

# Colloque annuel du PIREN-Seine

5 & 6 octobre 2017

## La dreissène comme bioindicateur de contamination en protozoaires dans la Seine

*Bigot-Clivot Aurélie, Bastien Fanny, Bonnard Marc,  
Bonnard Isabelle, Geffard Alain*

*UMR-I 02 SEBIO*

*Stress Environnementaux et BIOsurveillance des milieux aquatiques*

*Université de Reims Champagne-Ardenne*

*[aurelie.bigot@univ-reims.fr](mailto:aurelie.bigot@univ-reims.fr)*

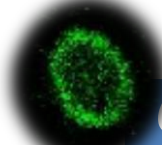
## Des protozoaires



### *Toxoplasma gondii*

#### Toxoplasmose :

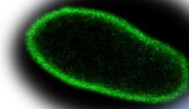
- Immunodéprimés  
encéphalite,  
lymphadénopathie
- **Congénitale**  
malformations



### *Cryptosporidium spp*

#### Cryptosporidiose :

diarrhées, crampes  
abdominales,  
anorexie,  
déshydratation



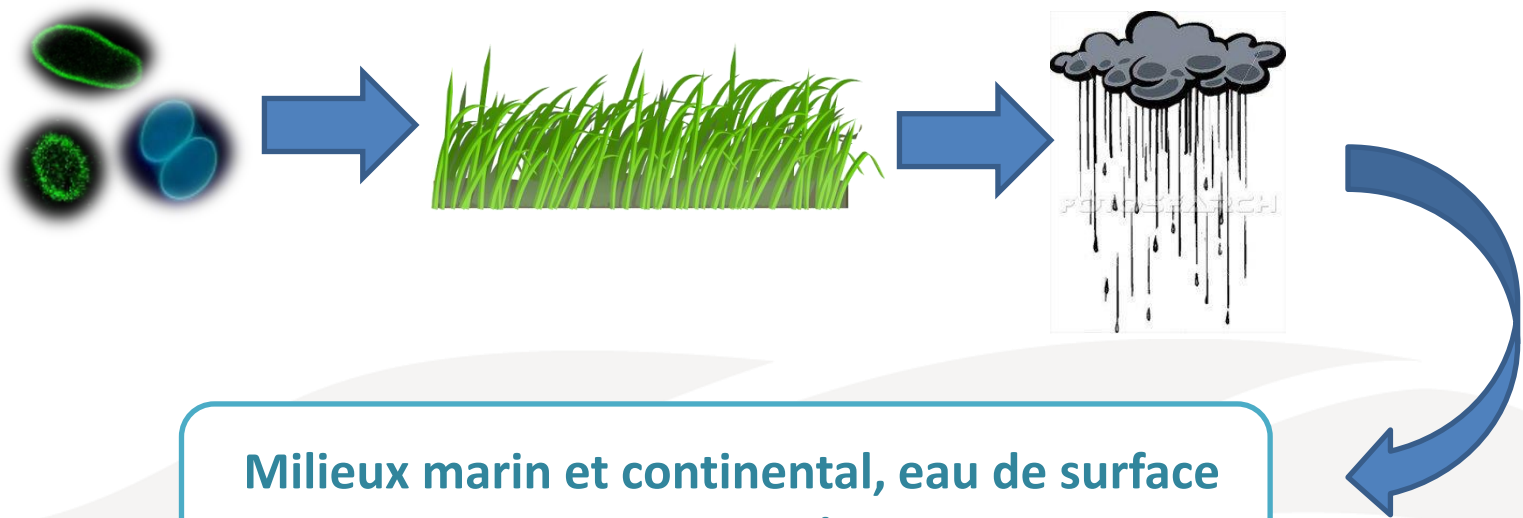
### *Giardia spp*

#### Giardiase :

diarrhées, malaises,  
crampes abdominales,  
anorexie,  
déshydratation

**Formes environnementales (oocystes et kystes)  
très résistantes**





Milieux marin et continental, eau de surface  
eau souterraine, ...

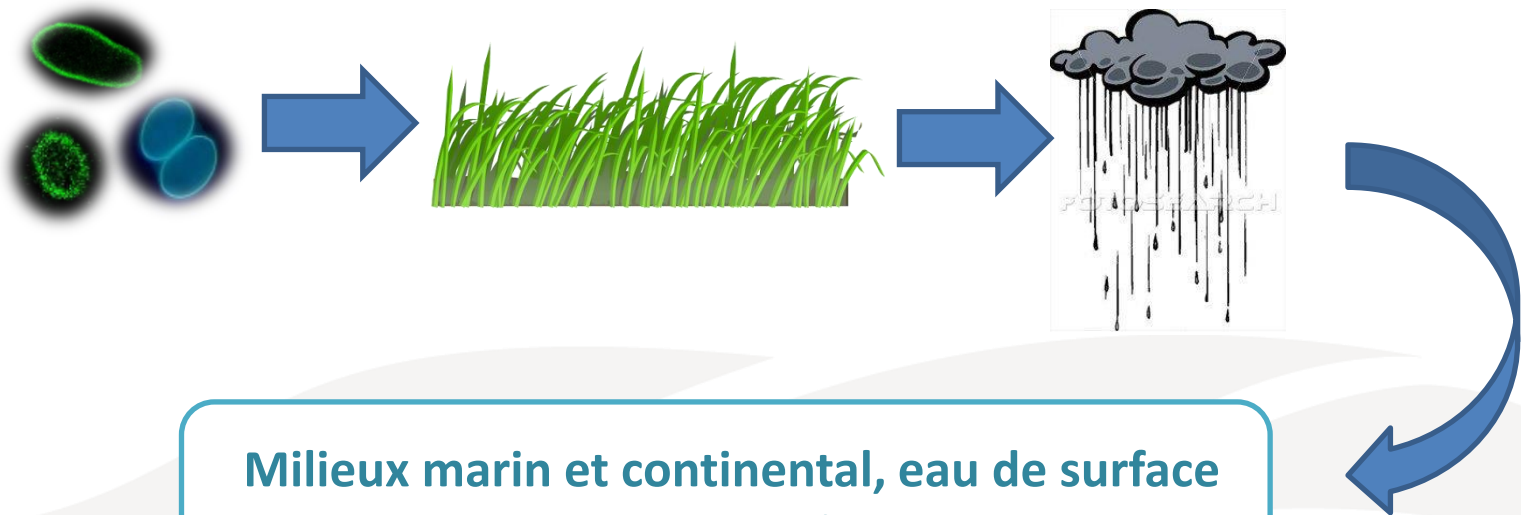


Irrigation  
des cultures

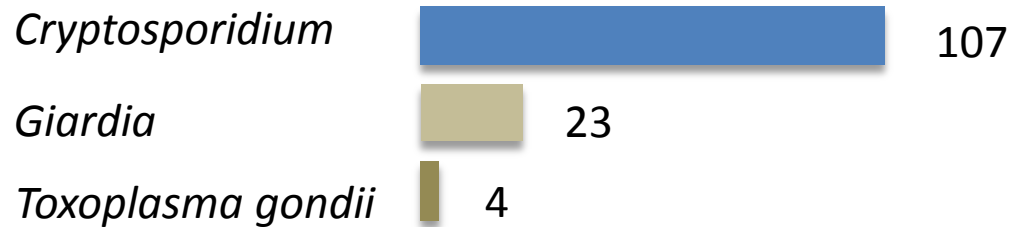


Aire de  
baignade





### Epidémies hydriques liées aux protozoaires depuis 2001



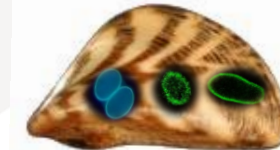
**Risque pour la santé publique**

## *Dreissena polymorpha*

- Bivalve d'eau douce filtreur : 18 à 402 mL/h
- Largement répartie en Europe
- Capacité de bioaccumulation des contaminants chimiques connue et utilisée en écotoxicologie (Binelli et al., 2015, Bourgeault, 2010)



### Bioaccumulation des protozoaires ?



- Mise en évidence en laboratoire (Palos Ladeiro et al., 2014, 2015)
- Détection d'oocystes de *T. gondii* via des dreissènes encagées pendant 1 mois en amont et aval STEP (Kerambrun et al., 2016)

**La dreissène comme outil indicateur de la présence de protozoaires ?**



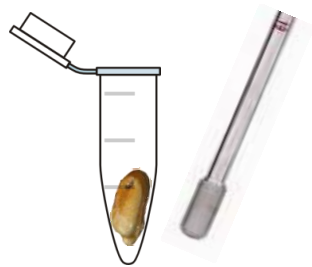
## Exposition *in situ*

Encagement de dreissènes durant 3 et 13 semaines (entre mai et juillet 2016)

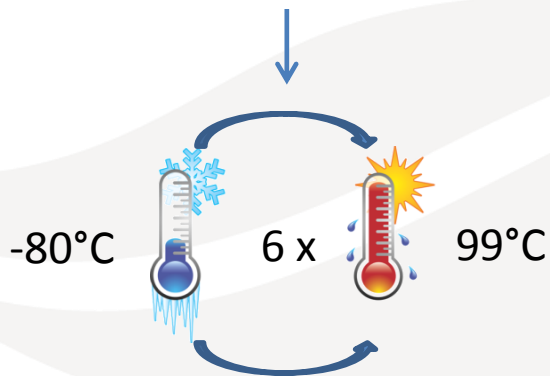
N = 10 bivalves par condition



- Détection des protozoaires par biologie moléculaire



Broyage des tissus dans Trypsine 1x



Chocs thermiques



Ultra-sons 37 Hz

Pré-extraction :  
Rompre les parois des  
oocystes et kystes



Oocyste  
*T. gondii*



Extraction ADN (Kit InstaGene Matrix – BioRad)





### Préparation du mix PCR

- Supermix ddPCR
- Amorces
- Sonde
- ADN

### Génération des droplets

- Fractionnement de l'échantillon en 20 000 gouttelettes

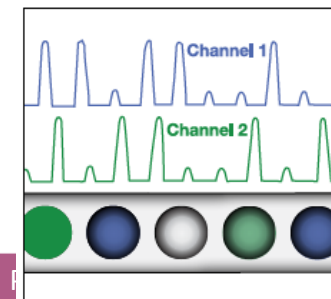
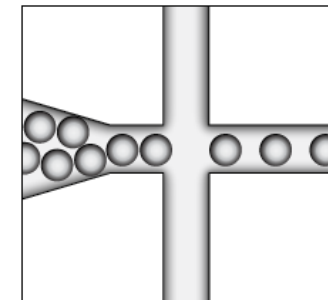
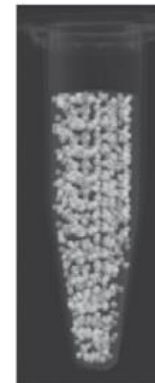
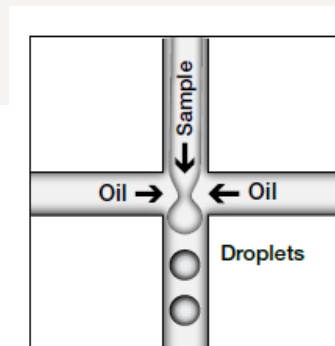
### Amplification PCR

- En théorie : 20 000 PCR par échantillon

### Lecture des droplets

- Détecteur optique FAM ou EvaGreen  
HEX ou VIC

## Droplet Digital PCR (ddPCR)



Grande tolérance aux inhibiteurs  
Détection d'évènements rares



### Préparation du mix PCR

- Supermix ddPCR
- Amorces
- Sonde
- ADN

### Génération des droplets

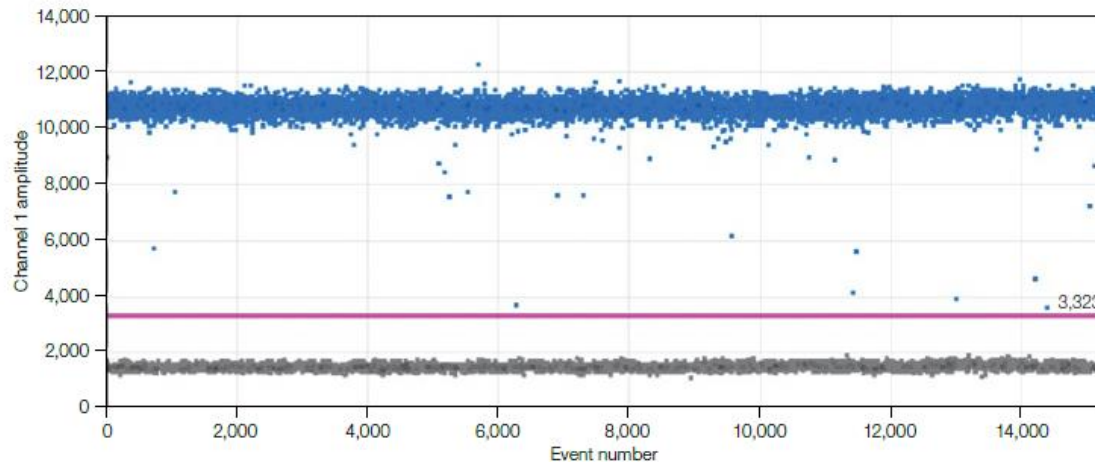
- Fractionnement de l'échantillon en 20 000 gouttelettes

### Amplification PCR

- En théorie : 20 000 PCR par échantillon

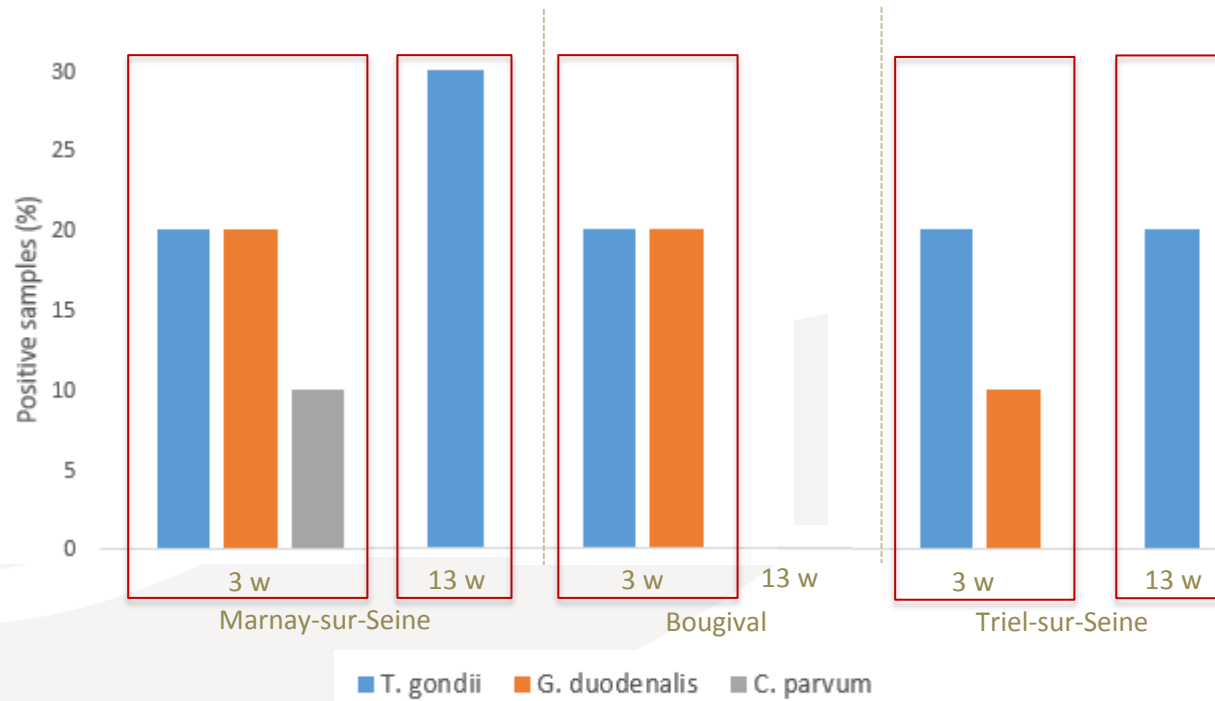
### Lecture des droplets

- Détecteur optique FAM ou EvaGreen HEX ou VIC



➔ Gouttelettes positives

➔ Gouttelettes négatives



- 3 semaines d'encagement :

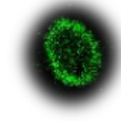
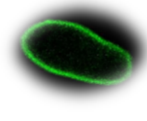
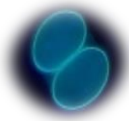
Marnay-sur-Seine : détection des 3 protozoaires dans les tissus des dreissènes

Bougival et Triel-sur-Seine : détection de *T. gondii* et *G. duodenalis*

- 13 semaines d'encagement : seul *T. gondii* est détecté à Marnay et Triel



## Nombre de parasites par dreissène



		<i>T. gondii</i> oocysts per bivalve			<i>G. duodenalis</i> oocysts per bivalve			<i>C. parvum</i> oocysts per bivalve		
		Positive samples (N=10)			Positive samples (N=10)			Positive samples (N=10)		
		Mini	Max	Mini	Max	Mini	Max	Mini	Max	
Marnay-sur-Seine	3 w - May 2016	2	98,0	345,5	2	60,16	835,2	1	45,2	
	13 w - July 2016	3	12,9	281,3	0	-	-	0	-	
Bougival	3 w - May 2016	2	36,1	290,8	2	58,9	80,3	0	-	
	13 w - July 2016	0	-	-	0	-	-	0	-	
Triel-sur-Seine	3 w - May 2016	2	142,9	934,9	1	-	570,4	0	-	
	13 w - July 2016	2	271,8	624,8	0	-	-	0	-	

Contamination biologique aux 3 protozoaires à Marnay-sur-Seine : + d'activités agricoles

- Bovins, ovins : réservoirs pour *G. duodenalis* et *C. parvum*
- Félinés : hôtes définitifs pour *T. gondii*

Quantité d'oocystes de *T. gondii* + élevée à Triel-sur-Seine : + forte anthropisation

Ces résultats mettent en évidence l'intérêt d'utiliser *D. polymorpha* comme un nouvel outil potentiel de biosurveillance sanitaire des masses d'eau

Comparativement aux données de la littérature :

- majoritairement études en milieux marins
- fortement positif et N plus important

Bioindicateur	Prévalence protozoaire	Site	Méth	Réf
<i>R. decussatus</i> (Palourde)	<i>T. gondii</i> : 6,6% (N=1255) <i>G. duodenalis</i> : 1,6% <i>C. parvum</i> : Ø	Côtes tunisiennes	qPCR	Ghozzi et al., 2017
<i>C. virginica</i> (Huître Américaine)	<i>T. gondii</i> : 4,3-14,3% (N=23) <i>C. parvum</i> : 13-39,1%	Golfe du Maine	PCR	Marquis et al., 2015
<i>M. galloprovincialis</i> (Moule bleue)	<i>C. parvum</i> : 16,8% (N=184)	Mer Adriatique, Croatie	Immunofluorescence	Mladineo et al., 2009
<i>R. philippinarum</i> (Palourde)	<i>C. parvum</i> et <i>C. hominis</i> : 1,15% (N=60)	Côte Adriatique Italienne	PCR semi-nichée	Molini et al., 2007
<i>A. anatina</i> (Anodonte)	<i>C. parvum</i> : 15,4% (N=78)	Lac Malta, Pologne	Immunofluorescence	Słodkiewicz et al., 2015
<i>D. polymorpha</i> (Moule zébrée)	<i>T. gondii</i> : 3,1% (N=96)	Amont et aval de STEP, France	qPCR TaqMan	Kerambrun et al., 2016
<i>D. polymorpha</i>	<i>T. gondii</i> : 0 – 10% <i>G. duodenalis</i> : 0 – 20% <i>C. parvum</i> : 0 -10%	N=10 Seine	ddPCR	

- Avantage de la **ddPCR** : peu sensible aux inhibiteurs présents dans les matrices environnementales

Mais le nombre d'échantillons positifs reste faible (2 à 3 + sur N=10)

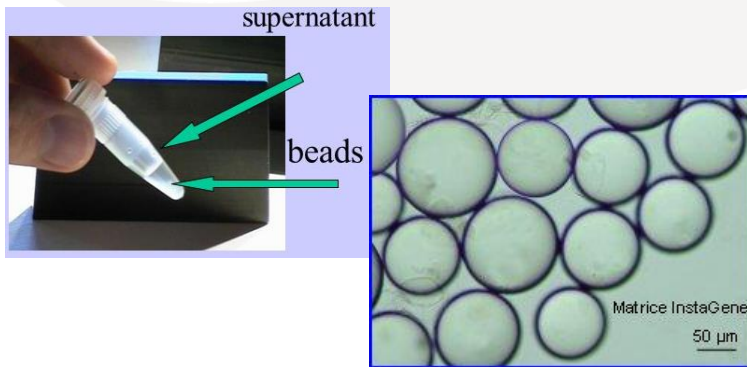
Limite technique identifiée lors de l'**extraction d'ADN**



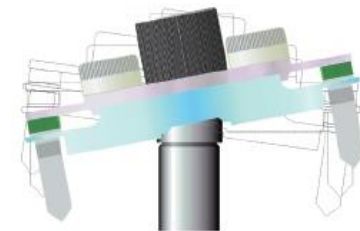
Comparaison de 2 kits dans le cadre de l'**ANR MOBIDIC**

InstaGene (BioRad)

FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals)



Matrice adsorbe les produits de lyse cellulaire



- Avantage de la **ddPCR** : peu sensible aux inhibiteurs présents dans les matrices environnementales

Mais le nombre d'échantillons positifs reste faible (2 à 3 + sur N=10)

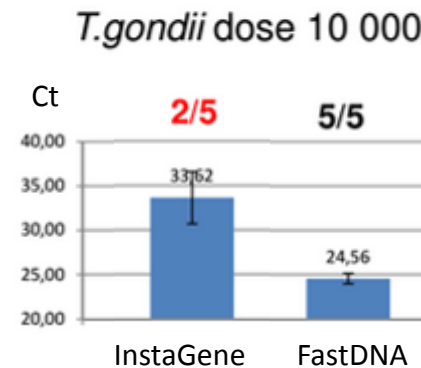
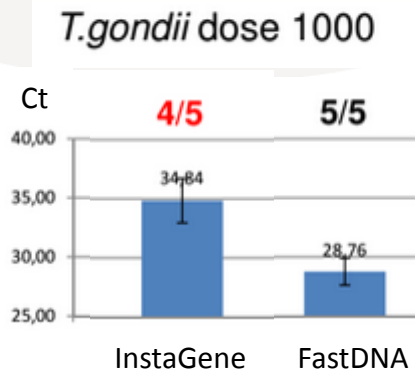
Limite technique identifiée lors de l'**extraction d'ADN**



Comparaison de 2 kits dans le cadre de l'**ANR MOBIDIC**

InstaGene (BioRad)

FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals)



- Avantage de la **ddPCR** : peu sensible aux inhibiteurs présents dans les matrices environnementales

Mais le nombre d'échantillons positifs reste faible (2 à 3 + sur N=10)

Limite technique identifiée lors de l'**extraction d'ADN**



Comparaison de 2 kits dans le cadre de l'**ANR MOBIDIC**

InstaGene (BioRad)

FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals)



Protocole validé et à appliquer sur les prochains échantillons :

Dreissènes engagées sur la Seine en :

- novembre 2016 : T3 semaines
- décembre 2016 : T7 semaines



# Merci de votre attention

*Binelli et al., 2015. Does zebra mussel (Dreissena polymorpha) represent the freshwater counterpart of Mytilus in ecotoxicological studies? A critical review. Environmental Pollution 196, 386-403.*

*Bourgeault et al., 2010. Lessons from a transplantation of zebra mussels into a small urban river: An integrated ecotoxicological assessment. Environmental Toxicology 25, 468-478.*

*Ghozzi et al., 2017. First report of Tunisian coastal water contamination by protozoan parasites using mollusk bivalves as biological indicators. Marine Pollution Bulletin. 117, 197-202.*

*Kerambrun et al., 2016. Zebra mussel as a new tool to show evidence of freshwater contamination by waterborne Toxoplasma gondii. Journal of Applied Microbiology 120, 498-508.*

*Marquis et al., 2015 . Survey for protozoan parasites in Eastern oysters (Crassostrea virginica) from the Gulf of Maine using PCR-based assays. Parasitology International 64, 299-302.*

*Mladineo et al., 2009 . First report of Cryptosporidium sp. (Coccidia, Apicomplexa) oocysts in the black mussel (Mytilus galloprovincialis) reared in the Mali Ston Bay, Adriatic Sea. Journal of Shellfish Research 28, 541-546.*

*Molini et al., 2007 . Temporal occurrence of Cryptosporidium in the manila clam Ruditapes philippinarum in northern adriatic italian lagoons. Journal of Food Protection 2, 279-520.*

*Palos Ladeiro et al., 2014. Bioaccumulation of human waterborne protozoa by zebra mussel (Dreissena polymorpha): Interest for water biomonitoring. Water Research 48, 148-155.*

*Palos Ladeiro 2015 . Assessment of Toxoplasma gondii levels in zebra mussel (Dreissena polymorpha) by real-time PCR: an organotropism study. Environmental Science and Pollution Research 22, 13693-13701.*

*Ślodka et al., 2015 . Human waterborne protozoan parasites in freshwater bivalves (Anodonta anatina and Unio tumidus) as potential indicators of fecal pollution in urban reservoir. Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters 51, 32-36.*

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

TABLE  
Detection of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Toxoplasma* in environmental waters<sup>a</sup>

	Underground water				Raw surface water				Public drinking water				Total		
	Analysed	<i>Crypto- sporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Toxo- plasma</i>	Analysed	<i>Crypto- sporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Toxo- plasma</i>	Analysed	<i>Crypto- sporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Toxo- plasma</i>	Analysed	<i>Crypto- sporidium</i>	<i>Giardia</i>
Department 1	16	2	2	2	24	17	19	3	17	0	0	3 1 Inh	57	19	21
Department 2	73	12	12	9 5 (0 Inh) 1 Inh	9	3	2	0	5	0	0	0	87	15	14
Department 3	34	2	1	5	8	2	3	0	5	0	0	0	47	4	4
Department 4	31	8	10	3	19	10	12	1	16	2	5	0	66	20	27
Department 5	37	7	2	4 2 (+ Inh) 1 (0 Inh)	10	6	6	0	20	1	1	1 (+Inh)	67	14	9
District	72	0	0	6 1 (0 Inh)	13	9	12	0	56	0	0	1 (0 Inh)	141	9	12
River	0	-	-	-	17	11	14	1	0	-	-	-	17	11	14
Total	263	31	27	29 2 (+ Inh) 7 (0 Inh) 1 Inh	100	58	68	5	119	3	6	3 1 (+ Inh) 1 (0 Inh)	482	92	101

<sup>a</sup>: number of samples with *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts detected by IF after Immunomagnetic separation and number of samples with *Toxoplasma* oocysts detected by PCR; n (+ Inh) = presence of DNA in sample after BSA adding, n (0 Inh) = absence of DNA in sample after BSA adding, n Inh = presence of PCR inhibitor after BSA adding.

### Détection de :

- *Cryptosporidium* dans 92 échantillons (19%)
- *Giardia* dans 101 échantillons (21%)
- *Toxoplasma* dans 37 échantillons (8%)

N = 482



Aubert et al. 2009