouge), du milieu supplémenté avec un siRNA ciblant unc-63 (bleu) ou un milieu avec les deux traitements (violet) pendant 24 h. A. Nombre de NBL libérés par chaque femelle. B. La distance parcourue par l'extrémité antérieure de chaque femelle a été mesurée. ANOVA à 1 facteur suivi d'un test de Dunn ***= $p < 0,001$; **= $p < 0,01$; *= $p < 0,05$.

PERSPECTIVES

Deux phénotypes ont donc pu être obtenus et valident l'utilisation du siRNA ciblant unc63 de *T. spiralis*. Ces résultats ouvrent la voie à une meilleure compréhension des modes d'action des anthelminthiques chez le parasite zoonotique *T. spiralis*. L'utilisation d'une approche RNAi sera d'une importance majeure pour la caractérisation fonctionnelle d'un large éventail de cibles vaccinales et médicamenteuses, jetant ainsi les bases du développement de la prochaine génération de thérapies contre la trichinellose.

ii. Chez les Larves 1 musculaires

Les larves 1 musculaires (ML) sont le stade infestant du parasite. L'étude des protéines de ce stade est donc pertinente pour trouver des cibles essentielles au cycle biologique du parasite pour tenter de le contrôler à l'entrée. Le siRNA a ciblé la cathepsine F de *Trichinella spiralis* car sa séquence était connue. Les cathepsines ont de nombreuses fonctions au cours du développement d'autres nématodes tissulaires comme les filaires. Elles sont connues pour être des facteurs de virulence chez *Brugia malayi* (Ford, Plos NTD, 2009), des molécules nécessaires à la mue chez *Brugia* spp. (Guiliano, 2004) ou *Onchocerca volvulus* (Lustigman, 2004), à l'embryogénèse chez *Caenorhabditis elegans* (Hashmi, 2002) et à l'immunomodulation à l'entrée d'*Onchocerca volvulus* et *Acanthocheilonema vitae* chez leur hôte leur permettant une meilleure invasion (schierak, 2003).

Afin de pouvoir mettre les larves en contact du siRNA pendant suffisamment de temps, il a d'abord fallu développer une culture permettant aux larves d'être toujours infectieuses. Hors des larves cultivées dans les conditions classiques du laboratoire n'étaient plus du tout infectieuses. Ce phénomène avait déjà été décrit, les LIM n'étant plus infectieuses à partir de 20H de culture en condition aérobie (Bolas, 2009). De façon intéressante, un changement de milieu de culture semblerait avoir un impact positif sur l'aspect des larves, avec moins de décollements des cuticules (Martinez, 2004). Les larves ont alors été cultivées en anaérobiose avec un changement de milieu quotidien. Cela a permis d'obtenir des larves infectieuses jusqu'au troisième jour et même parfois au quatrième jour de culture ce qui est suffisant pour réaliser le siRNA. De façon intéressante, ces LIM sont complètement immobiles pendant toute la durée de la culture mais conservent leur pouvoir infectieux. Ces conditions miment parfaitement la capsule de *Trichinella* dans les muscles puisque dans leur cellule nourricière elles ne sont ni actives ni en contact de l'oxygène.

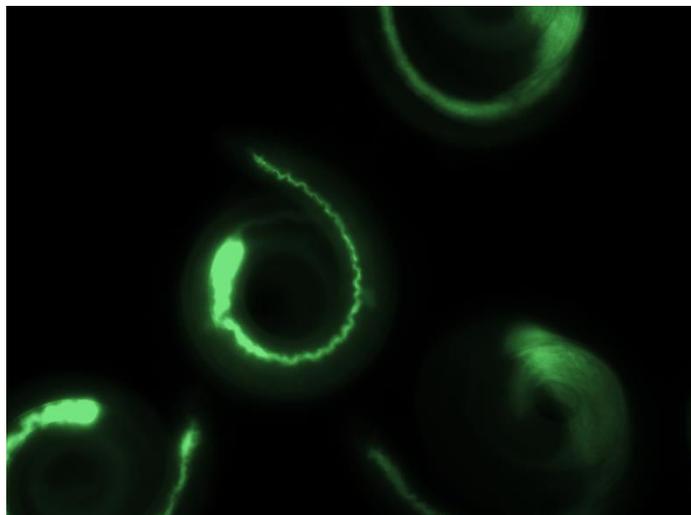


Figure 4 : Absorption en condition anaérobie.

Essais d'absorption d'un fluorochrome par les larves musculaires de *T. spiralis*, incubées en anaérobiose pendant 3 heures dans du milieu contenant du FITC.

Après vérification de l'absorption active des LIM cultivées en anaérobiose (Figure 4) par contact avec du FITC, le siRNA a été mis en contact des larves. Il ciblait deux zones différentes de la

séquence de la Cathepsine F, une en 3' et une en 5'. Les résultats ont été très intéressants puisqu'un des groupes ayant reçu les siRNA a été plus infectieux (50% d'installation en plus) que le groupe non traité et que le contrôle de spécificité. En revanche, il n'a eu aucun effet sur le nombre de L1NN libérées pour chaque femelle. La cathepsine F pourrait alors constituer un antigène de reconnaissance par les cellules du système immunitaire. Dans cette hypothèse, l'expression réduite de la cathepsine F par le siRNA diminuerait la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte. Les LIM pourraient alors s'établir plus facilement chez l'hôte.

PERSPECTIVES

D'une part, l'impact du siRNA sur la production de la cathepsine F et son activité sera vérifié par une mesure de son activité enzymatique sur son substrat, le Z-Phe-Arg-AMC qui devient fluorescent lorsqu'il est clivé par la cathepsine.

D'autre part, l'hypothèse de la reconnaissance de la cathepsine F par le système immunitaire sera testée. Outre des essais de vaccination, une expérience de saturation des cathepsines F sera réalisée en mettant les LIM en contact d'un inhibiteur spécifique comme le E64. Les cathepsines seront donc toujours présentes mais ne seront plus accessibles aux défenses de l'hôte. Dans ce cas, le résultat observé sera identique à celui obtenu avec le siRNA.

Valorisation de la partie I.a :

Ce projet a bénéficié du financement d'un post-doctorat (financement par le DIM MALINF obtenu par le Dr Isabelle Vallée). J'ai commencé en tant que post-doctorant sur ce projet puis j'ai co-encadré le Dr Alexandra Grasteau sur la deuxième partie du projet.

Le projet sur les LIM a fait l'objet du stage de Master 2 de Mr Johan Mele.

Publication :

Karadjian G, Neveu C, Heckmann A, Grasteau A, Boireau P, Martin C, Blanchard A and Vallée I. Investigating anthelmintic targets in adult *Trichinella spiralis* by RNA interference. Soumis à Parasite, en révision.

b. Rôle de la protéine NBL1 dans la relation avec son hôte et stratégie d'utilisation pour la détection

Au jour d'aujourd'hui, le seul test sérologique existant pour la détection de *Trichinella* spp. chez le porc est un test ELISA, basé sur la détection d'anticorps dirigés contre des produits d'Excrétion/Sécrétion (E/S) du parasite. Il faut donc produire ces produits E/S à partir de larves musculaires du parasite et la production est quantitativement différente d'une production à l'autre bien que qualitativement très proche. Il est donc nécessaire de développer un test qui permettrait d'utiliser des antigènes recombinants car leur production est standardisable. Différents antigènes ont été identifiés par le passé, certains étant précoces, d'autres plus tardifs. Un des antigènes peptidiques prometteurs est la protéine NBL1. Elle a été identifiée précédemment au laboratoire chez les larves nouveau-nées (L1NN) de *Trichinella spiralis* et représente une cible intéressante. Cette protéase à sérine a été sélectionnée par immuno-criblage d'une banque soustractive du stade L1NN (Liu et al., 2007) et a montré un potentiel antigénique intéressant (Boireau et al. Brevet, 2007) pour le développement d'outils de détection précoce des infestations à *Trichinella* ou pour le développement de vaccins contre ce parasite.

i. Etude de la séquence de NBL1

Deux isoformes de NBL1 existent et sont retrouvées au niveaux des stichocytes des L1NN de *Trichinella spiralis*. La seule différence entre ces deux isoformes se situe au niveau de la partie N-terminale. Après analyse *in silico*, une des isoformes possède 2 domaines transmembranaires ce qui indiquerait qu'elle se maintient à la membrane du réticulum endoplasmique des stichocytes. Cette isoforme serait ainsi utilisée par le parasite pour son développement puisque la protéine ne serait pas excrétée vers le milieu extérieur. L'autre isoforme présente un peptide signal ce qui indiquerait le passage de la protéine NBL1 dans la lumière du réticulum endoplasmique et donc sa possible sécrétion vers l'extérieur de la cellule, voire du parasite, puisque le stichosome est l'organe de sécrétion vers le milieu extérieur. Dans ce cas, cet isoforme pourrait servir au passage du parasite (stade L1NN) des entérocytes vers la circulation lymphatique et sanguine puis son installation au sein des cellules musculaires.

Une analyse comparative des homologues de NBL1 chez les autres espèces du genre *Trichinella* a permis de montrer une forte identité entre les séquences au sein du clade des espèces encapsulées (>90%) et une moins forte identité avec les séquences des espèces non-encapsulées (<88%).

D'autre part, l'analyse phylogénétique qui a été réalisée a montré que les séquences de NBL1 des espèces encapsulées et non-encapsulées forment deux clades distincts (Figure 5) (Wang et al., soumis).

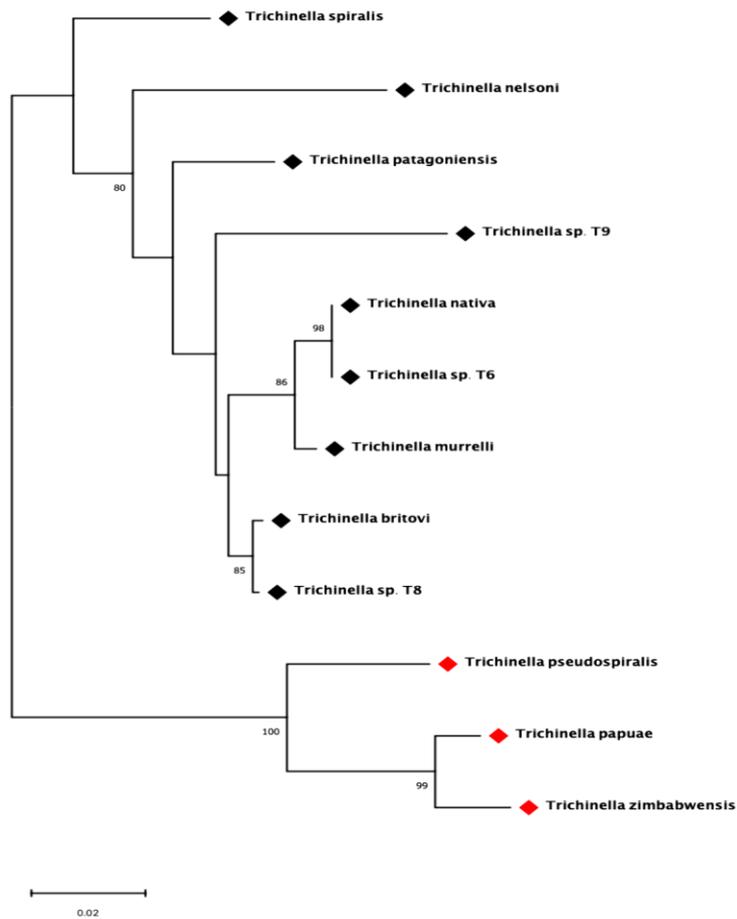


Figure 5. Phylogénie du gène NBL1 au sein du genre *Trichinella*.

L'arbre phylogénétique a été construit par maximum de vraisemblance à partir des séquences orthologues de NBL1 de 9 espèces et 3 génotypes de *Trichinella*, générés dans MEGA. Les valeurs de Bootstrap supérieures à 80 sont indiquées aux noeuds. Les diamants noirs et rouges indiquent les espèces encapsulées et non-encapsulées de *Trichinella*, respectivement.

Les premières analyses du protéome de *T. spiralis* à différents stades (L1M, Adultes H62 (les femelles ne sont pas encore fécondées), Adultes J5 (les femelles sont déjà fécondées et première L1NN complètement formées), Adultes J5+2 (Adultes J5 + 2 jours de culture), L1NN), que nous avons effectuées au sein du laboratoire, par la technique de NanoHPLC-MS / MS, ont mis en évidence 3 544 protéines. L'analyse de ces protéines a montré que 747 protéines sont détectées à tous les stades, alors que 49 protéines sont strictement spécifiques du stade L1NN, 13 protéines au stade Adultes J5, et 61 protéines au stade L1M. Cette étude a également permis de détecter 25 protéines communes uniquement aux stades L1NN, Adulte J5 et Adultes J5+2 dont la protéine NBL1. La détection de la protéine NBL1 par cette technique au stade Adulte J5 (à ce stade les L1NN sont présentes dans l'utérus des femelles) signifierait que celle-ci est déjà synthétisée par les L1NN (et par les embryons) alors qu'elles ne sont pas encore expulsées par les femelles.

Cette étude a fait ressortir une protéine nommée Chymotrypsine C (n° accession GenBank : KRY40297.1), ayant une forte similarité avec la protéine NBL1. Les différences entre ces 2 protéines sont les suivantes: au niveau de la partie N terminale de NBL1, il y a la présence de

35 acides aminés supplémentaires; au niveau de la partie C Terminale de la Chymotrypsine C, il y a présence de 117 acides aminés supplémentaire; 5 acides aminés sont différents le long des séquences (positions : 64, 120, 198, 240 et 348); les acides aminés ont à chaque fois la chaîne latérale qui diffère, ce qui montre une différence significative au niveau de la structure primaire mais par forcément au niveau de la structure quaternaire (ces changements n'incluent pas de Proline ni de Cystéine, ni de regroupement d'acides aminés hydrophiles ou hydrophobes); la séquence antigénique GSRPT est répétée une fois de plus au niveau de la Chymotrypsine C. Compte tenu de ces informations, un épissage alternatif pourrait être à l'origine de l'existence des deux protéines, d'autant plus que cela a déjà été montré dans la partie N-terminale sur les deux isoformes de NBL1. Dans cette hypothèse, le codon stop existant sur NBL1 serait remplacé par un triplet codant pour une thréonine. Néanmoins, 5 acides aminés sont différents sur la partie commune de la séquence des deux protéines. Cela pourrait aussi signifier que ces protéines sont portées par deux gènes différents.

La mise en évidence de la protéine Chymotrypsine C ayant une partie du domaine C-terminal identique à la protéine NBL1, nous amène à nous questionner sur l'efficacité du prototype de vaccin mis en place à partir de la partie C-terminale de NBL1. Ce prototype de vaccin est basé sur la séquence antigénique de 10 acides aminés (PSSGSRPTYPT) qui est présente sur la protéine NBL1, mais également sur la Chymotrypsine C. Cela pourrait expliquer l'efficacité de la vaccination par le prototype, permettant une diminution de 72% de la charge parasitaire après vaccination par ce vaccin prototype mais également la spécificité précoce (J+10 post-infestation) du test ELISA indirect basé sur une protéine recombinante comprenant uniquement la partie C-terminale de NBL1.

PERSPECTIVES

Comme les gènes de NBL1 et de la Chymotrypsine C montrent un très haut niveau de conservation, il pourrait s'agir de gènes paralogues. Il serait donc intéressant de cloner ces gènes et/ou de les étudier séparément pour en comprendre les fonctions.

ii. Etude de l'interaction de NBL1 avec des molécules de l'hôte

Les différences entre la protéine NBL1 des espèces encapsulées et non encapsulées pourraient expliquer certaines différences dans la formation des cellules nourricières (NC) après l'entrée des L1NN dans la cellule musculaire, comme la formation de collagène qui entoure la cellule, épais chez les espèces encapsulés et fin les espèces non encapsulées. Comprendre la/les fonction(s) de Ts-NBL1 pourrait être une des clés pour comprendre les interactions de *Trichinella spiralis* avec sa cellule musculaire hôte et sa différenciation en tant en cellule nourricière. La protéine NBL1 est exprimée uniquement au stade L1NN (liu et al., 2007) et à ce jour, sa fonction d'enzyme *in vivo* n'est toujours pas claire, tout comme le lien que cette protéine pourrait avoir dans la formation de la cellule nourricière qui entoure le parasite. D'autre part, elle pourrait interagir avec des molécules de la cellule hôte. Afin de tester ce dernier point, un crible double hybride en système eucaryotes (levures) a été réalisé contre une banque d'ADNc de cellules humaines. Cette étude a mis en évidence l'interaction de NBL1 avec différentes molécules (Tableau 1).

Protein names	Abb	Accession N°	Colony N°
Endogenous Retrovirus Group K3 Member 1	ERVK3-1	ENSP00000489180	56
Potassium Channel Tetramerization Domain Containing 10	KCTD10	ENSP00000441672	29
Vimentin	VIM	ENSP00000435613	25
Mitochondrial Assembly Of Ribosomal Large Subunit 1	MALSU1	ENSP00000419370	10
Nucleophosmin	NPM1	ENSP00000377408	9
EF-hand Calcium Binding Domain 14 KIAA1549 Like	EFCAB14	ENSP00000361001	5
KIAA1549 Like	KIAA1549L	ENSP00000433481	4
Kinesin Family Member C3	KIFC3	ENSP00000458009	4
Diacylglycerol Kinase Delta	DGKD	ENSP00000386455	3
Envoplakin	EVPL	ENSP00000301607	3
E1A Binding Protein P400	EP400	ENSP00000331737	2
Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein U Like 1	HNRNPUL1	ENSP00000473178	2
Keratin 18	KRT18	ENSP00000447278	2
Lamin B1	LMNB1	ENSP00000378761	2
Caspase 8 Associated Protein 2	CASP8AP2	ENSP00000478179	1
Potassium Channel Tetramerization Domain Containing 11	KCTD11	ENSP00000328352	1
Keratin 8	KRT8	ENSP00000447881	1
MIF4G Domain Containing	MIF4GD	ENSP00000484245	1
Ribosomal Protein L39	RPL39	ENSP00000355315	1
Tripartite Motif Containing 23	TRIM23	ENSP00000274327	1

Tableau 1 : Interacteurs de NBL1 identifiés lors du crible double hybride.

Des analyses par GST-Pull down ont confirmé l'interaction de NBL1 avec ERVK-3, KCTD-10 et la Vimentine (Figure 6A). Un des interacteurs identifiés est la vimentine et a été retrouvé dans de nombreuses interaction avec NBL1. De façon intéressante elle est co-localisée avec NBL1 chez des cellules transfectées et exprimant NBL1 (Figure 6B). La vimentine est un marqueur dans le processus de régénération des cellules musculaires (Bornemann et Schmalbruch, 1992). La vimentine a été détectée dans les muscles en développement précoce, mais pas dans les muscles complètement différenciés (Vater et al., 1994 ; Vaitinen et al., 2001 ; Güttsches et al., 2015). Il a été signalé que *Trichinella* peut réguler significativement à la hausse l'expression du gène de la vimentine dans les cellules musculaires à 23 jours pi, ce qui est plus visible chez *Trichinella spiralis* que chez *T. pseudospiralis* (Wu et al., 2008). Cela peut être dû aux différences dans la formation des cellules nourricières induites par *T. spiralis* et *T. pseudospiralis*. La formation des cellules nourricières chez *T. spiralis* implique la fusion de cellules musculaires infectées transformées et de cellules satellites mal différenciées, alors que chez *T. pseudospiralis* les cellules satellites sont activées mais ne fusionnent jamais avec le cytoplasme de la cellule nourricière, ce qui entraîne une formation incomplète des kystes (Wu et al., 2001 ; Boonmars et al., 2004).

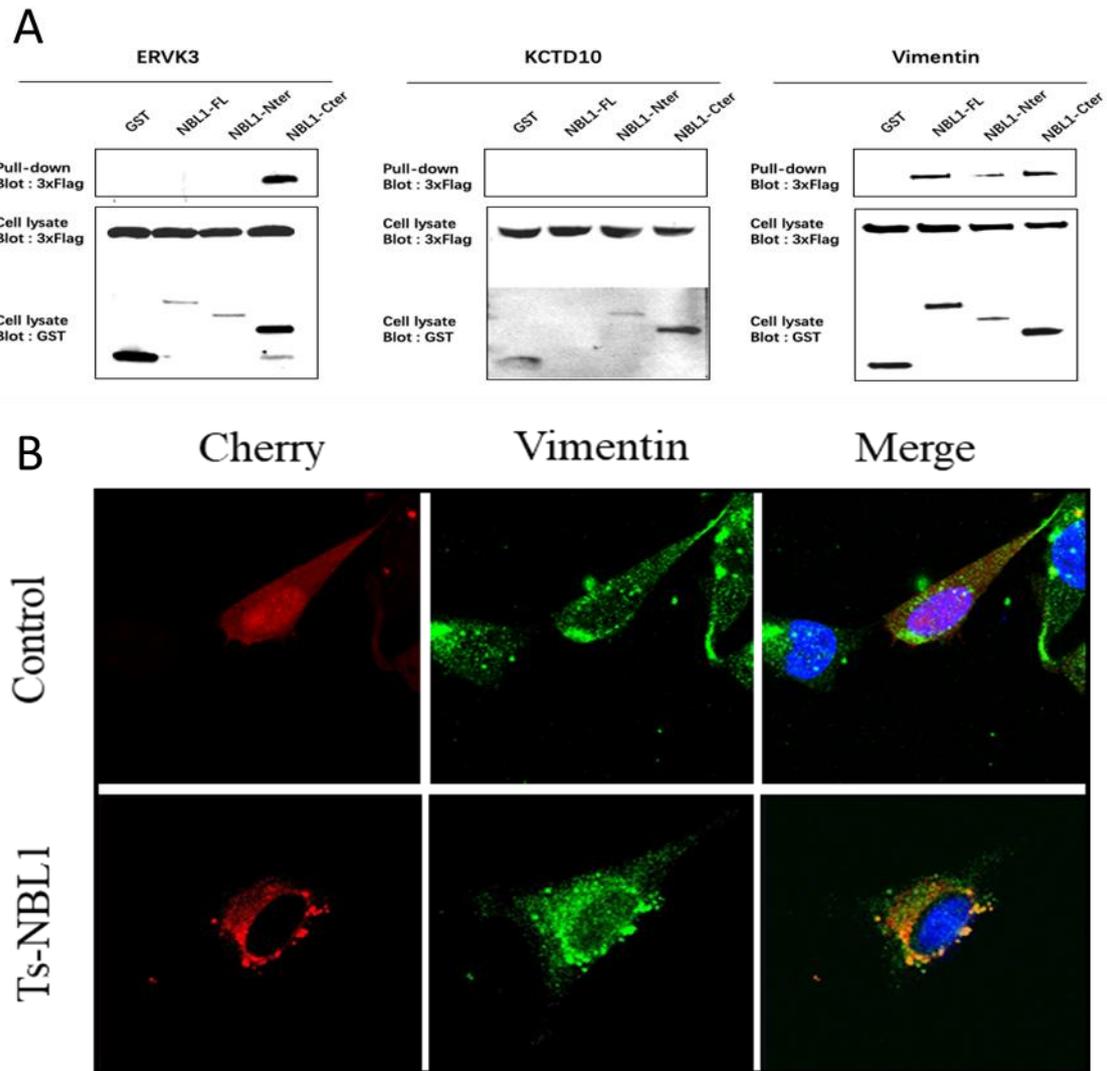


Figure 6. NBL1 interagit avec la Vimentine.

A. Des cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec des vecteurs d'expression codant pour la GST seule ou fusionnée à Ts-NBL1 et codant pour le vecteur d'expression 3xFlag fusionné à la vimentine. Les lysats cellulaires des cellules transfectées ont été collectés 48 heures après la transfection. Ensuite, le pull-down en utilisant des billes de glutathion-sepharose a permis de tester les complexes d'interactions protéiques. Les Tags GST- et 3xFlag- ont été détectés par immunoblotting. **B.** Les cellules C2C12 ont été transfectées avec le plasmide codant mCherry seul ou fusionné à Ts-NBL1. La couleur verte correspond à la vimentine tandis que le rouge correspond aux protéines mCherry-Ts-NBL1.

D'autre part, le niveau d'expression de la vimentine dans des cellules transfectées avec NBL1 est augmenté (Figure 7). Ce résultat majeur dans la connaissance de l'interaction de *Trichinella spiralis* avec ses cellules hôtes pourrait expliquer l'impact sur l'expression du collagène pour la construction des cellules nourricières. En effet, des études ont montré que la vimentine interagit avec LARP6, qui est impliqué dans la régulation du collagène pour stabiliser l'ARNm du collagène. La stabilisation de l'ARNm du collagène est le principal mécanisme de l'expression élevée du collagène. Les fibroblastes knock-out à la vimentine produisent des quantités réduites de collagène de type I en raison d'une diminution de la stabilité de l'ARNm du collagène (Challa et Stefanovic 2011).

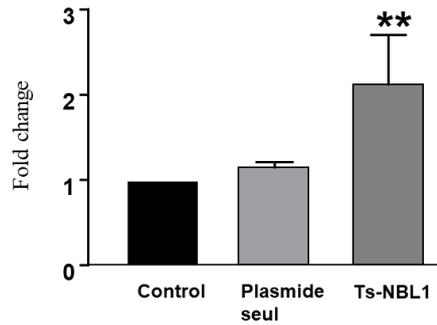


Figure 7. NBL1 augmente l'expression de la vimentine dans la cellule hôte.

Le vecteur pCIneo-3xFlag seul ou codant pour Ts-NBL1 a été transfecté dans des cellules HEK-293T et l'expression de la vimentine a été quantifiée par qPCR. Les données ont été normalisées et les résultats sont présentés la moyenne \pm SD. Trois expériences indépendantes pour chaque groupe. ** $p < 0,01$.

iii. NBL1 modifie l'expression de gènes de la cellule hôte

Les larves nouveau-nées de *T. spiralis* envahissent les cellules musculaires et peuvent causer des dommages mécaniques, et induire la production de collagène dans les cellules environnantes. Celui-ci s'accumule en réponse à la lésion tissulaire. La vimentine est nécessaire à cette accumulation et a été signalée comme médiatrice du processus de signalisation précoce de la réparation tissulaire (Cheng et al., 2016 ; LeBert et al., 2018). Ts-NBL1 pourrait augmenter l'expression du collagène et avoir un effet sur l'accumulation de collagène autour de la cellule nourricière, mais ce mécanisme n'a pas été élucidé et reste à étudier. Ts-NBL1 pourrait également être impliqué dans la régulation de l'expression de nombreux autres gènes chez sa cellule hôte. Une analyse transcriptomique par RNAseq a été réalisée afin d'étudier l'expression de gènes chez des cellules transfectées avec NBL1. L'analyse a révélé une augmentation significative du gène *hspa1* codant pour la Hsp70 (Heat Shock protein 70) et du gène *dnajc12* de sa protéine chaperone Hsp40 (Figure 8).

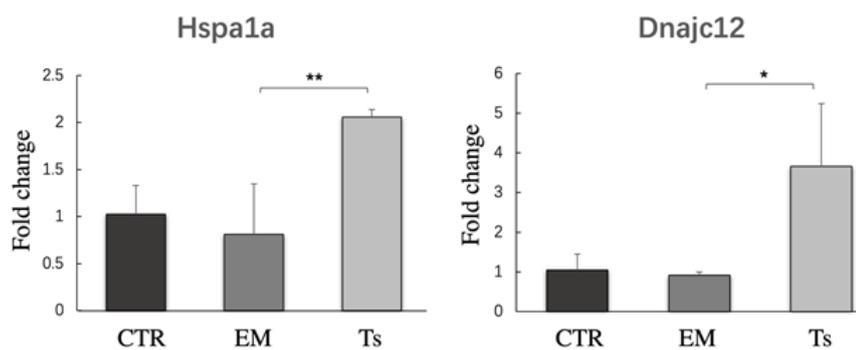


Figure 8. Niveau d'expression relative des gènes Hspa1 et Dnajc12.

Après analyse des résultats de RNAseq, des analyses individuelles par qRT-PCR ont été réalisées à partir des ARN des cellules C2C12 non transfectées (CTR), transfectées avec le plasmide vide (EM) ou transfectées avec Ts-NBL1. Le niveau d'expression relative a été normalisé avec le gène de ménage *gapdh* et par rapport au groupe contrôle. Les résultats sont la moyenne de 3 répliquas biologiques \pm SEM.

Il a été démontré que la suppression du gène *dnajc12* dans un modèle de cellules cancéreuses pulmonaires conduit à une réduction de l'expression de la Vimentine (Li et al., 2021). A l'inverse, dans notre étude, le gène *dnajc12* est surexprimé. L'hypothèse serait alors que Ts-NBL1 augmenterait l'expression de *dnajc12*, ce qui conduirait à une surexpression de la vimentine dans la cellule hôte. Mais le rôle joué par la vimentine dans ce contexte reste à étudier.

PERSPECTIVES

De futures travaux de recherche tenteront de faire le lien entre l'expression de la vimentine et la formation de la cellule nourricière notamment l'expression du collagène. Des souris knock-out pour la vimentine seront infectées et la formation de la cellule nourricière sera observée au cours de l'infection. D'autre part, l'analyse *in silico* a montré que chez les espèces de *Trichinella* spp non encapsulées, la séquence de NBL1 a moins de similitude que les séquences de NBL1 d'espèces encapsulées entre elles. Aucune formation de collagène n'est observée chez les espèces non encapsulées. Dès lors, y-a-t-il un lien entre la séquence de NBL1 et l'absence de collagène chez les espèces non encapsulées ? Des études comparatives seront réalisées avec l'espèce *T. pseudospiralis*, espèce non encapsulée.

iv. Utilisation de NBL1 pour le diagnostic des trichinelloses animales

La partie C-terminale est commune aux deux isoformes, et un motif répété 4 fois (PSSGSRPTYP) a été mis en évidence (Yang et al., 2016). Ce motif est encore mal connu mais une cartographie d'épitopes a permis de mettre en évidence que cette partie est immuno-dominante. Après amplification et séquençage de NBL1 chez trois espèces encapsulées : *T. spiralis*, *T. britovi*, *T. nativa* et l'espèce non encapsulée *T. pseudospiralis*, il a été possible de confirmer les différences de séquences. Au sein du motif répété, le fragment GSRPT est retrouvé dans les séquences de toutes les espèces. De manière intéressante, la construction de la structure tridimensionnelle de la protéine NBL1 de *T. spiralis* a permis d'observer que les motifs répétés sont à l'extérieur de la protéine (Figure 9) et donc accessibles aux cellules immunitaires et aux anticorps. Une détection de ce peptide de 10 acides aminés par ELISA indirect et par Western Blot a permis de détecter des infections à *Trichinella* chez le porc entre 20 et 60 jours post-infestation.

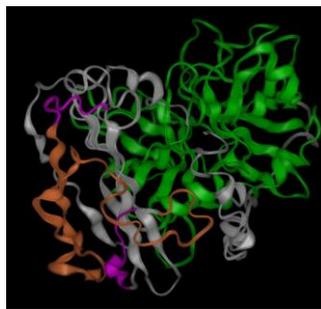


Figure 9. Structure tridimensionnelle de la protéine Ts-NBL1.

Les fragments marron et rose contiennent les motifs répétés.

Néanmoins, au-delà de 60 jours, les anticorps anti-NBL1 ne sont plus présents. Il est donc nécessaire d'associer un autre antigène qui permet une détection plus tardive. Un autre antigène prometteur est un carbohydrate spécifique de *Trichinella*, le b-tyvelose. Il n'est retrouvé dans aucun autre organisme. Des essais d'association avec le beta-tyvelose sont un succès puisque

celui-ci permet de détecter l'infection à partir du 30^{ème} jour d'infection sans disparition des anticorps dans les temps précoces et tardifs (Figure 10).

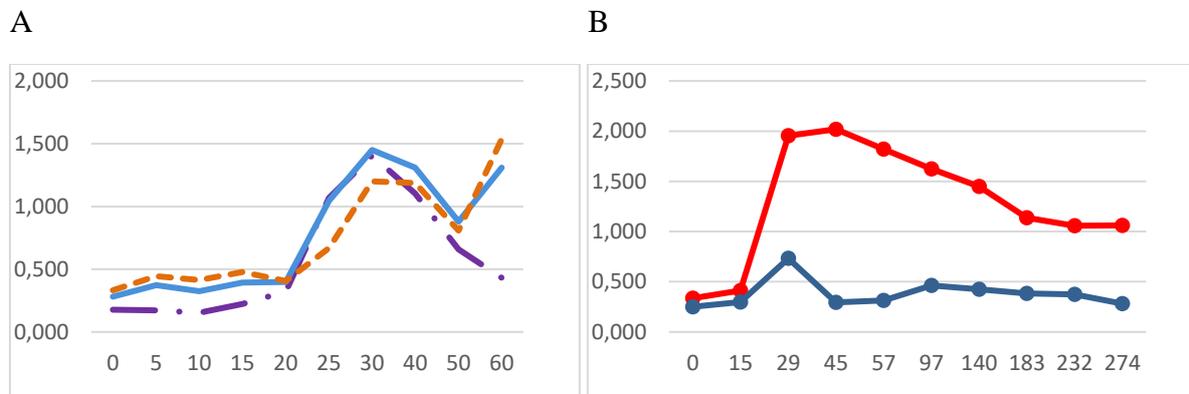


Figure 10. Détection des anticorps anti-NBL1 et anti-b-tyvelose dans les sérums de porcs infectés par *Trichinella spiralis*.

A. ELISA réalisé soit avec NBL1 (courbe violette), soit avec le b-tyvelose (courbe orange) soit avec les deux antigènes (courbe bleu). Les sérums proviennent de porcs infectés avec 20.000 L1M de *T. spiralis*. Des prélèvements ont été effectués tous les cinq puis 10 jours dès J0 d'infection. Les résultats sont les moyennes des densités optiques (DO) des ELISA de trois porcs par groupe. **B.** L'ELISA avec les deux antigènes a été réalisé pour des sérums de porcs infectés (courbe rouge) et de porcs négatifs (courbe bleue). Les sérums proviennent de porcs infectés avec 20.000 L1M de *T. spiralis*. Des prélèvements ont été effectués à J0 puis de J15 à J274 de l'infection. Les résultats sont les moyennes des densités optiques (DO) des ELISA de quatre porcs pour le groupe positif et deux porcs pour le groupe négatif.

Les anticorps sont détectés dès J20 dans les sérums de porcs infectés par 20 000 L1M de *T. spiralis*, et à partir de J30 chez les porcs infectés avec 1 000 ou 200 L1M de *T. spiralis*. D'autre part, la détection des anticorps est possible dans les sérums des porcs infectés par 20 000 L1M de *T. britovi* et *T. pseudospiralis* dès J25 et J20 respectivement. Mais la détection lors d'une infection par 1000 de *T. pseudospiralis* est possible dès J25 alors qu'elle n'est possible qu'à J60 chez *T. britovi*. Les porcs infectés avec 200 L1M de *T. britovi* et *T. pseudospiralis* sont détectés seulement à partir de J60.

PERSPECTIVES

Le test ELISA pour la détection de *Trichinella* chez les porcs doit être optimisé afin d'augmenter sa sensibilité.

Par la suite, il sera transféré à un industriel grâce à une société de transfert de technologie afin qu'un test puisse être développé et utilisé à grande échelle.

Valorisation de la partie I.b

Ce travail a fait l'objet d'une partie du travail de thèse de Me Anqi Wang que je co-encadre avec le Dr Isabelle Vallée. Sa soutenance de thèse a été soutenue avec Brio (« Félicitations orales du jury ») le 30 Septembre 2021.

Ce travail a également fait l'objet du travail de Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes de Mme Aurélie Heckmann.

Ce travail a bénéficié de l'acquisition d'un microscope confocale haute résolution, projet d'investissement SAMiCAI (financement par le DIM IHEALTH) dont j'ai assuré la coordination, et de l'acquisition d'un Nanodrop One, un Qubit et d'un LightCycler 480, projet d'investissement PARA-DIM (financement par le DIM IHEALTH) dont j'étais partenaire.

Publications :

[Wang A](#), [Heckmann A](#), Caignard G, Vitour D, Liu M, Bruneau S, Boireau P, **Karadjian G*** and Vallée I*. *Trichinella spiralis* New Born larvae specific protein interacts with host's cell vimentin. Soumis à Plos Pathogens. * equal contribution.

[Wang A](#), Yera H, Arieu F, Vallée I and **Karadjian G**. *T. spiralis* NBL1 regulates the expression of two host cells' heat shock proteins. En préparation.

c. Développement d'un outil innovant de détection basé sur les aptamères.

En raison de la très faible prévalence de *Trichinella* chez les porcs provenant d'élevages en hébergement reconnu contrôlé vis-à-vis du risque trichine, une spécificité du test proche de 100 % est nécessaire, car les échantillons faussement positifs devraient être testés à nouveau avec une deuxième méthode sérologique (par exemple, Western Blot). Ces tests ne peuvent être réalisés que par des laboratoires spécialisés, ce qui rend la logistique des tests plus compliquée et plus coûteuse. Par conséquent, de nouvelles méthodes de diagnostic plus spécifiques et plus précoces sont nécessaires pour la prévention à l'abattoir et pour améliorer la détection des maladies humaines.

En cas d'épidémie humaine, l'importance d'un traitement précoce s'impose clairement car il permet d'éviter les complications et de réduire la charge parasitaire du patient. À ce jour, le diagnostic chez l'homme est basé sur la détection d'IgG spécifiques qui apparaissent dès 20 à 30 jours après l'infection. Cependant, les titres d'anticorps sont très variables selon les individus, la charge parasitaire initiale et l'espèce infectante. De nombreux tests ont été décrits mais les systèmes les plus performants restent l'ELISA basé sur l'utilisation d'antigènes d'excrétion/sécrétion (Ag E/S) et le Western blot réalisé avec cet antigène. Le Western blot permet d'obtenir la meilleure spécificité ; cependant, quelques réactions croisées sont observées avec les anisakiases et les bilharzias. L'ELISA peut être positif dès la deuxième semaine après l'infection, mais généralement, les réactions sérologiques ne sont clairement positives qu'un mois après l'infection. C'est souvent trop tard pour que les anthelminthiques atteignent efficacement les nématodes, car le kyste tissulaire enveloppe le ver en moins de deux semaines. Par conséquent, de nouvelles méthodes de diagnostic plus spécifiques et plus rapides dans les viandes sont nécessaires pour la prévention et dans le sérum humain pour la détection de la maladie.

Les aptamères sont des acides nucléiques synthétiques qui se replient en conformations tridimensionnelles uniques capables de se lier à une cible avec une affinité et une spécificité remarquables. Ces structures se lient spécifiquement aux antigènes des agents pathogènes, combinant ainsi la facilité du prélèvement sérologique et la détection directe de la présence de l'agent pathogène. Les aptamères ont été utilisés avec succès pour la détection de parasites dans les produits frais, notamment dans des biocapteurs basés sur des aptamères. La mise au point d'un système de détection de *Trichinella* basé sur les aptamères permettrait de contourner les réserves associées aux tests sérologiques et de procéder à une détection spécifique et précoce

dans le cadre de diagnostics humains et de programmes de surveillance de *Trichinella* chez les porcs. En outre, la technique peut être combinée avec des aptamères dirigés contre d'autres maladies du porc (telles que *Toxoplasma*, *Salmonella*, etc.), ce qui rend possible une application future beaucoup plus large. Très peu utilisés en Sciences vétérinaires, ils ont un réel potentiel de développement (Niederlender et al., 2021).

Dans ce projet, la sélection d'aptamères spécifiques de *Trichinella spiralis* est réalisée sur larves entières mais également sur une cible protéique.

i. Sélection d'aptamères par whole larvae-SELEX (WL-SELEX)

La sélection des aptamères est basée sur la méthode de "Systematic Evolution of Ligands by Enrichment" (SELEX). Le Whole Larvae-SELEX est très innovant puisque la technique n'a jamais été réalisée sur des larves entières (Figure 11). Ce protocole est tout nouveau et a été adapté des protocoles de cell-SELEX.

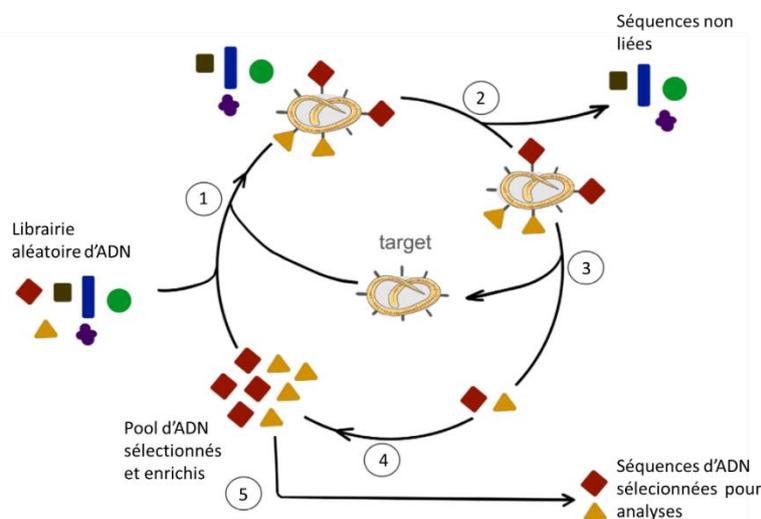


Figure 11. Schéma du Whole Larvae SELEX.

1. Incubation des larves avec les ADN ; 2. Partitionnement ; 3. Elution/Séparation ; 4. Amplification par PCR et purification ; 5. Après le dernier tour de SELEX, identification des séquences d'intérêt. (Adapté de Niederlender et al., 2021)

En utilisant ce protocole, il a été possible de sélectionner et d'amplifier des aptamères spécifiques de *T. spiralis* en réalisant différents cycles itératifs de mise en contact des aptamères avec les LIM. Après 5 cycles, l'efficacité de la sélection a été testée par différentes méthodes en utilisant la qPCR. Cela permet d'évaluer qualitativement le processus de sélection des aptamères en comparant la diversité des séquences entre les différents cycles de sélection. Dans ce cas, une grande diversité de séquences suggère une sélection faible ou infructueuse, tandis qu'une faible diversité suggère une convergence progressive vers une séquence spécifique à la cible d'intérêt. Des méthodes d'analyses innovantes ont été adaptées aux qPCR sur les pools d'aptamères sélectionnés (Figure 12) : analyses des courbes d'amplification avec courbe de fusion (Amplification curve and Melting curve Analysis (AC-MCA)) et courbe de re-fusion (rMCA).

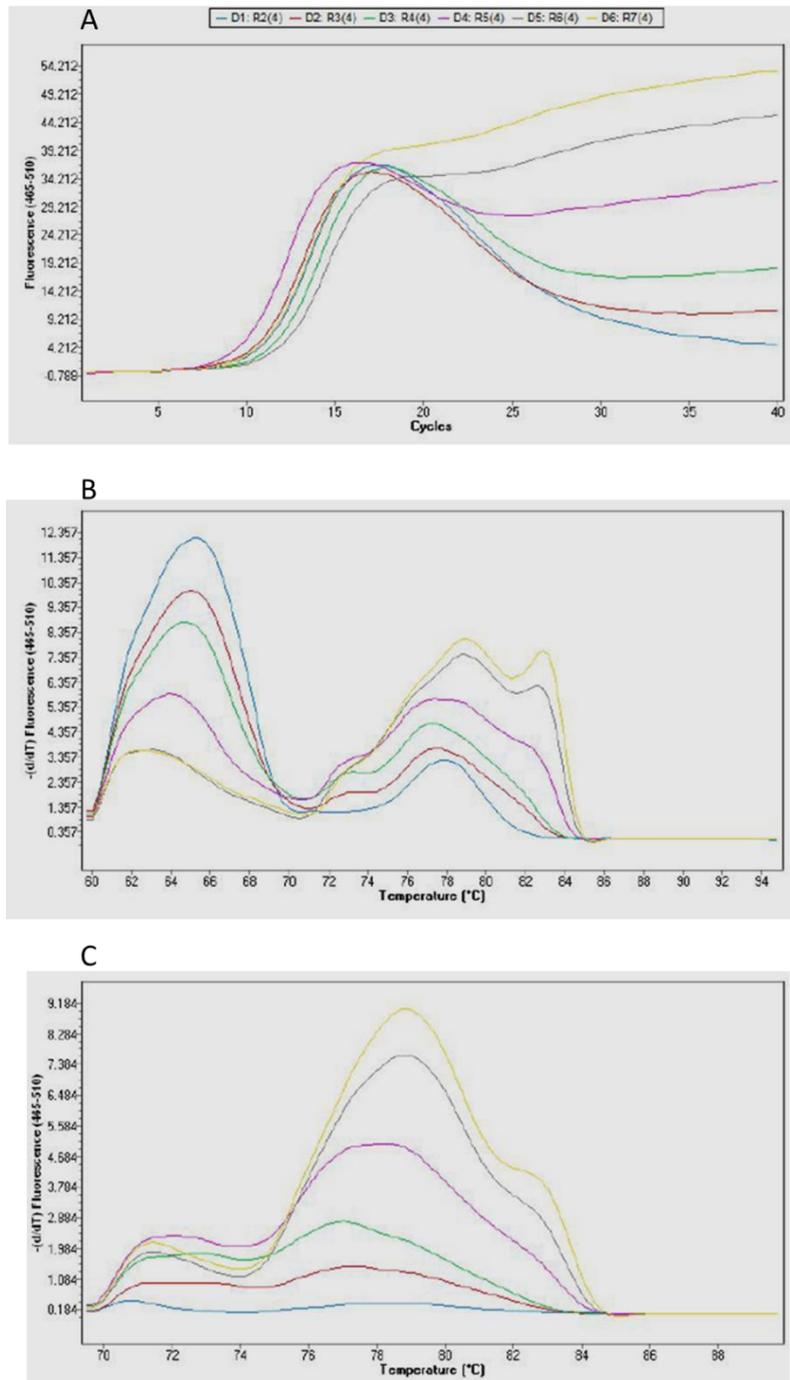


Figure 12. Analyses AC-MCA et rMCA sur 7 cycles de WL-SELEX.

7 cycles de WL-SELEX ont été réalisés sur des LIM de *T. spiralis*. Puis les résultats de qPCR ont été analysés pour chaque cycle (cycles 2 : bleu, 3 : rouge, 4 : vert, 5 : violet, 6 : gris, 7 : jaune) par courbe d'amplification (A), avec courbe de fusion (B) et de re-fusion (C).

L'analyse des courbes d'amplification est un premier élément intéressant. Après plusieurs cycles de sélection avec des augmentations progressives de la stringence, la chute de la fluorescence plusieurs cycles d'amplification devient moins prononcée. Après un nombre x de cycles, les amorces et les sources de dNTP s'épuisent, l'amplification cesse et l'acquisition de la fluorescence diminue. Par conséquent, les cycles de PCR suivants connaissent des événements

de "mauvais appariement" des séquences, produisant des hétéro-duplexes instables, ce qui entraîne une baisse de la fluorescence. Cependant, dans les échantillons présentant une diversité de séquences plus faible et une homogénéité accrue, ces événements de mauvais appariement sont réduits, ce qui entraîne une baisse moins prononcée de la fluorescence. Dans les échantillons à faible diversité, l'acquisition de la fluorescence est maintenue en présence d'homoduplexes plus stables (Figure 12. A).

Dans l'analyse des courbes de fusion, le passage de pics doubles à un pic unique représente la transition progressive des hétéroduplexes aux homo-duplexes. Les mélanges d'hétéroduplexes sont plus instables que les mélanges d'homo-duplexes. Dans le cas d'un mélange principalement d'hétéroduplexes, les températures de fusion seront plus basses car l'ADNdb est plus facilement dénaturé. Dans le cas d'un échantillon majoritairement homo-duplex, la stabilité de l'ADNdb est plus grande, nécessitant des températures plus élevées pour se dénaturer, ce qui entraîne une chute de la fluorescence. Lorsque la proportion de produits homoduplex augmente, et que la proportion de produits hétéroduplexes diminue, les températures de fusion augmentent progressivement avec l'apparition d'un pic mieux défini (Figure 12. B).

Puis l'analyse des courbes de re-fusion (reMelting Curve Analyse (rMCA)) a été réalisée afin d'augmenter la stringence. Le principe de cette analyse est identique à celle de la courbe de fusion initiale. Dans ce cas cependant, la température de dénaturation est augmentée de 60°C à 70°C. Cela change la fenêtre et la résolution de l'analyse de la courbe de refusion. Alors que la dénaturation à 60°C permet la formation de certains hétéroduplexes très variables, l'augmentation de la température de dénaturation à 70°C ne permet la formation que de séquences au-dessus d'un certain "seuil de diversité". Cette phase d'hybridation est plus rigoureuse et favorise la production d'homoduplexes. Cela permet finalement de "zoomer" sur le graphique où la plupart des fusions à haute température se produisent (Figure 12. C).

Ces analyses permettent d'être confiants quant à l'efficacité de la sélection qui a été réalisée au cours des cycles de SELEX.

PERSPECTIVES

Les séquences seront identifiées en réalisant un séquençage NGS puis analyse du séquençage par le logiciel Patternity-SEQ (Nguyen Quang et al., 2016) développé pour l'analyse des séquençages appliqués aux aptamères.

L'affinité de ces aptamères pour leur cible devra être testée puis des tests ELONA ou ELASA seront développés pour la détection de *Trichinella*.

Leur capacité de pénétration du kyste de *Trichinella* sera également testée *in vivo*. Cela permettrait par la suite de les coupler à une molécule antihelminthique afin qu'ils puissent la délivrer dans le kyste.

ii. Détermination d'un biomarqueur/facteur de virulence de *Trichinella spiralis*

Avant de réaliser la sélection d'aptamères dirigés contre des protéines de *Trichinella spiralis*, il convient de déterminer des biomarqueurs intéressants. Comme les tests sérologiques actuels sont basés sur les antigènes d'Excrétion/Sécrétion des LIM de *Trichinella*, la stratégie a été de

déterminer plus précisément la composition de ces produits. D'autre part, parmi ces produits, certains sont sûrement nécessaires à l'entrée du parasite dans la muqueuse intestinale de l'hôte.

Partant des résultats d'infectiosité lors des cultures de L1M en conditions aérobie et anaérobie (chapitre I a) ii)), l'hypothèse d'une différence dans l'excrétion des larves a été émise. Des larves ont alors été cultivées dans les deux conditions et leurs produits d'excrétion/sécrétion ont été récupérés. La différence dans la quantité de protéines excrétées est importante (Figure 13) ce qui démontre la nécessité d'un passage en milieu aérobie pour déclencher l'excrétion de nombreuses protéines.

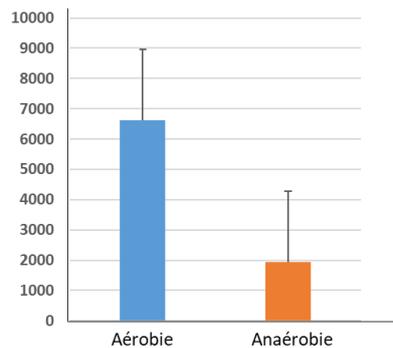


Figure 13. Dosages des protéines d'excrétion des L1M de *T. spiralis*

Les L1M de *T. spiralis* ont été cultivées en aérobie (Bleu) ou en anaérobie (orange) pendant 20H. Les produits d'excrétion ont été récupérés et dialysés. Puis un dosage des protéines totales a été réalisé. Les résultats sont la moyenne +/- SD de 6 productions différentes pour chaque condition de culture.

Le profil protéique sur SDS-PAGE est également intéressant car de nombreuses bandes semblent similaires entre les deux conditions de culture mais certaines bandes n'existent que dans le profil des larves cultivées en aérobie (Figure 14. A) mais pas dans le profil de celles cultivées en anaérobie (Figure 14. B).

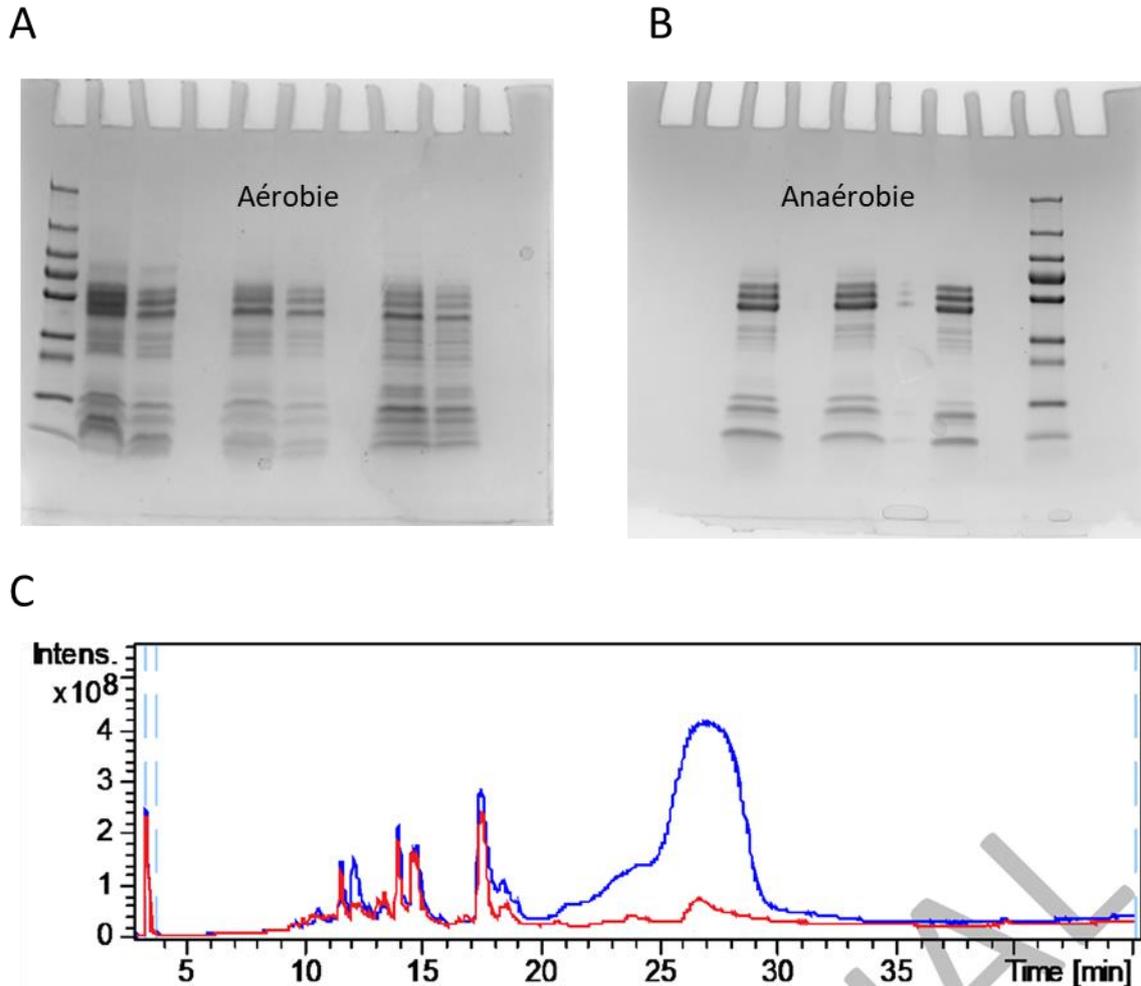


Figure 14. Profils protéiques des sécrétomes de L1M de *T. spiralis*

Les produits d'excrétion des L1M de *T. spiralis* ont été récupérés et dialysés. Les L1M de *T. spiralis* ont été cultivées en aérobie (A et bleu) ou en anaérobie (B et rouge) pendant 20H. Une migration sur gel d'électrophorèse en SDS-PAGE a été réalisée et les protéines ont été révélées par le bleu de Coomassie (A-B). L'approche de protéomique descendante a été réalisée en parallèle et a permis d'obtenir le chromatogramme présenté en C. Il montre un schéma d'expression différentiel global dans les protéines sécrétées par des larves cultivées en aérobie (bleu) et en anaérobie (rouge).

La composition des produits d'excrétion a ensuite été analysée par une approche de protéomique descendante (Figure 14. C). Les protéines éluées entre 20 et 30 min sont soit potentiellement uniques à la condition aérobie, soit substantiellement sous-exprimées dans la condition anaérobie. Ce résultat s'aligne sur les études précédentes (Bolas-Fernández et al. 2009) et le profil le profil de bandes SDS-PAGE réalisé dans notre étude (Figure 14. A-B) montrant une différence significative dans les profils protéiques E/S des larves en réponse à la disponibilité de l'oxygène en culture. Ces protéines n'ont cependant pas été identifiées par séquençage descendant, ce qui pourrait être dû au fait qu'il s'agisse de protéines non caractérisées/non annotées ou trop grandes et complexes pour le séquençage descendant. L'analyse protéomique ascendante (en shotgun) par LC-MS/MS a alors été réalisée pour augmenter la détectabilité de ces protéines dans les échantillons cultivés dans des conditions

aérobies *versus* anaérobies. L'analyse en composantes principales montre deux groupes distincts (n=4) correspondant à une condition spécifique (Figure 15.A).

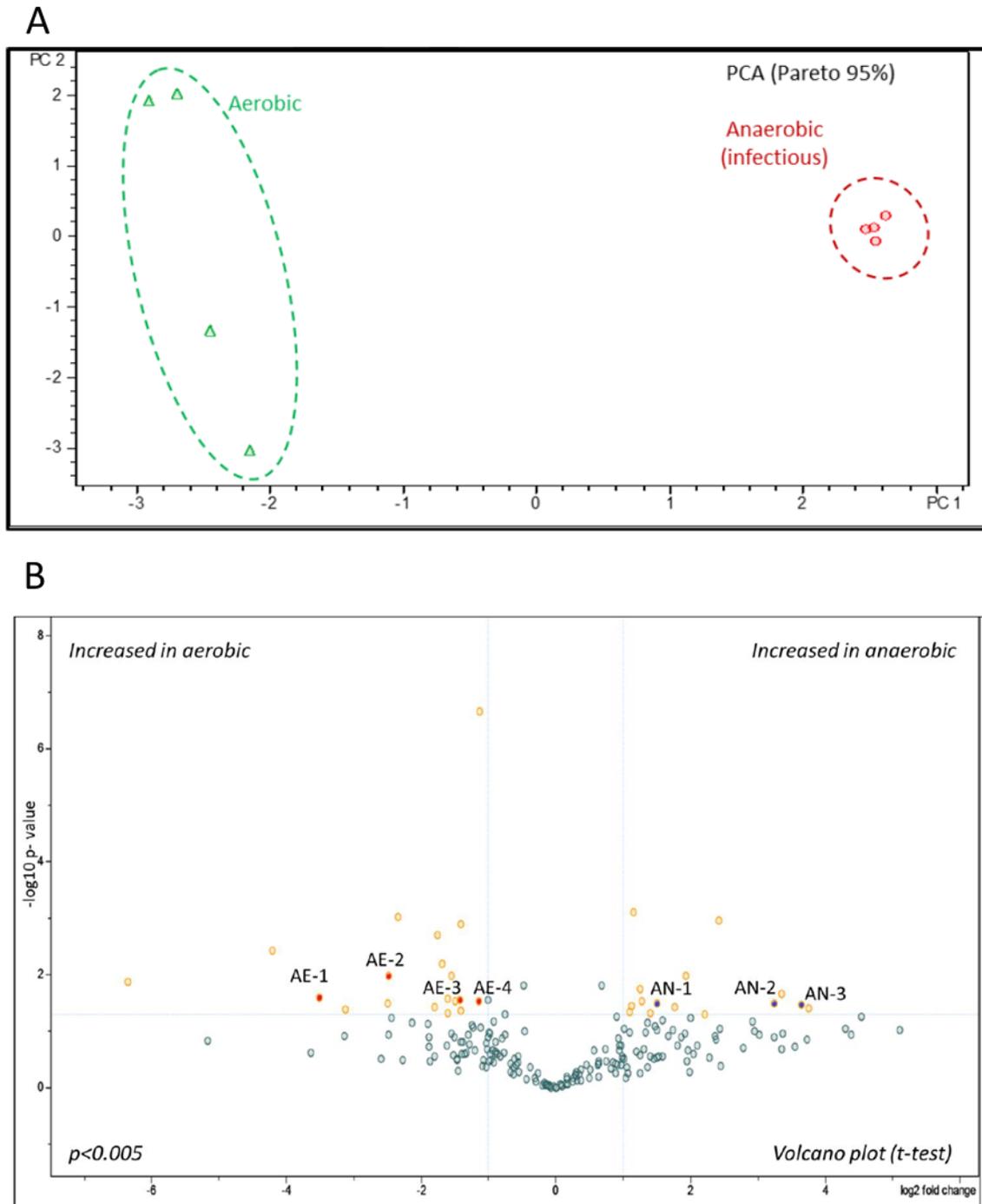


Figure 15. Analyse des sécrétomes de *T. spiralis* par protéomique ascendante

Les sécrétomes des larves cultivées en aérobie (AE-1 à AE-4) et des larves cultivées en anaérobie (AN-1 à AN-4) ont été testés par protéomique ascendante (en shotgun). **A.** Profils de sécrétion de protéines en réponse aux différentes conditions de culture, représentés par un graphique d'analyse en composantes principales. **B.** Graphique Volcano plot représentant les modifications d'expression des protéines différemment sécrétées par log₂. Les protéines identifiées surexprimées dans des conditions aérobies sont surlignées en rouge (AE-1, AE-2, AE-3, AE-4) tandis

que celles surexprimées dans des conditions anaérobies sont surlignées en bleu (AE-1, AE-2, AE-3).

Sur un total de 22 protéines surexprimées dans les conditions aérobies, 4 (AE-1 à AE-4) ont été identifiées et caractérisées (Figure 15.B). De même, dans les conditions anaérobies, 3 (AN-1 à AN-3) des 14 résultats ont été identifiés. Pour l'identification, les spectres MS/MS ont été recherchés à l'aide du moteur de recherche Mascot dans la base de données UniProt de *T. spiralis* (comprenant 33 860 séquences).

Parmi les 4 protéines identifiées, la Secreted Venom Allergen Like (sVAL) (E5SFE6_TRISP) a été identifiée. Les allergènes de type venin (VALs) sont un groupe de protéines sécrétées qui sont hautement conservées parmi les helminthes. Plusieurs études ont démontré une association étroite entre les VALs et le début du parasitisme (Wilbers et al. 2018). Cette protéine est particulièrement intéressante car un homologue a été identifié chez le nématode *Brugia malayi* comme un facteur de virulence important (Murray et al., 2001) et le potentiel vaccinal chez ce modèle est encore en cours d'étude (Kalyanasundaram et Balumuri, 2011).

PERSPECTIVES

L'augmentation du nombre et du contenu protéique des répliquât biologiques peut accroître la couverture du protéome, ce qui permettra d'identifier davantage de biomarqueurs.

La protéine sVAL semble être une cible intéressante que nous allons étudier. Elle pourrait non seulement constituer une cible vaccinale intéressante mais il semblerait qu'il s'agisse d'un facteur de virulence à l'entrée du parasite et pourrait être une bonne cible pour le diagnostic des trichinelloses précoces. Nous avons déjà amplifié sa séquence codante et le clonage est en cours. La production de la protéine recombinante permettra de réaliser les cycles de protein-SELEX avant de tenter de l'utiliser pour le développement d'un test diagnostique (ELASA, ELONA).

Valorisation de la partie I.c

Ce travail a bénéficié du contrat EJP-1Health AptaTrich que je coordonne et fait l'objet d'une partie du travail de thèse de Mr Noah Brosseau que je co-encadre avec le Dr Isabelle Vallée.

Pour apprendre les protocoles de SELEX, j'ai effectué une Short Term Scientific Mission de 4 semaines au National Reference Centre for Parasitology, The Research Institute of the McGill University Health Center, Montreal, Canada.

Avec le Dr Jean-Jacques Fontaine, j'ai co-encadré la thèse vétérinaire de Solène Niederlander, sur les potentielles d'application des aptamères en sciences vétérinaire.

Publication:

[Niederlander S](#), Fontaine JJ, [Karadjian G](#). Potential applications of aptamers in Veterinary Sciences. *BMC Veterinary Researches*, 2021. 52:79.

d. Caractérisation de nouvelles cibles thérapeutiques et vaccinales dans le système neuronal de *Trichinella spiralis*

Étant donné que le système nerveux joue un rôle essentiel dans le contrôle des activités des nématodes, nous en avons étudié deux aspects chez *T. spiralis* afin de caractériser des cibles

thérapeutiques ou vaccinales potentielles. Les neuropeptides et les neurotransmetteurs de *Trichinella* spp. ou leurs récepteurs peuvent être une cible importante pour le traitement de la trichinellose.

Cependant, la localisation et la fonction des neuropeptides de *Trichinella* spp. ont été très peu étudiées. De nombreuses études ont indiqué que les neuropeptides sont essentiels pour le développement normal et pour la survie des organismes. De même chez les nématodes parasites, le système nerveux joue un rôle clé dans le contrôle de toutes les activités physiologiques et comportementales et donc sert de cible principale lors de développement de nouvelles thérapeutiques antiparasitaires. Mais, jusqu'à présent, aucune étude n'a décrit la localisation et de la fonction des différents neuropeptides présents chez *Trichinella* spp. Le mode d'action des neurotransmetteurs est uniforme dans le règne animal et il en est de même dans le système nerveux simple des Nématodes. L'examen du système des neurotransmetteurs des nématodes représente un point crucial pour comprendre leur biologie. Contrairement au système neuropeptidergique, les neurotransmetteurs et leurs récepteurs ont été intensivement étudiés dans divers modèles de nématodes (Terenina & Gustafsson, 2014). Par exemple, récemment, la présence d'une sérotonine a été démontrée chez *T. pseudospiralis* par méthode immuno-cytochimique (Terenina et al., 2016). Chez *Trichinella* spp. la présence d'une activité cholinestérasique (De Vos & Dick, 1992) et de récepteurs cholinergiques (Karadjian et al., soumis) ont été décrits. Les activités stimulantes ou inhibitrices de multiples neurotransmetteurs chimiques ont été testées chez *C. elegans* et *Ascaris suum*. Actuellement, le système de neurotransmetteurs des nématodes parasites est considéré comme une cible idéale pour le développement de leurs mesures de contrôle efficaces. Dans ce contexte, nous avons étudié pour la première fois certains éléments des voies de signalisation neuronale chez *T. spiralis*.

i. Détection et localisation tissulaire des neuropeptides de *T. spiralis*

Comme les séquences d'acides aminés des neuropeptides des nématodes sont très conservées par rapport à celles des arthropodes, nous avons utilisé des anticorps dirigés contre neuropeptides d'arthropodes disponibles au laboratoire. Des immuno-marquages ont été réalisées sur des coupes de paraffine de LIM de *T. spiralis* avec les anticorps dirigés contre les neuropeptides allatostatin CC (ASCC), Crustacean cardioactive peptide (CCAP), Manse-CRF-related diuretic hormone (CRF/DH) et prothoracicotropic hormone (PTTH).

Quelques petits points ont été observés pour les neuropeptides ASCC (Figure 16. A) et PTTH (Figure 16. C) à l'intérieur du stichosome, organe présent uniquement chez les nématodes du genre *Trichinella* et composé de cellules appelées stichocytes. Ce résultat suggère que l'ASCC et la PTTH peuvent être localisés dans certaines cellules des stichocytes, bien que la localisation précise doive être confirmée.

Les deux neuropeptides CCAP (Figure 16. B) et CRF/DH (Figure 16. D) sont présents uniquement dans certains stichocytes, alors qu'ils sont absents dans d'autres. Ce résultat intéressant suggère que seuls certains stichocytes peuvent être spécialisés dans la production de ces neuropeptides. Sur la base de ces observations, il semble que les stichocytes positifs soient probablement de type bêta, mais des recherches supplémentaires sont nécessaires pour étayer cette conclusion.

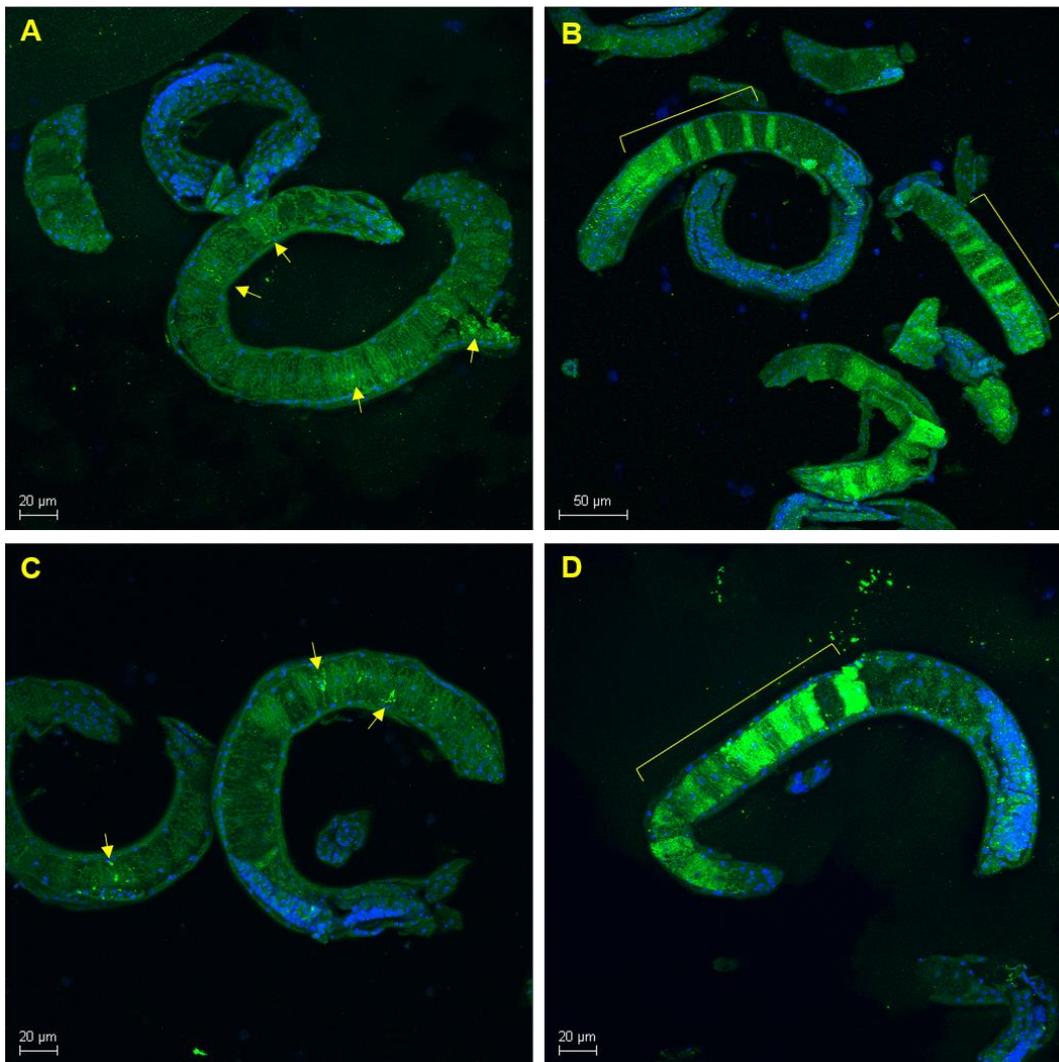


Figure 16 : Marquages des neuropeptides de *Trichinella spiralis*.

Photos prises par microscopie confocale montrant quatre neuropeptides différents cartographiés par immunomarquage sur des sections de larves musculaires de *T. spiralis* enrobées de paraffine. Chaque neuropeptide est marqué par un anticorps primaire spécifique et révélé par un anticorps secondaire couplé à un Alexafluor 488. Les noyaux sont marqués par le DAPI. **A.** Les ASCC situés dans les tissus des larves sont indiqués par des flèches. **B.** CCAP est présent dans certains stichocytes, mais absent dans d'autres. **C.** Les PTTH situés dans les tissus des larves sont indiqués par des flèches. **D.** Le CRF/DH est présent dans certains stichocytes, mais absent dans d'autres.

Dans cette étude préliminaires les neuropeptides ASCC, PTTH, CCAP et CRF/DH ont été identifiés dans les larves musculaires de *T. spiralis* pour la toute première fois. Les anticorps que nous avons utilisés ont été produits pour des arthropodes, ce qui prouve la conservation de la séquence des neuropeptides entre les nématodes et les arthropodes, ce qui est également vérifié par nos analyses *in silico*. ASCC et PTTH sont concentrés dans de très petites zones à l'intérieur des stichocytes (cellules présentes uniquement chez les nématodes du genre *Trichinella*), (Figure 16 A et C) ce qui pourrait suggérer qu'ils sont produits dans des organelles sécrétoires, comme l'appareil de Golgi, mais leur localisation précise reste à étudier. Les colorations CCAP et CRF/DH (Figure 16 B et D) ont montré des schémas clairs dans le stichosome, certains stichocytes sont nettement plus fluorescents que les autres. Ces résultats indiquent que les stichocytes ont des fonctions différentes et que seuls certains peuvent être spécialisés dans la production de ces neuropeptides. Sur la base de ces observations, il semble

que les stichocytes positifs soient probablement de type bêta, mais des recherches supplémentaires sont nécessaires pour étayer cette conclusion. Il est impossible de conclure à la position exacte de ces stichocytes fortement fluorescents, car les sections de paraffine sont trop petites pour inclure les deux extrémités du stichosome des larves.

PERSPECTIVES

Pour pouvoir obtenir plus d'informations, nous avons besoin soit d'un grand nombre de sections de paraffine immuno-colorées, soit d'une autre méthode de sectionnement mieux adaptée à la taille des larves. Une autre approche intéressante serait également de confirmer nos données immuno-histochimiques par la visualisation des ARNm codant pour ces neuropeptides par hybridation *in situ* (Simo et al 2009).

Si la spécificité de nos marquages des neuropeptides dans les stichocytes est confirmée, cette découverte pourrait être d'une importance capitale pour le contrôle de cet agent pathogène d'origine alimentaire puisqu'elle offre la possibilité de tester de nouvelles molécules ou de nouveaux vaccins.

ii. Découverte d'un récepteur muscarinique à l'acétylcholine fonctionnel chez *T. spiralis*

Une recherche d'homologie par BLAST dans la base de données du génome de *T. spiralis* a révélé quelques neuropeptides/récepteurs de neurotransmetteurs de *T. spiralis*. Plus précisément, le mACh-R de *T. spiralis* (XP_003380401.1) identifié est similaire à 59,75% au mACh-R de *C. elegans* (NP_001024236.1) ; le récepteur de l'hormone adipocinétique de *T. spiralis* (XP_003380333.1) est similaire à 47,99% au récepteur AKH humain (NP_001362293.1) ; le récepteur CCAP putatif de *T. spiralis* (XP_003372292.1) est similaire à 26,01% similaire au récepteur CCAP 9 de *Drosophila melanogaster* et 27,74% similaire au fragment du récepteur CRZ de *Schistocerca gregaria* (BAS29665.1) ; le récepteur putatif du glucagon de *T. spiralis* (XP_003377175.1) est 25,13% similaire au récepteur de l'hormone diurétique liant CRF/DH de *Manduca sexta* ; le récepteur putatif du neuropeptide Y de type 6 de *T. spiralis* (XP_003380819.1) est 35,13% similaire au récepteur court du neuropeptide F de *Thaumetopoea pityocampa* (QMS43313.1) et 29,33% similaire au récepteur SIFa de *D. melanogaster* ; le récepteur PDF de *T. spiralis* (XM_003382069.1) est 39,71% similaire au récepteur PDF de *D. melanogaster* (NP_001245501). Dans tous les cas, toutes les séquences de récepteurs détectées possèdent 7 domaines transmembranaires, ce qui est typique des récepteurs liés aux protéines G (RCPG). Comme le mACh-R de *T. spiralis* (XP_003380401.1) présentait la plus forte homologie avec un récepteur connu, il a été étudié plus en détail.

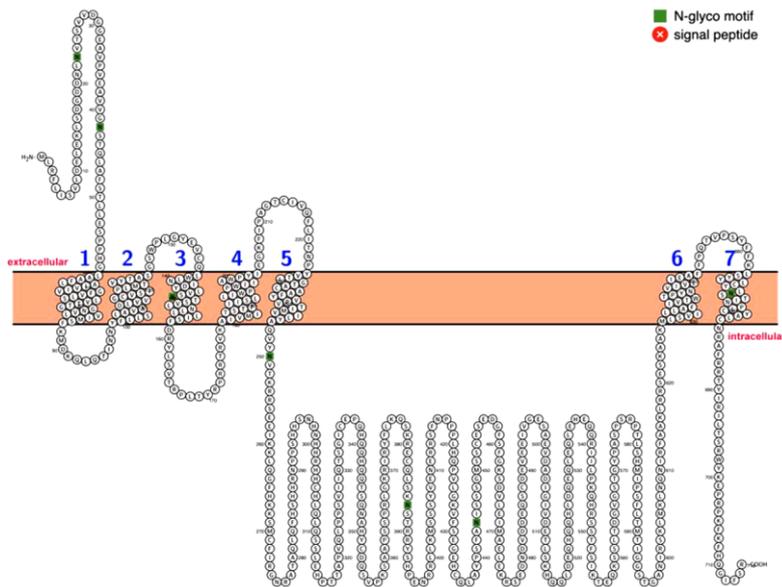


Figure 17. Organisation transmembranaire du récepteur mAChRs (XP_003380401.1) de *T. spiralis*.

La séquence a été insérée dans le logiciel Protter 1.0 (<https://wlab.ethz.ch/protter/start>). Les motifs verts indique les sites de N-glycosylation ; les numéros bleus montrent les hélices transmembranaires.

L'analyse de ce récepteur a révélé que sa séquence est sans intron et encode 715 résidus d'acides aminés contenant sept segments transmembranaires putatifs (Figure 17).

La séquence codante a été clonée et séquencée à partir de l'ARNm extrait de LIM de *T. spiralis*. Les analyses phylogénétiques du mAChR-A de *T. spiralis* avec les mAChRs des vertébrés et des invertébrés démontrent un cluster orthologue clair dans le groupe mAChR-A pour les nématodes et les arthropodes (Figure 18). Le mAChR-A de *T. spiralis* est un orthologue du mAChR-A de *D. melanogaster* et de *I. scapularis*. Il a récemment été montré que ce récepteur était couplé aux voies de mobilisation du Ca^{2+} via la sous-unité Gq11 (Mateos-Hernández et al., 2020 ; Ren et al., 2015). L'alignement des séquences protéiques de *T. spiralis*, *C. elegans*, *C. briggsae* et *I. scapularis* mAChR-A montre des niveaux d'identité élevés de leurs séquences protéiques, ce qui indique qu'elles sont liées à la même voie de signalisation en aval lors de l'activation. Il est intéressant de noter que trois autres mAChR putatifs de *T. spiralis* ont été détectés, tous appartenant à la clade des mAChR de type B et donc probablement couplés à la voie inhibitrice G1/o de l'AMPC, comme cela a été démontré pour le mAChR-B de la drosophile (Ren et al., 2015).

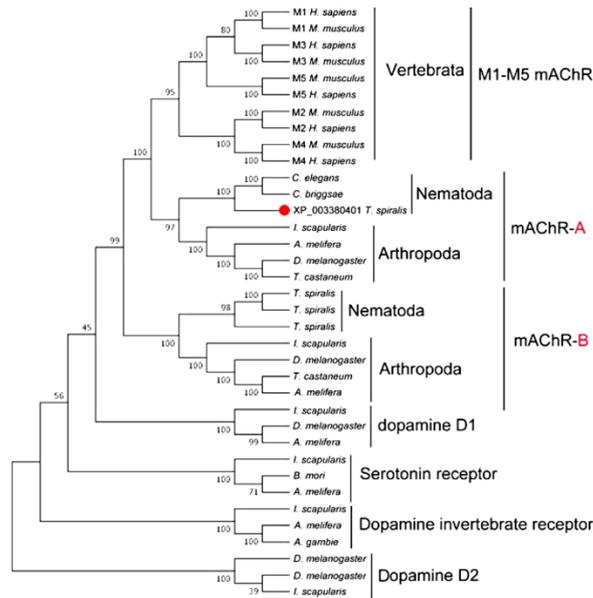


Figure 18. analyses phylogénétiques du mACH-R-A de *T. spiralis*

Relation phylogénétique entre les différents types de mACH-R (m1-m5 des mammifères et A et B des nématodes et arthropodes), les récepteurs de la dopamine (type D1 et D2 des invertébrés) et les récepteurs de la sérotonine (des invertébrés). Le mACH-R-A de *T. spiralis* (XP_003380401.1) cloné est représenté par le point rouge. L'arbre phylogénétique a été construit en utilisant la méthode de Neighbour-Joining dans le logiciel MEGA7, avec 500 répliquât de bootstrap.

Afin de réaliser l'essai fonctionnel, des cellules CHO ont été transfectées avec le vecteur d'expression pcDNA3.1+ contenant la séquence. Ces cellules expriment aequorine. Lorsque le ligand d'un récepteur surexprimé dans ces cellules se fixe au récepteur, une cascade de réaction conduit à l'augmentation d'ions calcium Ca^{2+} dans la cellule ce qui génère une émission de lumière par aequorine. Cet essai est alors suivi sur un luminomètre. Il a été possible d'obtenir un signal positif dose-dépendent en mettant les cellules en présence de l'acétylcholine, le ligand naturel des mACHRs. Après ajout d'atropine, un antagoniste de ces récepteurs, un effet négatif dose-dépendent a été obtenu. Ces résultats constituent la preuve de l'existence d'un récepteur muscarinique à l'acétylcholine fonctionnel chez *T. spiralis*.

PERSPECTIVES

La recherche initiale indique la présence de multiples récepteurs de neurotransmetteurs et de neuropeptides, mais une analyse phylogénétique approfondie ainsi qu'une identification fonctionnelle de ceux-ci sont nécessaires afin de confirmer leur caractéristique fonctionnelle. Par exemple, est ce que le neuropeptide CCAP détecté se lie au récepteur ayant une homologie de 26% avec le récepteur au CCAP de *Drosophila melanogaster*.

Par la suite, il s'agira d'étudier pour la première fois en détail les systèmes neuropeptidergiques et neurotransmetteurs de *T. spiralis* sur trois axes :

1. Explorer la distribution de plusieurs neuropeptides spécifiques dans les différentes parties du ver. Cette approche vise à révéler le côté libérateur de différents

neuropeptides (système nerveux de différentes cellules viscérales) menant à des implications fonctionnelles ;

2. Identifier fonctionnellement les récepteurs de neuropeptides/ neurotransmetteurs sélectionnés et tester leurs activités dans des tests *in vitro* et *in vivo* ;
3. Identifier un antigène protecteur parmi les éléments moléculaires (neuropeptides, neuropeptides/récepteurs neurotransmetteurs) du système nerveux de *T. spiralis* pour tester un vaccin anti-*T. spiralis*.

Valorisation de la partie I.c

Ce travail a fait l'objet du stage de Master 2 de Me Caina Ning.

Publication:

Ning C, **Karadjian G*** and Simo L*. A First Insight into the *Trichinella spiralis* Neurobiology. * equal contribution. En préparation.

II. Outils d'identification de Nématodes des viandes

a. Identification d'espèces au sein du genre *Trichinella*

i. Révision de la PCR multiplexe

L'identification d'espèces au sein du genre *Trichinella* se fait par la PCR multiplexe. Par rapport à la PCR classique, elle est capable d'amplifier plus d'une séquence au cours d'une seule analyse PCR grâce à l'utilisation de plusieurs paires d'amorces spécifiques pour chaque cible attendue. Habituellement, les produits de cette réaction sont visualisés sur une électrophorèse sur gel, où chaque cible se manifeste par un motif de bande spécifique.

La PCR multiplex est une méthode de choix pour l'identification moléculaire de *Trichinella* spp. Cependant, elle ne sert pas de méthode de détection du parasite dans les matrices alimentaires proprement dites mais est principalement destinée à une caractérisation plus poussée des larves récupérées par des méthodes de digestion d'échantillons groupés. Il est de la plus haute importance pour une telle approche de pouvoir travailler autant avec beaucoup de matériel d'entrée qu'avec une seule larve car une seule larve est souvent détectée dans les biopsies humaines ou la viande d'animaux destinés à la consommation humaine (Pozio, 2000). Cette disposition garantit en outre la reconnaissance des infections mixtes, où plus d'une espèce de *Trichinella* est présente.

Actuellement, la PCR multiplexe permet elle-même une discrimination fiable de neuf des treize assemblages de *Trichinella* décrits à ce jour (Karadjian et al., 2017). La réaction consiste en cinq paires d'amorces ciblant des segments partiels de la grande sous-unité de l'ADNr (Zarlenga et al., 1999), en particulier le segment d'expansion V (ESV) et les séquences répétées des internal transcribed spacer 1 et 2 (ITS1, ITS2). Sur l'électrophorèse sur gel, les espèces sont ensuite reconnues par le motif typique d'une à trois bandes de tailles différentes.

T. nativa et *T. patagoniensis* sont distingués en suivant le séquençage du fragment ESV. Les génotypes T8 et T9 peuvent être différenciés de *T. britovi* par une analyse RFLP supplémentaire ; en particulier T9 après digestion du gène codant pour un antigène ES de 43 kDa avec l'endonucléase Ssp I (Wu et al., 1999) ou le gène mitochondrial (mt) de la sous-unité I (COI) de la cytochrome c oxydase digéré avec Mse I ou avec Alu I afin de reconnaître le génotype T8 (Nagano et al., 1999). *T. nativa* et *T. chanchalensis* sont également distingués par un PCR-RFLP (Sharma et al., 2020).

La PCR multiplexe est une approche de base permettant de surpasser la microscopie conventionnelle en termes de rapidité, de facilité de travail et de limite de détection (Lindergard et al., 2003). Cependant, un inconvénient majeur des tests PCR multiplexe est un biais d'amplification, qui est causé par un grand nombre et une concentration élevée d'amorces utilisées dans la réaction ainsi que par la contribution de cibles de différentes longueurs (Nolan & White, 2006), puisque l'amplification préférentielle de produits plus petits peut se produire (Verweij & Stensvold, 2014).

Cela peut conduire à la formation de produits d'amplification non spécifiques, qui sont souvent obtenus en utilisant une faible concentration d'ADN (Zarlenga et al., 1999). Par conséquent, une stratégie de PCR nichée basée sur une étape de pré-amplification utilisant une paire d'amorces supplémentaires avant la PCR multiplex elle-même, est souvent utilisée ; néanmoins,

après l'introduction d'autres composants supplémentaires, des problèmes peuvent parfois apparaître avec l'absence de certains profils de bande.

Tous les ans, le Laboratoire de Référence de l'Union Européenne (LRUE) sur les parasites transmis par les aliments organise des Essai Inter Laboratoire d'Aptitude pour l'identification d'espèces de Nématodes du genre *Trichinella* à destination des Laboratoires Nationaux de Référence (LNR) des états membres de l'UE. La technique de référence préconisée est la PCR multiplexe. Il s'est avéré que pour l'identification de *Trichinella murrelli*, 33% des LNR (7/21) n'ont pas identifié la bonne espèce.

Nous avons donc réalisé une étude du profil de bande des différentes espèces de *Trichinella*. Dans ce cadre, il a été possible de constater que les profils de bandes attendus (Zarlenga et al., 1999) pour *Trichinella murrelli* est différent. Une extra bande apparait et peut gêner à l'interprétation du résultat (Figure 19 A).

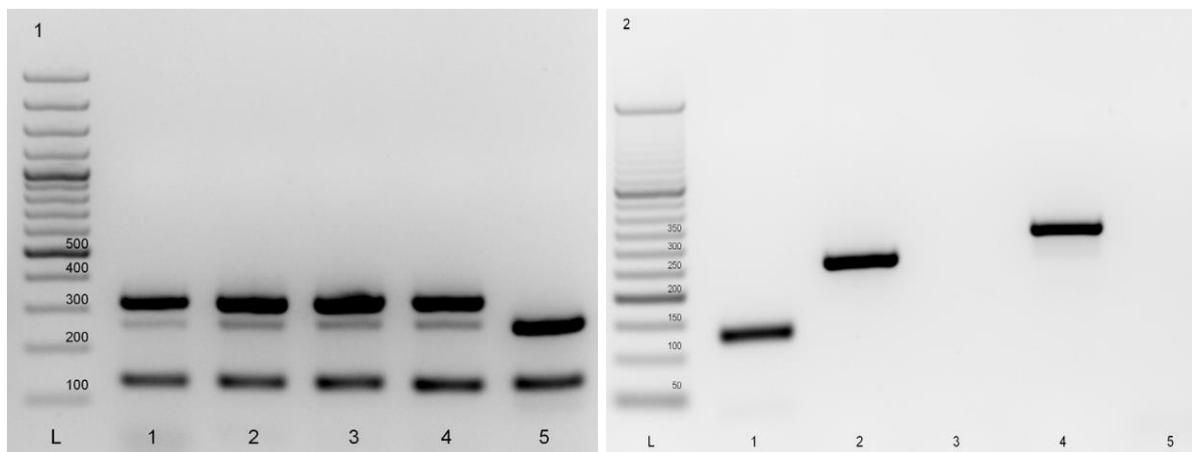


Figure 19 : Profils électrophorétiques des PCR de *T. murrelli*.

1. Profil électrophorétique de la PCR multiplexe à partir de l'extrait d'ADN de *T. murrelli* (Lignes 1 à 4) et de *T. britovi* (Ligne5) ; 2. PCR simplex à partir de larve de *T. murrelli* avec les couples d'amorces ciblant les fragments de Expansion Segment V (ligne 1), Internal Transcribed Spacer 1 II (Ligne 2), ITS1 III (ligne 3), ITS2 IV (ligne 4), et ITS2V (ligne 5).

Pour savoir quel couple de primer amplifie un fragment non attendu des PCR simplex ont été réalisées avec les différents couple d'amorces. Il a été possible d'obtenir des amplicons pour l'expansion segment V (ESV) et le fragment IV de l'Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2 IV) qui étaient attendus (Zarlenga et al., 1999), mais également pour le fragment II de l'ITS1 (Karadjian et al., 2017). L'apparition de la bande supplémentaire avait déjà été observé (Zarlenga et al., 2001) mais l'apparition était intermittente et avait été ignorée. L'analyse des séquences a montré qu'un seul acide nucléique est différent dans la zone d'hybridation de l'amorce sens (Figure 19B) ce qui expliquerait l'intermittence de l'apparition de la bande. Le séquençage réalisé sur le fragment obtenu en plus a bien montré l'appartenance à l'espèce *T. murrelli*. L'apparition de ce troisième fragment a pu conduire à la mauvaise interprétation lors des EILA. D'autre part, lors de l'utilisation de plusieurs larves pour l'extraction d'ADN avant la PCR, il est possible de considérer une infection mixte à *T. murrelli* et *T. britovi*.

Fort de notre expertise, une étudiante de Master de l'Université de Yerevan (Arménie) est venue réaliser son stage dans notre laboratoire sur ses propres échantillons. Plus tard, un chercheur de

l'Université de Yerevan est également venu terminer ces travaux et également se former. Dans les échantillons, des larves de *T. britovi* ont pu être identifiées pour la première fois dans des échantillons d'Arménie, chez un lynx et un renard. Ceci implique qu'une surveillance doit être mise en place en Arménie notamment pour les viandes d'animaux chassés.

ii. Développement d'une base de données MALDI-TOF

Jusqu'à présent, la différenciation des larves au niveau de l'espèce et du génotype est basée principalement sur des méthodes moléculaires telles que la PCR multiplexe présentée précédemment, mais également les PCR-RFLP pour différencier certains génotypes, ou l'amplification par PCR suivi d'un séquençage. Cependant, toutes ces méthodes moléculaires nécessitent un niveau élevé de compétences pour une bonne interprétation des résultats, certaines sont coûteuses, chronophages et nécessitent d'utiliser de nombreux témoins, notamment lorsque l'on doit comparer les profils de bandes d'un échantillon à celui des témoins.

La spectrométrie de masse par désorption laser assistée par matrice et ionisation en temps de vol (MALDI-TOF MS) est une technique d'ionisation permettant l'analyse par spectrométrie de masse de biomolécules telles que les protéines. C'est une méthode présentant une grande rapidité, une préparation minimale des échantillons et un coût très bas. Comme la composition protéique de chaque organisme et le spectre MALDI-TOF MS sont uniques, les spectres obtenus peuvent être comparés à une base de données de micro-organismes connus qui permettent d'obtenir une identification avec une grande confiance. Aucune base de données de spectre de masse de référence n'existe à l'heure actuelle pour les parasites contrairement aux bactéries et aux champignons. Des bases de données de recherche pour l'identification des protozoaires ont été développées (Calderaro et al., 2018 ; Lachaud et al., 2017). Et le potentiel du MALDI-TOF MS pour l'identification des espèces d'helminthes a été mis en évidence (Feucherolles et al., 2019). Quelques études ont été réalisées pour l'identification des helminthes par MALDI-TOF MS. La technologie permet une identification facile des espèces de cercaires Trematodes (Huguenin et al., 2019) et la détection de nématodes filaires dans leur vecteur *Aedes aegypti* (Tahir et al., 2017) ou de *Schistosoma* chez la souris (Huang et al., 2016).

Nous avons donc créé une base de données MALDI-TOF avec différentes espèces et génotypes de Nématodes du genre *Trichinella* soit entretenues dans les souchothèques vivantes de différents laboratoires soit provenant d'hôtes de différentes localisations géographiques (France, Allemagne, Pologne et Roumanie). Nous avons pu générer des spectres de masse de référence pour douze espèces/génotypes de *Trichinella* et toutes les espèces ont pu être clairement distinguées par des profils de pic différents (Figure 20). Chaque espèce est parfaitement identifiée malgré une valeur Log du score qui est parfois juste en dessous de 2 (valeur donnée par le fournisseur du MALDI-TOF pour les bactéries et champignons). 5 des 6 échantillons de *T. nativa* était au-dessus de 2 et le sixième était à 1,97 ce qui est très proche.

Les cinq spectres de *T. pseudospiralis* étudiés présentaient des valeurs inférieures à 2,00, permettant une identification du genre mais pas une identification fiable de l'espèce selon le seuil proposé par Bruker Daltonics. Cependant, il faut souligner que la base de données générée ne comprend que cinq spectres de différentes souches de *T. pseudospiralis*, et ce qui permettait de s'attendre à ce que l'appariement de ces souches donne lieu à des valeurs de score faibles car elles proviennent de régions géographiques très différentes. Il est bien connu que cette espèce

non encapsulée s'est avérée être aussi génétiquement très distincte (Pozio et Zarlenga, 2013 ; Pozio, 2016). Dans notre étude, les spectres de *T. pseudospiralis* correspondaient parfaitement à d'autres souches de la même espèce avec des valeurs beaucoup plus élevées que les spectres d'autres *Trichinella* spp. Par conséquent, l'identification de l'espèce dans ces cas semble possible et fiable, même avec des valeurs de score inférieures. L'idée d'abaisser le niveau du seuil proposé par Bruker Daltonics a également été prise en compte dans une étude précédente (Mayer-Scholl et al., 2016). Cependant, afin de définir le seuil approprié pour cette espèce, une étude plus approfondie est nécessaire avec un plus grand nombre d'isolats de *T. pseudospiralis* étudiés.

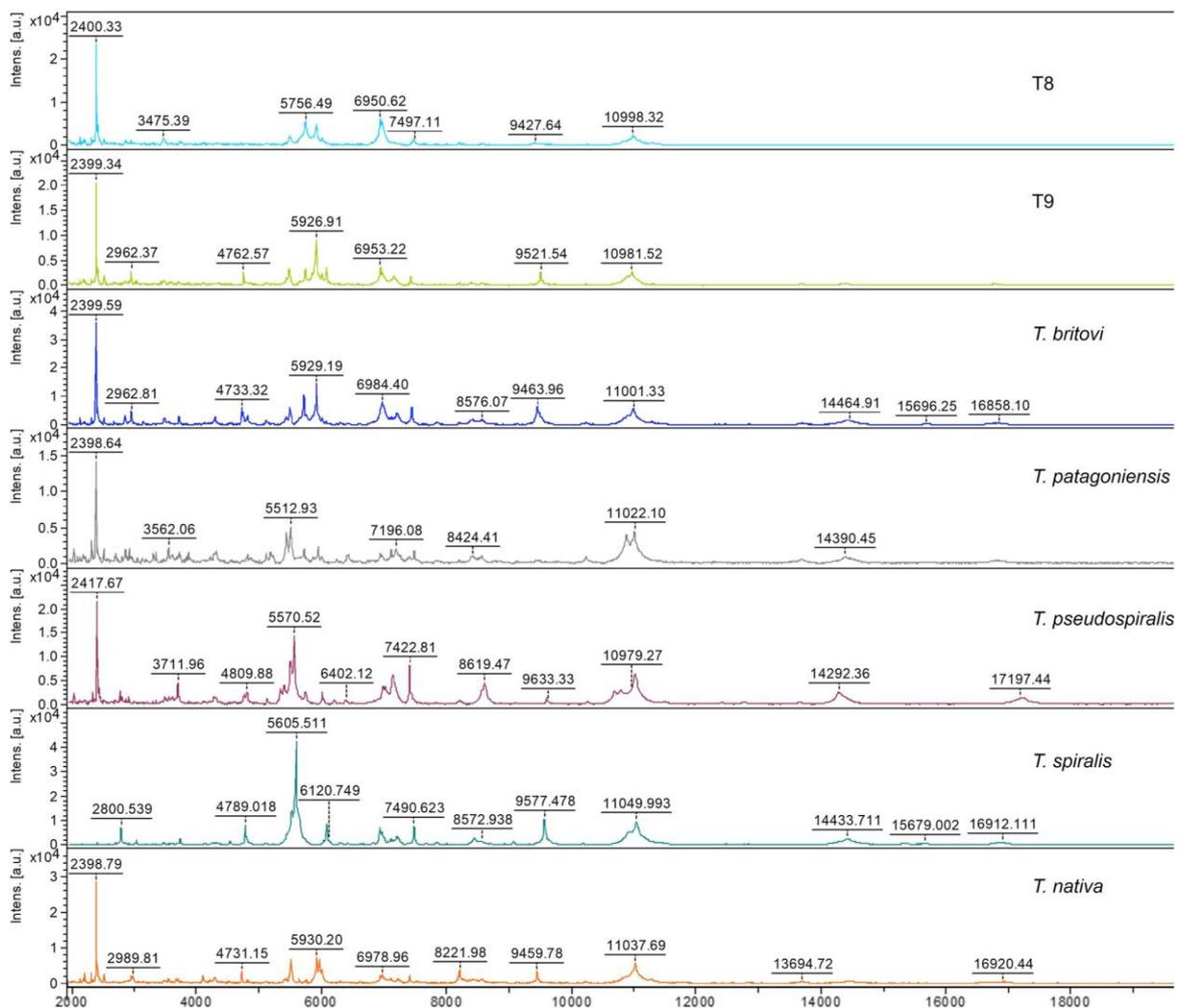


Figure 20. Spectres MALDI-TOF des échantillons français.

Les rapports masse/charge (m/z) sont données sur une page zoomée de 2000 à 18 000.

Les dendogrammes générés à partir de ces Spectres de Masses de Références pour les échantillons de chaque pays étudié séparément ont permis d'obtenir des groupes par espèces. Par exemple pour les échantillons de France, un groupe a été obtenu pour *T. spiralis*, un groupe

pour *T. pseudospiralis* et un autre contient *T. britovi*, *T. nativa*, *T. patagoniensis*, T8 et T9. Ces espèces sont connues pour être très proches phylogénétiquement (Figure 21). De façon intéressante, au sein de ce troisième groupe, un sous-groupe contient toutes les espèces de *T. britovi*.

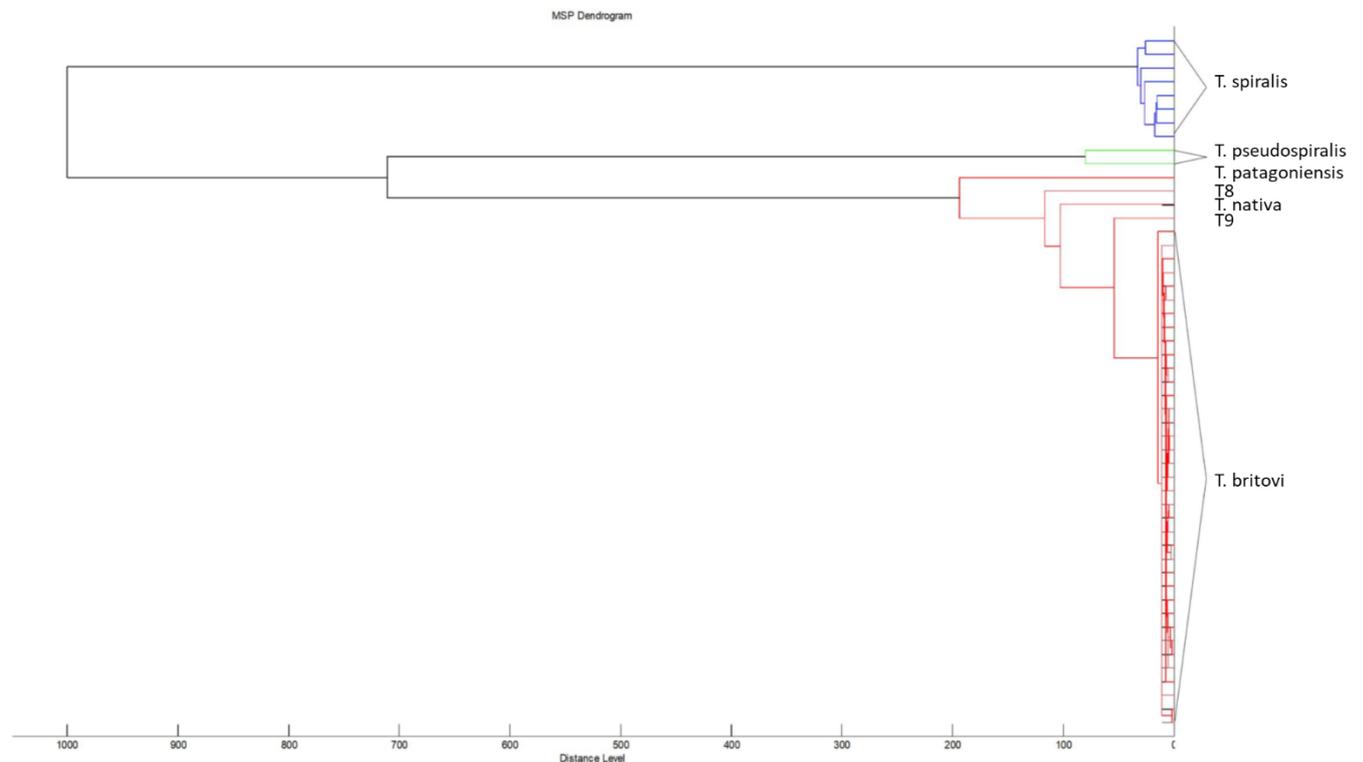


Figure 21. Analyse des spectres de références de la base de données française MALDI MS par dendrogrammes.

Les paramètres sont configurés pour une mesure de la distance de corrélation et pour des liaisons simples. Trois clades séparés ont été obtenus : le premier clade de *T. spiralis* (en bleu); le deuxième - *T. pseudospiralis* (en vert) et le troisième clade - *T. britovi* avec *T. patagoniensis*, *T. nativa*, T8 et T9 (en rouge).

Lorsque le dendrogramme est généré avec l'ensemble des spectres, les groupes obtenus pour chaque pays sont respectés, avec un groupe contenant tous les *T. spiralis*, un groupe contenant tous les *T. pseudospiralis* et un groupe contenant tous les *T. britovi*, les *T. nativa*, *T. patagoniensis*, T8 et T9 (Figure 22). Un groupe supplémentaire est composé des échantillons de Nématodes autres que *Trichinella* et est bien distinct des autres groupes. Mais au sein de chaque groupe, l'arborescence devient plus complexe. *T. britovi* forme deux sous-groupes distincts, un sous-groupe est composé des échantillons de Pologne et d'Allemagne et l'autre des échantillons essentiellement de France, peu d'Allemagne et un de Pologne. Chacun de ces sous-groupes est bien distinct des autres. D'autre part, deux sous-groupes formés par des échantillons de *T. nativa* sont également distincts. Ces résultats montrent une variabilité intra-spécifique intéressante.

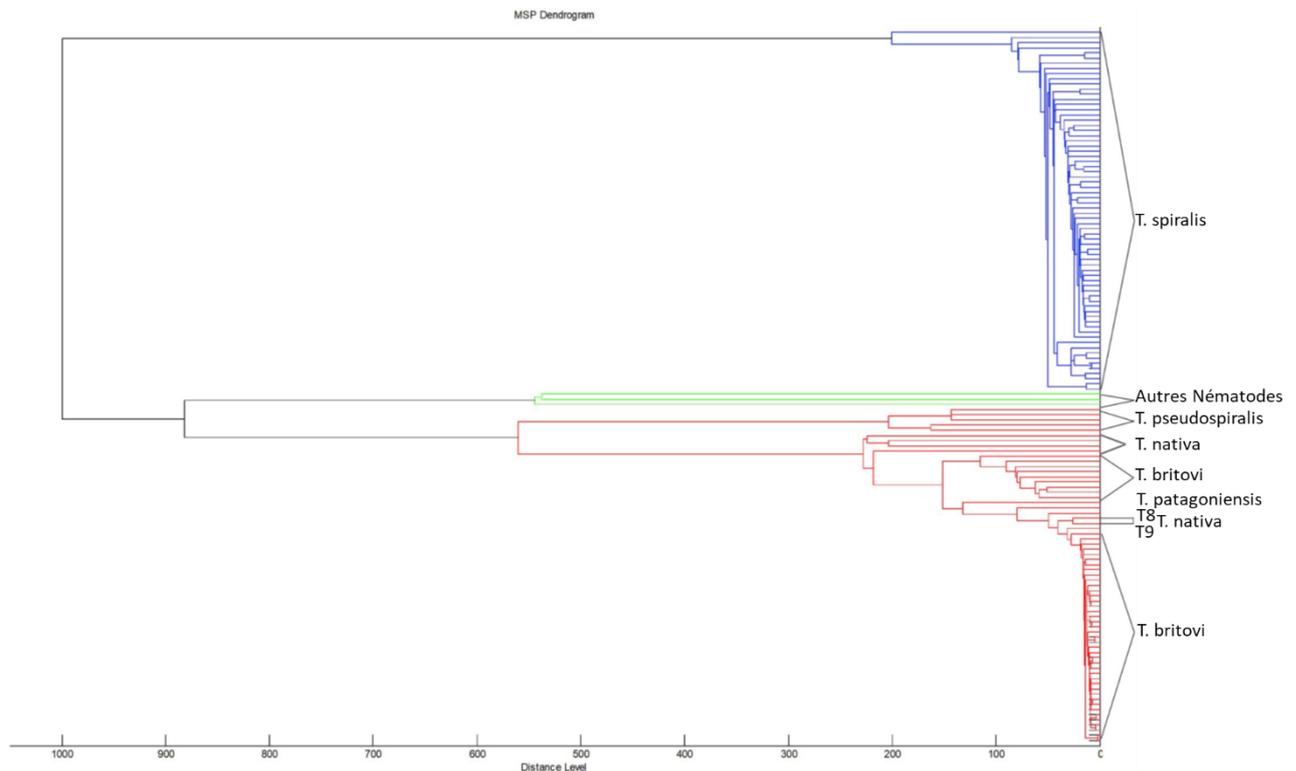


Figure 22. Analyse des spectres de références de la base de données MALDI MS complète par dendrogrammes.

Les paramètres sont configurés pour une mesure de la distance de corrélation et pour des liaisons simples. Trois clades séparés ont été obtenus : le premier clade de *T. spiralis* (en bleu); le deuxième – Autres Nématodes (en vert) et le troisième clade – *T. pseudospiralis* (groupe bien séparé), *T. britovi*, *T. patagoniensis*, *T. nativa*, T8 et T9 (en rouge).

De façon très intéressante, des souches identiques entretenues dans des laboratoires différents depuis plusieurs décennies par passages successifs en souris puis utilisées séparément pour la génération des spectres de masse ont un spectre de masse identique et sont retrouvées dans le même cluster sur les dendrogrammes. (*T. spiralis* ISS004 – ISS104 – ISS1100 – ISS889 – ISS596 – ISS51, *T. britovi* ISS100 – ISS137 – ISS235 and *T. nativa* ISS42). Ces résultats confirment les expériences génétiques précédentes, qui ont montré que le passage d'une souche sur plusieurs générations ne modifie pas la structure génétique de ces souches (La Rosa et al., 2018).

PERSPECTIVES

L'utilisation de la technologie MALDI-TOF est beaucoup plus rapide et moins coûteuse que la PCR multiplexe. D'autre part, elle demandera moins d'expertise dans l'interprétation du résultat puisqu'il ne dépendra pas du profil de bandes lu sur un gel mais d'un score calculé automatiquement à partir d'une base de données existante de spectres de référence.

A terme, cette technologie sera une bonne alternative pour l'identification d'espèces de *Trichinella*. Néanmoins, avant d'être validée par les laboratoires compétents, de nombreux points d'amélioration sont à apporter :

- Incrémenter la base de données avec de nombreuses autres souches permettra d'augmenter considérablement la robustesse et de pouvoir diminuer le seuil de score pour certaines espèces ;
- La matrice utilisée dans ces expériences est l'Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique, HCCA. Il est utilisé classiquement pour les spectres de masses bactériens et a un potentiel d'utilisation sur des protéines allant jusqu'à 30 kDa. Or *Trichinella* est un organisme eucaryote produisant des protéines allant jusqu'à 115 kDa. L'utilisation d'une autre matrice, comme l'acide salpinique permettrait d'élargir aux protéines jusqu'à 100 kDa, ce qui augmentera considérablement la résolution de l'analyse.
- La technologie s'est récemment améliorée notamment avec la possibilité d'acquérir les ions positif/négatif ce qui permet de générer des spectres protéiques/lipidiques. L'Anses a récemment acquis cette technologie. L'utilisation augmentera également la résolution.

Valorisation de la partie II.a :

Une partie de ce travail a été le stage de Master de Mme Gohar Grigoryan (Université de Yerevan, Arménie) et également l'objet de la mission du Dr Sargis Aghayan (Université de Yerevan).

Ce travail a également bénéficié d'un financement pour une mission scientifique de courte durée, au BfR, à Berlin, par le COST européen Foodborne Parasites.

Publications:

Karadjian G, [Heckmann A](#), La Rosa G, Pozio E, Boireau P, Vallée I. Molecular identification of *Trichinella* species by multiplex PCR: new insight for *Trichinella murelli*. *Parasite*. 2017; 24 (52).

[Grigoryan G](#), Aghayan S A, Gevorgyan H, Malkhasyan A, Vallée I and **Karadjian G**. The first report of *Trichinella britovi* in Armenia. *Iranian Journal of Parasitology*. 2020; 15 (3): 452-456.

Karadjian G, Biliska-Zajac E, Bahn P, Py JS, Johne A, Gassilloud B, Rózycki M, Cencek T, Mayer-Scholl A, Vallée I. Species identification of *Trichinella* originated from various host and different geographical location by MALDI-TOF. *Experimental parasitology*. 2020, 107890.

b. Identification d'espèces de nématodes n'appartenant pas au genre *Trichinella*

i. Stratégie d'identification en deux étapes combinant la morphologie et la biologie moléculaire

Lors des analyses réglementaires pour la détection de *Trichinella* spp. dans les viandes, il arrive fréquemment de trouver d'autres nématodes. Ces nématodes se retrouvent accidentellement dans ces hôtes dits paraténiques. Ils ne se développent pas chez ces hôtes inhabituels pour eux mais ils peuvent rester présents et vivants. Certains d'entre eux sont zoonotiques et conservent leur pouvoir infectieux ou migratoire pouvant alors provoquer des dégâts si la viande contaminée est consommée peu ou insuffisamment cuite. Il est donc nécessaire d'identifier l'espèce de nématode qui a été récupérée afin que les autorités compétentes puissent prendre les mesures sanitaires appropriées et de gérer le traitement des carcasses lorsque les larves n'appartiennent pas au genre *Trichinella*. Certaines espèces comme celles des genres *Toxocara*

et *Ascaris* possèdent une cavité buccale avec trois lèvres (Figure 23 A), d'autres comme *Metastrongylus* spp. ont un bouchon terminal enroulé (Figure 23 B-C).

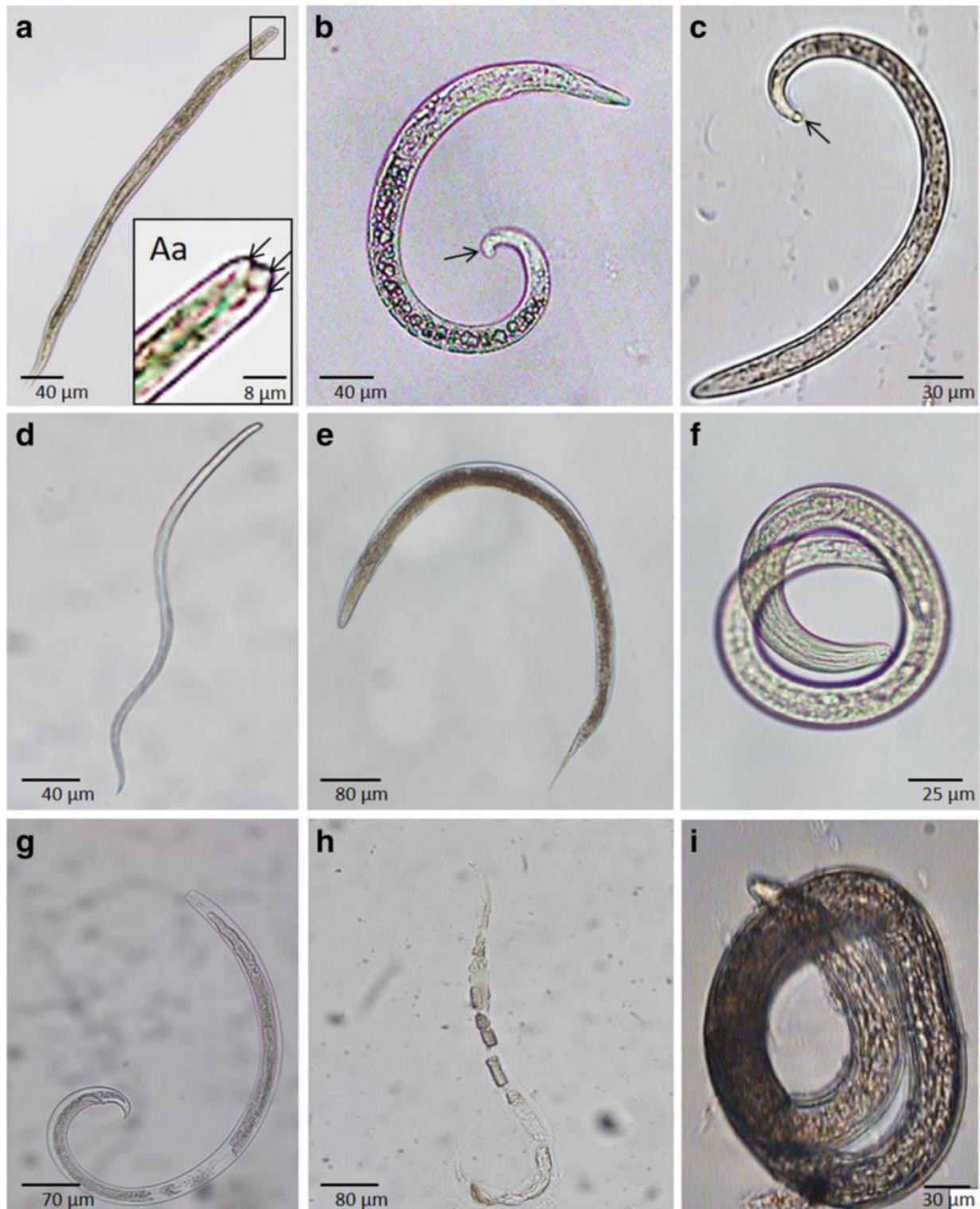


Figure 23. Larves de Nématodes détectées dans les échantillons de muscle après digestion artificielle. a. Larve de *Toxocara cati* – Aa est un zoom de la partie antérieure montrant les trois lèvres offrant un vestibule pour la cavité buccale; b-c. Larves de *Metastrongylus* spp. avec un bouchon terminal enroulé (Flèches); d. Larve très allongée sans structure interne visible; e. Larve avec une partie antérieure effilée mais avec un décollement de la cuticule et les structures internes abîmées; f.

Larve sans critère morphologique visible ; g-i. Larves très abimées avec des structures internes fragmentées ou écrasées.

Mais souvent, il existe peu de critères morphologiques spécifiques d'espèce ou du genre pour le stade larvaire (Figure 23 D et F). D'autre part, ces larves ne sont pas contenues dans une capsule comme *Trichinella* spp. et sont donc plus exposées à la pepsine en milieu acide lors de la digestion artificielle des muscles ; leur morphologie est souvent impactée (Figure 23 E et G-I).

Un examen morphologique a été réalisé sur 45 larves provenant d'analyses réglementaires (2 du Luxembourg, 20 de France et 23 d'Allemagne). 19 larves ont pu être identifiées au niveau du genre, soit 42%. Pour les larves qui n'ont pas pu être identifiées morphologiquement, une PCR ciblant un fragment du 18S a été réalisée, suivie d'un séquençage. La séquence du 18S n'est pas assez discriminante pour identifier les espèces car peu variable mais elle a l'avantage de permettre une bonne identification au niveau du genre ou de la famille. Sur les 26 larves non identifiées morphologiquement, 18 ont pu être identifiées au niveau du genre ou de la famille, soit 69%. Puis des PCR ciblées ont été développées pour chaque groupe.

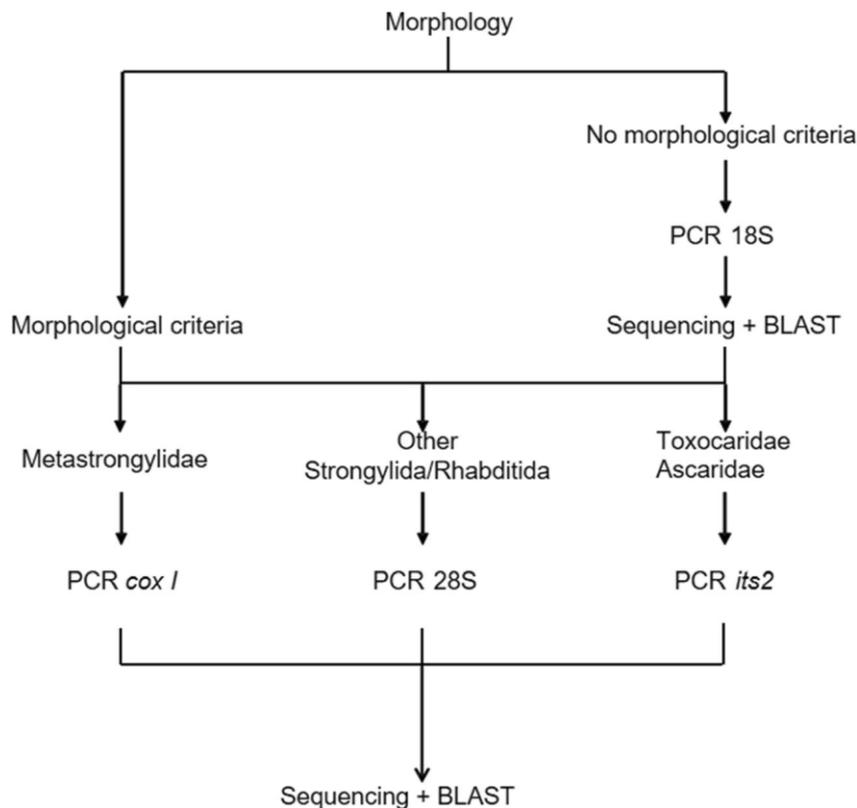


Figure 24. Stratégie d'identification en deux étapes des larves de Nématodes autres que *Trichinella* retrouvées dans les muscles.

Une première étape consiste en un examen morphologique permettant une orientation taxonomique. En l'absence d'identification morphologique, une étape moléculaire basée sur l'amplification du fragment du gène ribosomal 18S est réalisée. La dernière étape repose sur une amplification d'un fragment de l'ITS2 pour les Toxocaridae/Ascaridae, du gène de la Cytochrome Oxidase I (cox I) pour les *Metastrongylus*, et le gène 28S pour les Strongylida autres que *Metastrongylidae*.

L'ITS2 (fragment contenant la partie 3' du 5.8S, l'ITS2 et la partie 5' du 28S), le COX I ou le 28S ont été ciblés pour identifier respectivement les larves de Toxocaridae/Ascaridae,

Metastrongylus spp. et les Strongylida autres que *Metastrongylus* spp. Au total, il a été possible d'identifier 14 larves de *Toxocara cati*, 6 larves d'*Ascaris suum*, 3 larves de *Metastrongylus pudendotectus*, 1 larve de *Metastrongylus salmi*, 1 larve d'*Uncinaria stenocephala* et 1 larve d'*Angiostrongylus vasorum*. Pour les autres larves, soit la PCR n'a pas fonctionné (à cause probablement d'un ADN trop dégradé) soit les séquences étaient ininterprétables.

En appliquant cette stratégie (Figure 24), 80% des larves ont pu être identifiées au niveau du genre ou de la famille et 58% au niveau de l'espèce. Parmi ces espèces, 70 % sont potentiellement zoonotiques. Les plus retrouvées ont été *Ascaris suum* qui peut provoquer des pathologies respiratoires graves (Phils, 1972) et *Toxocara cati* qui peut provoquer des *larva migrans* oculaires ou viscéraux. Bien que cette dernière est classiquement transmise par ingestion d'œufs embryonnés contaminant l'environnement, elle a la particularité de conserver sa capacité de migration lorsqu'elle passe d'un hôte paraténique à un autre après ingestion (Magnaval et al., 2001 ; Sprent, 1956).

ii. Recherche d'espèces sentinelles dans la faune sauvage

Une des missions des agents de l'Anses est la surveillance de la circulation de pathogènes, notamment dans la faune sauvage. Les oiseaux sont connus pour être de bon réservoirs de pathogènes (Plourde et al., 2007). Afin de surveiller des parasites des viandes, il est possible d'étudier des espèces d'oiseaux carnivores et s'interroger sur la présence de ces parasites dans leurs muscles. Ils sont connus pour être tantôt hôte définitif du nématode *Trichinella pseudospiralis* (Pozio, 2016) ou hôte paraténique de *Toxocara* spp. (Marrucci et al., 2013). Nous nous sommes alors intéressés au potentiel d'utilisation des rapaces comme sentinelle pour les parasites zoonotiques transmis par les viandes. L'étude a duré deux années consécutives (2017 et 2018) et a porté sur la détection des parasites dans les muscles du bréchet de 327 oiseaux appartenant à 27 espèces différentes (quelques-uns de ces oiseaux n'étant pas des rapaces pour tester l'effet de la prédation), provenant d'hôpitaux de préservation de la faune sauvage de 3 sites français différents : Normandie, Cévennes et Ile-de-France (Tableau 2). Comme pour la détection de *Trichinella* spp., une digestion artificielle des muscles a été réalisée sur des pools de muscles de la même espèce d'oiseau, par site, par année ne dépassant pas 100g comme indiqué par la méthode de référence (Gamble et al., 2000 ; EC 2015). Lors de la première année, la méthode a été appliquée strictement, à savoir une première étape de digestion enzymatique suivie d'une étape de décantation de 30 minutes au cours de laquelle les larves sédimentent. Mais, nous nous sommes rendus compte que les larves retrouvées étaient plus petites que celles de *Trichinella* spp. et probablement moins denses. Lors de la campagne de la deuxième année nous avons ajouté une deuxième étape de décantation de 30 minutes pour laisser plus de temps aux petites larves de sédimenter.

Au total, 43% des pools étudiés étaient positifs indépendamment du site de prélèvement, 33% la première année et 51% la deuxième année. La différence entre les deux années peut être liée à la deuxième décantation car des larves ont été retrouvés dans 3 pools qui étaient négatifs après la première décantation. D'autre part, des larves supplémentaires ont été trouvés dans 10 des 19 pools positifs après la première décantation.

Année	Localisation	Nom commun des espèces hôtes	Nom latin des espèces hôtes	Nb échantillon / pool	N° larves	1ère dec	2ème dec	
2017	Normandie	Tawny owl	<i>Strix aluco</i>	13	5	5	NP	
		Common kestrel	<i>Falco tinnunculus</i>	7	10	10	NP	
		Common buzzard	<i>Buteo buteo</i>	5	1	1	NP	
		Great Black-backed Gull	<i>Larus marinus</i>	2	0	0	NP	
		European Herring Gull	<i>Larus argentatus</i>	12	2	2	NP	
		Carrion crow	<i>Corvus corone</i>	1	0	0	NP	
		Lesser Black-backed Gull	<i>Larus fuscus</i>	1	4	4	NP	
		Little Owl	<i>Athene noctua</i>	1	0	0	NP	
		Barn owl	<i>Tyto alba</i>	2	0	0	NP	
		Short-eared owl	<i>Asio flammeus</i>	1	0	0	NP	
	Long-eared Owl	<i>Asio otus</i>	1	0	0	NP		
	Cévennes	Eurasian sparrowhawk	<i>Accipiter nisus</i>	7	0	0	NP	
		Common buzzard	<i>Buteo buteo</i>	14	0	0	NP	
		Eurasian sparrowhawk	<i>Accipiter nisus</i>	8	0	0	NP	
		Great crested grebe	<i>Podiceps cristatus</i>	1	0	0	NP	
		Tawny owl	<i>Strix aluco</i>	3	0	0	NP	
		Griffon vulture	<i>Gyps fulvus</i>	1	0	0	NP	
		Black-headed gull	<i>Chroicocephalus ridibundus</i>	1	0	0	NP	
		Long-eared Owl	<i>Asio otus</i>	1	0	0	NP	
		Grey heron	<i>Ardea cinerea</i>	2	0	0	NP	
		Eurasian Scops Owl	<i>Otus scops</i>	5	0	0	NP	
		European honey buzzard	<i>Pernis apivorus</i>	1	0	0	NP	
		Common kestrel	<i>Falco tinnunculus</i>	8	7	7	NP	
		Black kite	<i>Milvus migrans</i>	1	0	0	NP	
		Ile-de-France	Eurasian sparrowhawk	<i>Accipiter nisus</i>	9	2	2	NP
			Common kestrel	<i>Falco tinnunculus</i>	6	9	9	NP
			Common buzzard	<i>Buteo buteo</i>	13	0	0	NP
			Tawny owl	<i>Strix aluco</i>	3	4	4	NP
			Eurasian hobby	<i>Falco subbuteo</i>	1	0	0	NP
	Little Owl		<i>Athene noctua</i>	2	2	2	NP	
	Yellow-legged gull		<i>Larus michahellis</i>	1	0	0	NP	
	Barn owl		<i>Tyto alba</i>	1	1	1	NP	
Grey heron	<i>Ardea cinerea</i>		2	0	0	NP		

2018	Normandie	Common kestrel	<i>Falco tinnunculus</i>	10	4	2	2
		Little Owl	<i>Athene noctua</i>	4	5	5	0
		Peregrine Falcon	<i>Falco peregrinus</i>	2	0	0	0
		European Herring Gull	<i>Larus argentatus</i>	7	0	0	0
		Barn owl	<i>Tyto alba</i>	13	2	1	1
				12	0	0	0
				8	1	1	0
		Great Black-backed Gull	<i>Larus marinus</i>	6	0	0	0
		Lesser Black-backed Gull	<i>Larus fuscus</i>	1	0	0	0
		Short-eared owl	<i>Asio flammeus</i>	1	0	0	0
	Cévennes	Eurasian sparrowhawk	<i>Accipiter nisus</i>	5	1	0	1
		Eurasian hobby	<i>Falco subbuteo</i>	4	0	0	0
		Long-eared Owl	<i>Asio otus</i>	4	0	0	0
		Tawny owl	<i>Strix aluco</i>	6	1	1	0
		Common buzzard	<i>Buteo buteo</i>	11	0	0	0
		Grey heron	<i>Ardea cinerea</i>	1	0	0	0
		Northern goshawk	<i>Accipiter gentilis</i>	2	0	0	0
		Peregrine Falcon	<i>Falco peregrinus</i>	1	167	-	-
		Eurasian sparrowhawk	<i>Accipiter nisus</i>	8	9	2	7
		Long-eared Owl	<i>Asio otus</i>	1	0	0	0
Ile-de-France	Eurasian eagle-owl	<i>Bubo bubo</i>	4	5	2	3	
	Cattle egret	<i>Bubulcus ibis</i>	2	1	1	0	
	Common buzzard	<i>Buteo buteo</i>	11	2	1	1	
			11	1	1	0	
			1	2	2	0	
	Short-toed snake eagle	<i>Circaetus gallicus</i>	2	0	0	0	
	Rock dove	<i>Colomba livia</i>	1	0	0	0	
	Common kestrel	<i>Falco tinnunculus</i>	12	3	0	3	
	Griffon vulture	<i>Gyps fulvus</i>	1	0	0	0	
	Yellow-legged gull	<i>Larus michahellis</i>	1	0	0	0	
Ile-de-France	Black kite	<i>Milvus migrans</i>	2	3	2	1	
	Eurasian hobby	<i>Falco subbuteo</i>	1	1	1	0	
	Tawny owl	<i>Strix aluco</i>	10	5	2	3	
	Barn owl	<i>Tyto alba</i>	3	0	0	0	
	Little Owl	<i>Athene noctua</i>	2	3	1	2	
	Eurasian Scops Owl	<i>Otus scops</i>	5	0	0	0	
	Western osprey	<i>Pandion haliaetus</i>	1	0	0	0	
	Tawny owl	<i>Strix aluco</i>	4	8	8	0	
	Barn owl	<i>Tyto alba</i>	1	0	0	0	
	Common kestrel	<i>Falco tinnunculus</i>	3	3	3	0	
Ile-de-France	European honey buzzard	<i>Pernis apivorus</i>	1	1	0	1	
	Eurasian sparrowhawk	<i>Accipiter nisus</i>	1	0	0	0	
	Common buzzard	<i>Buteo buteo</i>	3	3	1	2	

Tableau 2. Echantillonnage et détection de nématodes dans les muscles des oiseaux après digestion artificielle.

Les différentes colonnes renseignent l'année et le site de prélèvement, les noms communs et latins des espèces d'oiseaux étudiés, le nombre d'échantillons dans chaque pool de muscle ayant subi une digestion artificielle, le nombre total de larves retrouvées et le détail du nombre de larves retrouvées lors de la première décantation et de la deuxième décantation (NP : Non pratiqué).

Puis nous avons appliqué la méthode décrite dans le paragraphe précédent pour l'identification des larves de nématodes (Karadjian et al., 2020). La morphologie a permis d'orienter les larves de 20 des 33 pools positifs vers le genre *Toxocara*. Pour les larves trop dégradées, la PCR 18S a orienté 7 isolats vers le genre *Toxocara*. Sur la cohorte de la première année, la PCR ITS2 a été réalisée et les séquences après BLAST appartenaient à l'espèce *Toxocara cati*. Comme les échantillons au sein du genre *Toxocara* étaient nombreux, afin d'avoir un résultat en interne moins couteux et plus rapide, nous avons développé une RFLP à partir du fragment de l'ITS2 amplifié permettant de différencier *T. cati* de *T. canis* (Figure 25). Toutes les larves avaient le profil de *T. cati*.

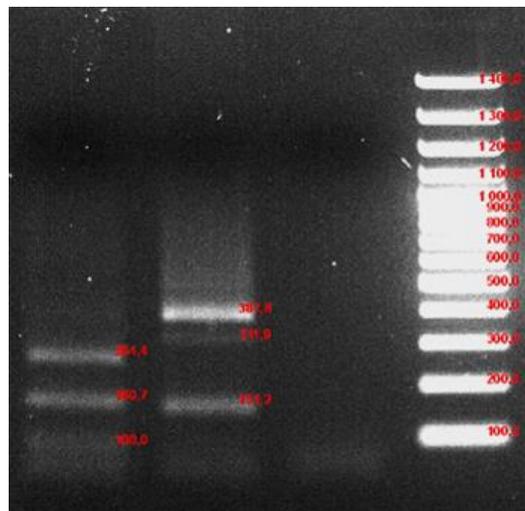


Figure 25. Profil électrophorétique de *Toxocara cati* et *Toxocara canis* après la PCR ITS2-RFLP.

Première ligne : *T. cati*, deuxième ligne : *T. canis* ; troisième ligne : contrôle négatif ; quatrième ligne ; marqueur de poids moléculaire (100bp)

Au total, des larves de *T. cati* ont été identifiées provenant des muscles de 10 des 17 espèces de rapaces étudiés. Parmi les 7 négatifs, 2 espèces ne sont pas carnivores. D'autre part, seules 3 espèces d'oiseaux non rapaces avaient des larves dans les muscles. Néanmoins, ces trois espèces ont un régime alimentaire incluant des rongeurs.

PERSPECTIVES

D'une part, nous avons développé une stratégie d'identification de larves efficace pour les larves récupérées dans le muscle par digestion artificielle mais celle-ci pourrait être appliquée plus généralement pour l'identification des larves de nématodes qui présentent généralement peu de critères d'identification.

D'autre part, nous avons confirmé la présence de *Toxocara cati* dans des muscles d'oiseaux sauvages provenant de France. En travaillant avec et en s'appuyant sur le réseau des hôpitaux de sauvetage de la faune sauvage, les rapaces pourraient être de bonnes sentinelles pour surveiller la circulation de ce parasite chez les oiseaux sauvages. Les hôpitaux de sauvetage de la faune sauvage jouent un rôle crucial dans la prise en charge des animaux blessés, malades et épuisés et pourraient devenir une pierre angulaire de la surveillance des maladies de la faune sauvage. Les rapaces regroupent des espèces sédentaires et migratrices. En caractérisant et en comparant la prévalence des parasites (ou d'autres agents pathogènes) entre les deux groupes, des données intéressantes et informatives pourraient être obtenues sur l'origine géographique des agents infectieux et leur zone d'introduction dans la faune sauvage, les animaux de production et éventuellement les populations humaines.

Valorisation de la partie II.b.

Ce travail a bénéficié d'un financement pour une mission scientifique de courte durée, à l'Anses, pour une doctorante du BfR (Kaestner C), par le COST européen Foodborne Parasites.

Ce travail a fait l'objet du stage de BTS d'Anthony Voisinot, et de BTS et licence professionnelle de Lisa Laboutière.

Publications

Karadjian G, [Laboutière L](#), Chevillot A, [Voisinot A](#), Blaizot A, Puech MP, Aubert D, Risco-Castillo V, Blaga R and Vallée I. *Toxocara cati* and *Toxoplasma gondii* in French birds of prey. *Journal of Wildlife Diseases*. Accepté.

Karadjian G, [Kaestner C](#), [Laboutière L](#), [Adicéam E](#), Wagner T, Johne A, Thomas M, Polack B, Mayer-Scholl A, Vallée I. A two-step morphology-PCR strategy for the Identification of Nematode larvae recovered from muscles after artificial digestion at meat inspection. *Parasitology Research*. (2020).

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Les travaux de recherche que j'ai développés sont en lien direct avec les missions de l'Anses au sein d'une unité de parasitologie, c'est-à-dire améliorer les outils de détection et d'identification d'agents parasitaires et plus particulièrement, dans l'équipe Paralim, les parasites transmis par les aliments mais également l'identification et l'étude des fonctions de molécules clés pour des traitements et des vaccins.

Il m'a été confié le développement de projets recherche sur les Nématodes retrouvées dans les viandes, et plus particulièrement *Trichinella spiralis*. J'ai pu étudier le rôle d'une protéine clé dans l'infection des muscles par le parasite, en participant au co-encadrement d'une thèse de doctorat. Cette protéine a la particularité de posséder un domaine antigénique qui en fait également un bon candidat vaccinal mais aussi pour le développement de tests sérologiques. L'association de la protéine recombinante avec un carbohydrate de *Trichinella* a permis la détection des anticorps après infection sans limite de temps. Un ELISA duplexe sera développé par la suite.

Néanmoins, les tests sérologiques pour la détection de *Trichinella* semblent encore très compliqués à mettre en œuvre, et il semble intéressant de se tourner vers de nouvelles technologies telles que les tests utilisant les aptamères (ELASA, ELONA,...). Un financement européen a été obtenu pour une thèse de doctorat portant sur la sélection d'aptamères spécifiques de *Trichinella*. Les premiers résultats sont très encourageants et des tests ELONA ou ELASA seront développés en fin de projet de thèse. Ces tests, basés sur la capture d'une molécule ou d'un organisme cible par les aptamères, devront être optimisés à l'avenir avant de pouvoir être les tests de référence. D'autre part, comme les aptamères sont capables de pénétrer dans des tumeurs même solides, en empruntant la néo micro-vascularisation générée autour de la tumeur, ils permettent d'y délivrer des traitements anti tumoraux qui leur sont fixés dessus, au cœur de la tumeur. Lors de la formation du kyste de *Trichinella*, une néo vascularisation est également générée. La stratégie de délivrance thérapeutique sera développée sur *Trichinella* afin de délivrer des molécules au sein du kyste de *Trichinella*. Cet outil thérapeutique est d'une importance capitale pour les patients détectés après la formation du kyste, ce qui est une majorité, puisqu'à l'heure actuelle les molécules n'arrivent pas à pénétrer le kyste.

Afin d'élargir le panel de cibles potentielles, j'ai pu développer deux projets :

- Le premier vise la compréhension du système neuronale de *T. spiralis* pour lequel le premier récepteur muscarinique à l'acétylcholine a pu être caractérisé et il a été possible de vérifier qu'il est fonctionnel. Il est une cible vaccinale de choix car pourrait avoir une fonction essentielle pour le parasite. Une étude fonctionnelle et des essais vaccinaux seront réalisés prochainement.
- Le second est l'étude des protéines du sécrétome de *Trichinella*. Une protéine intéressante qui a été identifiée, la ts-VAL, sera bientôt étudiée pour sa fonction, sa capacité vaccinale mais également son pouvoir de détection précoce puisqu'elle sera une des protéines clés lors de la première phase de l'infection par les larves musculaires.

D'autre part, afin de pouvoir surveiller les parasites détectés dans les viandes, il est nécessaire de pouvoir les identifier parfaitement. Dans le cas de *Trichinella* spp., j'ai pu réaliser une révision partielle de la méthode de référence (PCR multiplexe) puisque les profils de bande ne correspondent pas parfaitement à ceux décrits initialement. Afin de parer à ce problème, je me

suis intéressé au développement d'une base de donnée MALDI-TOF afin de pouvoir obtenir des résultats rapides, peu coûteux et fiables. J'ai pu créer la première base de spectres de masse de références des échantillons français qui a été combinée avec des bases de données allemandes et polonaises. Ces travaux vont se poursuivre afin qu'à terme cette technologie remplace la PCR multiplexe. D'autre part, nous pourrions développer cette approche pour de nombreux autres nématodes retrouvés tels qu'*Ascaris* spp., *Toxocara* spp.,....

Enfin, comme souvent ce sont d'autres nématodes qui sont retrouvés lors des analyses de détection de *Trichinella*, il était important de pouvoir les identifier. J'ai pu mettre au point une stratégie d'identification en deux étapes morpho-moléculaires permettant d'identifier des larves même parfois très dégradées. Des parasites zoonotiques ont pu être identifiés tels que *Toxocara cati*. Afin de réaliser une surveillance de ces parasites sur le territoire, j'ai pu constater que les rapaces sont de bonnes sentinelles. Je vais continuer à travailler en collaboration avec les centres de la faune sauvage en France voire en Europe et tenter de cartographier la présence de ces parasites mais également trouver des introductions sur notre territoire, expliquant parfois que certaines souches soient plus pathogènes que d'autres.

Je suis également en train de développer un projet collaboratif pour la détection et l'identification des virus des parasites. Des expériences préliminaires ont été réalisées pour *Trichinella* spp. et les premiers virus ont été trouvés par RNAseq. Dans le cadre de l'appel à projet AMI de l'Anses, je vais élargir ce projet très prochainement aux différents acteurs de la parasitologie de l'Anses afin d'étudier la présence et la fonction de virus dans différents parasites d'intérêt zoonotique ou épizootique (*Echinococcus* spp., *Anisakis simplex*, *Cryptosporidium* spp., *Eimeria*, ...). A court terme, la présence sera testée dans toutes les espèces. A moyen terme, il sera possible d'étudier la pathogénicité des différentes espèces en fonction de la présence ou non des différents virus, puis par la suite tester les différents antiviraux et leurs effets indirects sur les parasites. Enfin, les virus acquis par les parasites et qui ont évolué au cours du temps pourraient être de bons traceurs et permettraient de suivre certaines souches et retracer l'origine de certaines sources de contamination.

Un parasite peu surveillé et étudié en France et en Europe est *Taenia* spp. L'espèce *T. saginata* est zoonotique et provoque le ver solitaire chez l'Homme. Il semblerait qu'il soit encore très présent en France. Pour la détection du parasite à l'heure actuelle, elle est réalisée à l'abattoir par découpe de tranches dans le cœur en post mortem immédiat. Le vétérinaire inspecteur regarde alors s'il voit des kystes à l'œil nu. Cette méthode est bien évidemment très peu sensible et dépend du vétérinaire. Mais les données manquent cruellement. J'ai initié un contact avec la DGAI afin d'accéder aux données d'abattoirs et évaluer le risque de contamination en France car d'après les données recueillies lors du COST européens Cystinet dans lequel notre équipe était impliquée, 30 000 traitements anti *Taenia* sont administrés chaque année en France. Il est donc nécessaire de développer des outils de détection et d'identification de ce parasite. Mais avant toute chose, il faudra développer le modèle murin de *Taenia crassiceps* dans notre laboratoire ce qui permettra de réaliser de nombreuses analyses par la suite et valider nos tests. Puis, je compte utiliser différentes approches en parallèles. Tout d'abord l'approche sérologique utilisant des anticorps car elle reste aujourd'hui la plus utilisée et la plus rapide à développer dans un contexte où il n'y a aucun test. Mais je souhaiterais développer l'approche utilisant les aptamères puisque j'ai développé cette expertise au laboratoire. C'est un projet à moyen terme qui permettra d'avoir un outil robuste et très spécifique. Les mêmes travaux seront réalisés pour la détection de i) *Taenia solium*, présent en Europe et des cysticercoses lesquelles dans des cas

graves ont des atteintes neurologiques catastrophiques, ii) *Tania ovis* qui est peut-être symptomatique dans le cas d'infections massives chez des agneaux, iii) *Taenia multiceps* provoquant la coenurose et la perte de bétails.

Enfin, je suis également le leader d'une tâche dans le projet européen PARADISE pour la sélection et l'identification d'aptamères spécifiques de *Cryptosporidium parvum* et *Giardia duodenalis*. Finalement l'ensemble des projets de développement d'outils basés sur les aptamères me conduiront à long terme à développer des puces à aptamères. Je pense qu'il sera intéressant de le développer en partenariat avec les collègues de Virologie et de Bactériologie pour la détection de nombreux agents pathogènes au sein d'une même matrice alimentaire pour une espèce donnée. Cette puce de détection des pathogènes zoonotiques mais également épizootiques sera un enjeu majeur pour le bon maintien et le développement des cheptels. Par exemple chez le porc, il existe plus de 80 espèces pathogènes, la puce permettrait de détecter les essentielles, la détection des bactéries *Salmonella* et *Clostridium*,..., de nombreux virus du porc comme celui de l'encéphalite japonaise par exemple et des parasites comme *Trichinella* spp., *Ascaris suum*, *Taenia solium*,

J'ai pu m'intégrer parfaitement au réseau déjà établi par le laboratoire et l'équipe Paralim, notamment les collègues chinois de l'Université de Jilin en collaboration desquelles s'est déroulée la thèse d'Anqi Wang, mais également les collègues allemands du BfR où j'ai pu réaliser la mission pour le développement de la technologie MALDI-TOF et ai pu accueillir la doctorante Caroline Kaestner dans le cadre d'une mission. Mais j'ai également élargit les collaborations sur le plan national avec de nouveaux partenariats au CNRS de Gif sur Yvette pour la microscopie confocale. Sur le plan international, je suis allé en mission à l'Université MacGill de Montréal, dans le laboratoire du Pr Momar Ndao. J'y ait appris les bases de la technologie SELEX, essentiel pour la sélection des aptamères. Depuis nous avons obtenu le projet européen AptaTrich qui finance la thèse de doctorat de Mr Noah Brosseau, dans un partenariat entre les collègues d'Allemagne, de Montréal et mon équipe Paralim. Et nous avons déposé une demande de financement pour des échanges entre mon équipe Paralim et celle de l'université MacGill à l'appel du Fonds de la Recherche Québécois Samuel de Champlain (réponse à venir). J'ai également accueilli Gohar Grigoryan dans le cadre de son Master de l'Université de Yerevan ainsi que le Dr Sargis Aghayan. Nous continuons cette belle collaboration et avons obtenu récemment un financement auprès du Armenian National Science and Education Fund Grant (ANSEFG) (projet: Trichinellosis in Armenia: a hidden risk for outbreak). Ces fonds permettront d'équiper le laboratoire du Dr Aghayan afin qu'il puisse réaliser la détection des larves de *Trichinella* spp. dans les viandes en Arménie. La mise en place d'un laboratoire de référence en Arménie fait partie de nos missions de centres collaborateurs OIE.

REFERENCES

- Abuzeid, A.M.I., Zhou, X., Huang, Y., Li, G. (2020) Twenty-five-year research progress in hookworm excretory/secretory products. *Parasites and Vectors* ; 14;13(1):136
- Boireau, P., Liu, M., Le Rhun, D., Wu, X., Fu, B., Le Guerhier, F., Hernandez Bello, R., Vallée, I., and Bahuon, C. (2007) Polypeptides reconnus par des anticorps anti-*Trichinella* et leurs applications. Brevet.
- Bolas-Fernández, F., Dea-Ayuela, M.A., Connolly, B., Robinson, M.W. (2009) Micro-environmental conditions modulate protein secretion and infectivity of the *Trichinella spiralis* L1 larva. *Veterinary Parasitology* ; 23;159(3-4):236-9.
- Boonmars, T., Wu, Z., Nagano, I., Nakada, T. & Takahashi, Y. (2004) Differences and similarities of nurse cells in cysts of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis*. *Journal of Helminthology* ; 78:7–16.
- Bornemann, A. & Schmalbruch, H. (1992) Desmin and vimentin in regenerating muscles. *Muscle Nerve* ; 15:14–20.
- Calderaro, A., Buttrini, M., Montecchini, S., Rossi, S., Piccolo, G., Arcangeletti, M.C., Medici, M.C., Chezzi, C., De Conto, F. (2018) MALDI-TOF MS as a new tool for the identification of *Dientamoeba fragilis*. *Parasites and Vectors* ; 4;11(1):11.
- Challa, A. A. & Stefanovic, B. A. (2011) Novel Role of Vimentin Filaments: Binding and Stabilization of Collagen mRNAs. *Molecular and Cellular Biology* ; 31:3773–3789.
- Cheng, F., Shen, Y., Mohanasundaram, P., Lindström, M., Ivaska, J., Ny ,T., Eriksson, J.E. (2016) Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in wound healing via TGF- β -Slug signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* ; 113:E4320–E4327.
- Dawson, D. (2005) Foodborne protozoan parasites. *International Journal of Food Microbiology* ; 103:207-227.
- De Vos, T., Dick, T.A. (1992) Characterization of cholinesterases from the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C* ; 103(1):129–134.
- Dorny, P., Praet, N., Deckers, N. and Gabriel, S. (2009) Emerging food-borne parasites. *Veterinary Parasitology*, 163, 196-206.
- EC. (2004) European Commission. Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Official Journal* ; L139/55, 151.
- EC. (2015) European Commission. Commission Implementing Regulation (EU) 2015/1375 of 10 August 2015 laying down specific rules on official controls for *Trichinella* in meat. *Official Journal* ; L212/7, 28.
- FAO/WHO. (2014) Multicriteria-Based Ranking for Risk Management of Food-Borne Parasites. *Microbiological Risk Assessment Series* ; 23:324.

- Feucherolles, M., Poppert, S., Utzinger, J., Becker, S.L. (2019) MALDI-TOF mass spectrometry as a diagnostic tool in human and veterinary helminthology: a systematic review. *Parasites and Vectors* ; 17;12(1):245.
- Ford, L., Zhang, J., Liu, J., Hashmi, S., Fuhrman, J.A., Oksov, Y., Lustigman, S. (2009) Functional analysis of the cathepsin-like cysteine protease genes in adult *Brugia malayi* using RNA interference. *PLoS Neglected Tropical Diseases* ; 3(2):e377
- Gajadhar, A. A. (2015) Introduction to foodborne parasites. In Foodborne parasites in the Food Supply Web, Vol. Occurrence and Control (ed. Gajadhar, A. A.), pp. 3- 9. Food Science, Technology and Nutrition.
- Gagliardo, L.F., McVay, C.S., Appleton, J.A. (2002) Molting, ecdysis, and reproduction of *Trichinella spiralis* are supported in vitro by intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity* ; 70(4):1853-9
- Gamble, H.R., Bessonov, A.S., Cuperlovic, K., Gajadhar, A.A., van Knapen, F., Noeckler, K., Schenone, H., Zhuh, X. (2000) International Commission on Trichinellosis: recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. *Veterinary Parasitology* ; 93:393–408.
- Gottstein, B., Pozio, E., Nöckler, K. (2009) Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clinical Microbiology Reviews* ; 22(1):127-45
- Grisi, L. (1990) Parasitic zoonoses - selective review of some diseases in south-america. *Annales De Parasitologie Humaine et Comparée* ; 65:79-82.
- Güttsches, A.K., Balakrishnan-Renuka, A., Kley, R.A., Tegenthoff, M., Brand-Saberi, B., Vorgerd, M. (2015) ATOH8: a novel marker in human muscle fiber regeneration. *Histochemistry and Cell Biology* ; 143:443–452.
- Guiliano, D.B., Hong, X., McKerrow, J.H., Blaxter, M.L., Oksov, Y., Liu, J., Ghedin, E., Lustigman, S. (2004) A gene family of cathepsin L-like proteases of filarial nematodes are associated with larval molting and cuticle and eggshell remodeling. *Molecular and Biochemical Parasitology* ;136(2):227-42.
- Hashmi, S., Britton, C., Liu, J., Guiliano, D.B., Oksov, Y., Lustigman, S. (2002) Cathepsin L is essential for embryogenesis and development of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry* ; 1;277(5):3477-86.
- Hewitson, J.P., Grainger, J.R., Maizels, R.M. (2009) Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and Biochemical Parasitology* ; 167(1):1-11
- Huang, Y., Li W., Liu, K., Xiong, C., Cao, P., Tao, J. (2016) New detection method in experimental mice for schistosomiasis: ClinProTool and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Parasitology Research* ; 115(11):4173-4181.
- Hubalek, Z. (2003) Emerging human infectious diseases: Anthroponoses, zoonoses, and sapronoses. *Emerging Infectious Diseases* ; 9:403-404.

- Huguenin, A., Depaquit, J., Villena, I., Ferté, H. (2019) MALDI-TOF mass spectrometry: a new tool for rapid identification of cercariae (Trematoda, Digenea). *Parasite* ; 26:11.
- Jones, J. L., Parise, M. E. and Fiore, A. E. (2014) Neglected Parasitic Infections in the United States: Toxoplasmosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* ; 90:794-799.
- Kalyanasundaram, R., Balumuri, P. (2011) Multivalent vaccine formulation with BmVAL-1 and BmALT-2 confer significant protection against challenge infections with *Brugia malayi* in mice and jirds. *Research and Reports in Tropical Medicine* ; 2:45-56.
- Karadjian, G., Heckmann, A., La Rosa, G., Pozio, E., Boireau, P. and Vallee, I. (2017) Molecular identification of *Trichinella* species by multiplex PCR: new insight for *Trichinella murrelli*. *Parasite* ; 24.
- Karadjian, G., Kaestner, C., Laboutière, L., Adicéam, E., Wagner, T., Johne, A., Thomas, M., Polack, B., Mayer-Scholl, A., Vallée, I. (2020) A two-step morphology-PCR strategy for the Identification of Nematode larvae recovered from muscles after artificial digestion at meat inspection. *Parasitology Research* ; 213:107890.
- Karadjian, G., Neveu, C., Heckmann, A., Grasteau, A., Boireau, P., Martin, C., Blanchard, A., Vallee, I. Investigating anthelmintic targets in adult *Trichinella spiralis* by RNA interference. *Parasite:en révision*.
- La Rosa, G., Calero-Bernal, R., Perez-Martin, J.E., Tonanzi, D., Galati, F., Serrano-Aguilera, F.J., Rosenthal, B.M., Pozio, E. (2018) Rare but evolutionarily consequential outcrossing in a highly inbred zoonotic parasite. *International Journal for Parasitology* ; 48:543–553.
- Lachaud, L., Fernández-Arévalo, A., Normand, A.C., Lami, P., Nabet, C., Donnadieu, J.L., Piarroux, M., Djenad, F., Cassagne, C., Ravel, C., Tebar, S., Llovet, T., Blanchet, D., Demar, M., Harrat, Z., Aoun, K., Bastien, P., Muñoz, C., Gállego M., Piarroux, R. (2017) Identification of *Leishmania* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry Using a Free Web-Based Application and a Dedicated Mass-Spectral Library. *Journal of Clinical Microbiology* ; 55(10):2924-2933.
- LeBert, D., Squirrell, J.M., Freisinger, C., Rindy, J., Golenberg, N., Frecentese, G., Gibson, A., Eliceiri, K.W., Huttenlocher, A. (2018) Damage-induced reactive oxygen species regulate vimentin and dynamic collagen-based projections to mediate wound repair. *eLife* 7:e30703.
- Lindergard, G., Nydam, D. V., Wade, S. E., Schaaf, S. L. and Mohammed, H. O. (2003) A novel multiplex polymerase chain reaction approach for detection of four human infective *Cryptosporidium* isolates: *Cryptosporidium parvum*, types H and C, *Cryptosporidium canis*, and *Cryptosporidium felis* in fecal and soil samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* ; 15:262-267.
- Li, Y., Li, M., Jin, F., Liu, J., Chen, M. and Yin, J. (2021) DNAJC12 promotes lung cancer growth by regulating the activation of β -catenin. *Internatonal Journal of Molecular Medicine* ; 47:105.
- Liu, M.Y., Wang, X.L., Fu, B.Q., Li, C.Y., Wu, X.P., Le Rhun, D., Chen, Q.J., and Boireau, P. (2007) Identification of stage-specifically expressed genes of *Trichinella spiralis* by suppression subtractive hybridization. *Parasitology* ; 134:1443–1455.

- Lustigman, S., Zhang, J., Liu, J., Oksov, Y., Hashmi, S. (2004) RNA interference targeting cathepsin L and Z-like cysteine proteases of *Onchocerca volvulus* confirmed their essential function during L3 molting. *Molecular and Biochemical Parasitology* ; 138(2):165-70.
- Magnaval, J.F., Glickman, L.T., Dorchies, P., Morassin, B. (2001) Highlights of human toxocariasis. *Korean Journal of Parasitology* ; 39:1–11.
- Martinez, J., Perez-Serrano, J., Bernadina, W.E., Rincon, I., Rodriguez-Caabeiro, F. (2004) Heat shock protein synthesis over time in infective *Trichinella spiralis* larvae raised in suboptimal culture conditions. *Journal of Helminthology* ; 78(3):243-7.
- Marucci, G, Interisano, M, La Rosa, G, Pozio, E. (2013) Molecular identification of nematodelarvae different from those of the *Trichinella* genus detected by muscle digestion. *Veterinary Parasitology* ; 194(2-4):117-120.
- Mateos-Hernandéz, L., Defaye, B., Vancová, M., Hajdusek, O., Sima, R., Park, Y., Attoui, H., & Šimo, L. (2020) Cholinergic axons regulate type I acini in salivary glands of *Ixodes ricinus* and *Ixodes scapularis* ticks. *Scientific Reports* ; 10:16054.
- Mayer-Scholl, A., Murugaiyan, J., Neumann, J., Bahn, P., Reckinger, S., Nockler, K., (2016) Rapid identification of the foodborne pathogen *Trichinella* spp. by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *PloS One* ; 11:e0152062.
- Murray, J., Gregory, W.F., Gomez-Escobar, N., Atmadja, A.K., Maizels, R.M. (2001) Expression and immune recognition of *Brugia malayi* VAL-1, a homologue of vespid venom allergens and *Ancylostoma* secreted proteins. *Molecular and Biochemical Parasitology* ;118(1):89-96.
- Nagano, I., Wu, Z., Matsuo, A., Pozio, E. and Takahashi, Y. (1999) Identification of *Trichinella* isolates by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial cytochrome c-oxidase subunit I gene. *International Journal for Parasitology*, 29:1113-1120.
- Nguyen Quang, N., Bouvier, C., Lelandais, B., Ducongé, F. (2016) PATTERNITY-seq v.1.0.: High-throughput analysis of sequence patterns and paternity relationship between them during molecular evolution processes. *In Presented at Aptamers in Bordeaux*, Bordeaux, France, 24–25 June 2016.
- Niederlender, S., Fontaine, J.J., Karadjian, G. (2021) Potential applications of aptamers in veterinary science. *Veterinary Research* ; 2;52(1):79.
- Nolan, J.P. and White, S.P. (2006) Nucleic acid sequence detection using multiplexed oligonucleotide PCR. *Los Alamos National Security LLC*. US7153656B2, pp. 19.
- Phills, J.A., Harrold, A.J., Whiteman, G.V., Perelmutter, L. (1972) Pulmonary infiltrates, asthma and eosinophilia due to *Ascaris suum* infestation in man. *The New England Journal of Medicine* ; 286:965–970.
- Plourde, B.T., Burgess, T.L., Eskew, E.A., Roth, T.M., Stephenson, N., Foley, J.E. (2017) Are disease reservoirs special? Taxonomic and life history characteristics. *PLoS One* ; 12(7): e0180716.

- Pozio, E. (2000) Factors affecting the flow among domestic, synanthropic and sylvatic cycles of *Trichinella*. *Veterinary Parasitology* ; 93:241-262.
- Pozio, E., Zarlenga D.S. (2013) New pieces of the *Trichinella* puzzle. *International Journal for Parasitology* ; 43:983–997.
- Pozio, E. (2016) *Trichinella pseudospiralis* an elusive nematode. *Veterinary Parasitology* ; 15;231:97-101.
- Ren, G.R., Folke, J., Hauser, F., Li, S., Grimmelikhuijzen, C.J.P. (2015) The A- and B-type muscarinic acetylcholine receptors from *Drosophila melanogaster* couple to different second messenger pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* ; 462:358–364.
- Robertson, L. J., Sprong, H., Ortega, Y. R., van der Giessen, J. W. B. and Fayer, R. (2014) Impacts of globalisation on foodborne parasites. *Trends in Parasitology* ; 30:37-52.
- Robertson, L. J. (2018) Parasites in Food: From a Neglected Position to an Emerging Issue. In *Advances in Food and Nutrition Research*, Vol. 86 (ed. Rodríguez- Lázaro, D.), pp. 71-113. Elsevier Inc.
- Romaris, F., North, S.J., Gagliardo, L.F., Butcher, B.A., Ghosh, K., Beiting, D.P., Panico, M., Arasu, P., Dell, A., Morris, H.R., Appleton, J.A. (2002) A putative serine protease among the excretory-secretory glycoproteins of L1 *Trichinella spiralis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* ; 122(2):149-60.
- Schierack, P., Lucius, R., Sonnenburg, B., Schilling, K., Hartmann, S. (2003) Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin. *Infection and Immunity* ; 71(5):2422-9.
- Šimo, L., Slovák, M., Park, Y., & Žitňan, D. (2009) Identification of a complex peptidergic neuroendocrine network in the hard tick, *Rhipicephalus appendiculatus*. *Cell and Tissue Research* ; 335(3): 639–655.
- Slany, M., Reslova, N., Babak, V. and Lorencova, A. (2016) Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* in pork meat from different production systems in the Czech Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 238: 252-255.
- Sprent, J.F.A. (1956) The life history and development of *Toxocara cati* (Schrank 1788) in the domestic cat. *Parasitology* ; 46:54–77.
- Tahir, D., Almeras., L, Varloud., M, Raoult., D, Davoust., B, Parola, P. (2017) Assessment of MALDI-TOF mass spectrometry for filariae detection in *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS Neglected Tropical Diseases* ; 20;11(12):e0006093.
- Terenina, N.B., Gustafsson, M.K.S. (2014) The functional morphology of the nervous system of parasitic flatworms (trematodes, cestodes). Moscow, KMK Scientific Press Ltd. 296 pp.
- Terenina, N. B., Mochalova, N. B., Odoevskaya, I. M., Kreshchenko, N. D., Gustafsson, M. K. S., and Fagerholm, H. P. (2016) Serotonin in *Trichinella pseudospiralis*: An immunocytochemical study. *Helminthologia (Poland)* ; 53(2):113–119.
- Trap, C., Fu, B., Le Guerhier, F., Liu, M., Le Rhun, D., Romand, T., Perret, C., Blaga, R., Boireau, P. (2006) Cloning and analysis of a cDNA encoding a putative serine protease

comprising two trypsin-like domains of *Trichinella spiralis*. *Parasitology Research* ; 98(4):288-94.

Utaaker, K. S. and Robertson, L. J. (2015) Climate change and foodborne transmission of parasites: A consideration of possible interactions and impacts for selected parasites. *Food Research* ; 68:16-23.

Vater, R., Cullen, M. J. & Harris, J. B. (1994) The expression of vimentin in satellite cells of regenerating skeletal muscle in vivo. *Histochemistry Journal* ; 26:916–928.

Vaaitinen, S., Lukka, R., Sahlgren, C., Hurme, T., Rantanen, J., Lendahl, U, Eriksson, J.E., Kalimo, H. (2001) The Expression of Intermediate Filament protein Nestin as Related to Vimentin and Desmin in Regenerating Skeletal Muscle. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* ; 60:588–597.

Verweij, J. J. and Stensvold, C. R. (2014) Molecular Testing for Clinical Diagnosis and Epidemiological Investigations of Intestinal Parasitic Infections. *Clinical Microbiology Reviews* ; 27:371-418.

Wang, B., Wang, Z.Q., Jin, J., Ren, H.J., Liu, L.N., Cui, J. (2013) Cloning, expression and characterization of a *Trichinella spiralis* serine protease gene encoding a 35.5 kDa protein. *Experimental Parasitology* ; 134(2):148-54.

Wilbers, R.H.P., Schneiter, R., Holterman, M.H.M., Drurey, C., Smant, G., Asojo, O.A., Maizels, R.M., Lozano-Torres, J.L. (2018) Secreted venom allergen-like proteins of helminths: Conserved modulators of host responses in animals and plants. *PLoS Pathogens* ;14(10):e1007300.

Wu, Z., Nagano, I., Pozio, E. and Takahashi, Y. (1999) Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for the identification of *Trichinella* isolates. *Parasitology* ; 118:211-218.

Wu, Z., Matsuo, A., Nakada, T., Nagano, I. & Takahashi, Y. (2001) Different response of satellite cells in the kinetics of myogenic regulatory factors and ultrastructural pathology after *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infection. *Parasitology* ; 123:85–94.

Wu, Z., Nagano, I. & Takahashi, Y. (2008) Candidate genes responsible for common and different pathology of infected muscle tissues between *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infection. *Parasitology International*. 57:368–378.

Yang, Y., Wen, Y.J., Cai, Y.N., Vallée, I., Boireau, P., Liu, M.Y., Cheng, S.P. (2015) Serine proteases of parasitic helminths. *Korean Journal of Parasitology* ; 53(1):1-11.

Yang, Y., Vallée, I., Lacour, S.A., Boireau, P., Cheng, S.P., Liu, M.Y. (2016) Identification and characterization of immunodominant linear epitopes on the antigenic region of a serine protease in newborn *Trichinella* larvae. *Journal of Helminthology* ; 90(2):232-7.

Zarlenga, D. S., Chute, M. B., Martin, A. and Kapel, C. M. O. (1999) A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of *Trichinella*. *International Journal for Parasitology* ; 29:1859-1867.

Zarlenga, D.S., Chute, M.B., Martin, A., Kapel, C.M. (2001). A single, multiplex PCR for differentiating all species of *Trichinella*. *Parasite*. 8(2 Suppl):S24-6.