

ÉTUDE DE NBL1, UNE PROTÉINE DE TRICHINELLA SPIRALIS PRESENTANT UN INTÉRÊT POUR LE DÉVELOPPEMENT DE NOUVEAUX OUTILS DE LUTTE CONTRE CE PARASITE ZOONOTIQUE

Aurélie Heckmann

► To cite this version:

Aurélie Heckmann. ÉTUDE DE NBL1, UNE PROTÉINE DE TRICHINELLA SPIRALIS PRE-SENTANT UN INTÉRÊT POUR LE DÉVELOPPEMENT DE NOUVEAUX OUTILS DE LUTTE CONTRE CE PARASITE ZOONOTIQUE . Parasitologie. 2016. hal-01469135

HAL Id: hal-01469135 https://ephe.hal.science/hal-01469135

Submitted on 16 Feb 2017 $\,$

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.

MINISTÈRE DE l'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté

par HECKMANN Aurélie

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE : ÉTUDE DE NBL1, UNE PROTÉINE DE *TRICHINELLA SPIRALIS* PRESENTANT UN INTÉRÊT POUR LE DÉVELOPPEMENT DE NOUVEAUX OUTILS DE LUTTE CONTRE CE PARASITE ZOONOTIQUE

soutenu le 15 décembre 2016 devant le jury suivant :

PALDI Andras – Président VALLÉE Isabelle – Tuteur scientifique KARADJIAN Grégory – Co-tuteur scientifique RENAUD-PAÏTRA Flore – Tuteur pédagogique BLANCHARD-LETORT Alexandra – Rapporteur UNGEHEUER Marie-Noëlle – Examinateur

Mémoire préparé sous la direction de : Dr Isabelle VALLÉE et Dr Grégory KARADJIAN UMR BIPAR ANSES ENVA UPEC ANSES / Laboratoire de Santé Animale 94706 Maisons-Alfort cedex

Directeur : Dr Nadia HADDAD

et de Flore RENAUD-PAÏTRA LGBC EA 4589 UVSQ / EPHE Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire UFR des Sciences de la Santé Simone Veil 78180 Montigny-Le-Bretonneux EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

Directeur : Pr Bernard MIGNOTTE

MINISTÈRE DE l'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté

par HECKMANN Aurélie

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE :

ÉTUDE DE NBL1, UNE PROTÉINE DE *TRICHINELLA SPIRALIS* PRESENTANT UN INTÉRÊT POUR LE DÉVELOPPEMENT DE NOUVEAUX OUTILS DE LUTTE CONTRE CE PARASITE ZOONOTIQUE

soutenu le 15 décembre 2016 devant le jury suivant :

PALDI Andras – Président VALLÉE Isabelle – Tuteur scientifique KARADJIAN Grégory – Co-tuteur scientifique RENAUD-PAÏTRA Flore– Tuteur pédagogique BLANCHARD-LETORT Alexandra - Rapporteur UNGEHEUER Marie-Noëlle - Examinateur

Mémoire préparé sous la direction de : Dr Isabelle VALLÉE et Dr Grégory KARADJIAN UMR BIPAR ANSES ENVA UPEC ANSES / Laboratoire de Santé Animale 94706 Maisons-Alfort cedex

et de Flore RENAUD-PAÏTRA LGBC EA 4589 UVSQ / EPHE Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire UFR des Sciences de la Santé Simone Veil 78180 Montigny-Le-Bretonneux EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre) Directeur : Dr Nadia HADDAD

Directeur : Pr Bernard MIGNOTTE

REMERCIEMENTS

Au terme de ces trois dernières années, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ce diplôme d'EPHE.

Dr Pascal Boireau, Directeur du Laboratoire de Santé Animale de l'Anses, pour m'avoir permis de réaliser mon diplôme d'EPHE au sein de l'UMR BIPAR sur un sujet aussi riche que celui de l'étude de la protéine NBL1 de *Trichinella*.

La directrice de l'UMR, Dr Nadia Haddad et son adjoint Dr Henri-Jean Boulouis pour m'avoir encouragé et permis d'évoluer au sein de cette UMR.

Le Dr Isabelle Vallée, ma tutrice scientifique, pour m'avoir proposé et fais confiance sur ce sujet de diplôme d'EPHE concernant une technologie innovante à mettre en place au sein du laboratoire sur le parasite *Trichinella*. Merci pour tout ce temps passé à mes côtés durant ce diplôme mais également depuis ces dix années de travail au sein de l'équipe. Je te remercie également pour ta patience et tout le soutien scientifique et technique que tu m'as apporté tout au long de ce diplôme et lors de ma rédaction.

Le Dr Grégory Karadjian, mon cotuteur scientifique, qui s'est montré enthousiaste sur ce sujet de recherche dès son arrivée, il y a plus d'un an. Je te suis extrêmement reconnaissante pour m'avoir apporté tes compétences ainsi que tes judicieux conseils durant ce diplôme. Merci de m'avoir toujours encouragé et soutenu.

Le Dr Alexandra Blanchard, qui me fait l'honneur d'examiner mon travail et qui m'a apporté de précieux conseils lors de nos réunions sur le projet DIM Malinf.

La maître de conférences Flore Renaud-Païtra pour avoir accepté d'être mon tuteur pédagogique pour ce diplôme. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude et mon respect pour vos conseils et votre disponibilité tout au long du diplôme.

Le Dr Marie-Noëlle Ungeheuer et le Dr Andras Paldi pour avoir accepté de juger ce travail.

Les membres de l'équipe « Nématodes et protozoaires transmis par les aliments » qui ont contribué à l'avancement de ce diplôme en me transmettant leur savoir et leur expérience. Mais également aux bons moments passés ensemble autour de confiseries et gâteaux fait « maison » ! Merci particulièrement à Aurélie pour ta gentillesse, ton soutien et ta disponibilité durant ces trois dernières années mais également depuis ces 9 années de travail ensemble. Et également à Myriam, Charlotte, Amandine et Mohamed pour votre aide et votre joie au quotidien tant au bureau qu'au laboratoire.

Les membres de l'animalerie, Océane et Alain pour toute l'énergie que vous avez déployée à l'élevage, au puçage et à l'entretien des souris qu'ont nécessité mes travaux de recherche. Et particulièrement à Océane pour les bonnes dégustations de gâteaux que tu nous as faites.

Les membres de la laverie, Dany, Madeleine et Martine pour avoir toujours été très attentives et très réactives à mes besoins en verrerie et en produits à stériliser ; et pour les bons moments passés ensemble.

Tous les autres personnes de l'UMR BIPAR, passées et actuelles, pour leur sympathie au quotidien.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	1
TABLE DES MATIERES	2
ABREVIATIONS	6
INDEX DES TABLEAUX ET FIGURES	8
I. INTRODUCTION	10
1. Avant-propos	10
2. <i>Trichinella</i> et la trichinellose	14
2.1 Le contexte historique	14
2.2 Le parasite : <i>Trichinella</i>	16
2.3 Le cycle parasitaire de <i>Trichinella spiralis</i>	22
2.4 La morphologie des différents stades parasitaires	24
2.5 La trichinellose humaine	26
2.5.1 Le diagnostic clinique	28
2.5.2 Le diagnostic biologique	28
2.5.3 Le traitement	30
2.6 Le complexe parasite / cellule nourricière	30
3. Les protéines et antigènes spécifiques de Trichinella	32
4. Le mécanisme de l'interférence par ARN	34
4.1 Le principe	34
4.2 Etat des lieux de la machinerie du RNAi chez <i>Trichinella spiralis</i>	36
_4.3 Etude bibliographique chez <i>Trichinella spiralis</i>	38

5.	Ob	jectifs et stratégie de recherche	40
ę	5.1	Objectif général	40
Ę	5.2	Contexte du travail	40
Ę	5.3	Stratégie de recherche mise en œuvre	42
<i>II.</i>	MA	TERIELS ET METHODES	44
1.	Ana	alyses <i>in silico</i>	44
	1.1	Alignement des séquences	44
	1.2	Détermination des oligonucléotides spécifiques	44
	1.3	Détermination des sondes siRNA spécifiques du gène nbl1	48
2.	Мо	dèle souris et mode d'administration des parasites	48
	2.1	Le modèle murin	48
2	2.2	Infestation par voie orale	50
	2.3	Infestation des souris par intraveineuse	50
3.	Fnf	ration des souches de Trichinelle	50
			00
4.	Rée	cupération et mise en culture des différents stades parasitaires de <i>Trichinella spiralis</i>	52
4.	Ré 4.1	cupération et mise en culture des différents stades parasitaires de <i>Trichinella spiralis</i> Stade « Larves 1 Musculaires » (L1M)	52
4.	Ré 4.1 4.2	cupération et mise en culture des différents stades parasitaires de <i>Trichinella spiralis</i> Stade « Larves 1 Musculaires » (L1M) Stade « Adultes » (Ad)	52 52 52
4.	Réd 4.1 4.2 4.3	cupération et mise en culture des différents stades parasitaires de <i>Trichinella spiralis</i> Stade « Larves 1 Musculaires » (L1M) Stade « Adultes » (Ad) Stade « Larves 1 Nouveau-Nées » (L1NN)	52 52 52 52 54
4. 2 2 5.	Réc 4.1 4.2 4.3 Ana	cupération et mise en culture des différents stades parasitaires de Trichinella spiralis Stade « Larves 1 Musculaires » (L1M) Stade « Adultes » (Ad) Stade « Larves 1 Nouveau-Nées » (L1NN)	52 52 52 54 54
4. 2 5.	Ré 4.1 4.2 4.3 An a 5.1	cupération et mise en culture des différents stades parasitaires de Trichinella spiralis Stade « Larves 1 Musculaires » (L1M) Stade « Adultes » (Ad) Stade « Larves 1 Nouveau-Nées » (L1NN) alyses de biologie moléculaire Isolement d'acides nucléiques et synthèse d'ADN complémentaires	52 52 52 54 54 54
4. 2 5.	Ré 4.1 4.2 4.3 An 5.1 5.2	cupération et mise en culture des différents stades parasitaires de Trichinella spiralis Stade « Larves 1 Musculaires » (L1M) Stade « Adultes » (Ad) Stade « Larves 1 Nouveau-Nées » (L1NN) alyses de biologie moléculaire Isolement d'acides nucléiques et synthèse d'ADN complémentaires Amplification par une réaction en chaine par polymérase (PCR)	52 52 52 54 54 54 54 58
4. 2 5.	Ré 4.1 4.2 4.3 An 5.1 5.2 5.3	cupération et mise en culture des différents stades parasitaires de Trichinella spiralis Stade « Larves 1 Musculaires » (L1M) Stade « Adultes » (Ad) Stade « Larves 1 Nouveau-Nées » (L1NN) alyses de biologie moléculaire Isolement d'acides nucléiques et synthèse d'ADN complémentaires Amplification par une réaction en chaine par polymérase (PCR) Analyse des séquences	52 52 54 54 54 54 54 58 60
4. 2. 5. 4. 4. 4. 4. 4. 4. 4. 4. 4. 4. 4. 4. 4.	Ré 4.1 4.2 4.3 An 5.1 5.2 5.3 RE	cupération et mise en culture des différents stades parasitaires de Trichinella spiralis Stade « Larves 1 Musculaires » (L1M) Stade « Adultes » (Ad) Stade « Larves 1 Nouveau-Nées » (L1NN) alyses de biologie moléculaire Isolement d'acides nucléiques et synthèse d'ADN complémentaires Amplification par une réaction en chaine par polymérase (PCR) Analyse des séquences	52 52 54 54 54 54 58 60 62
4. 2 5. { { ///.	Ré 4.1 4.2 4.3 Ana 5.1 5.2 5.3 RE	cupération et mise en culture des différents stades parasitaires de Trichinella spiralis Stade « Larves 1 Musculaires » (L1M) Stade « Adultes » (Ad) Stade « Larves 1 Nouveau-Nées » (L1NN) alyses de biologie moléculaire Isolement d'acides nucléiques et synthèse d'ADN complémentaires Amplification par une réaction en chaine par polymérase (PCR) Analyse des séquences SULTATS 1 : CARACTERISATION MOLECULAIRE DE NBL1	52 52 54 54 54 54 58 60 62 62
4. 2 5. <i>!!!.</i> PA 1.	Réc 4.1 4.2 4.3 5.1 5.2 5.3 RES RTIE	cupération et mise en culture des différents stades parasitaires de Trichinella spiralis Stade « Larves 1 Musculaires » (L1M) Stade « Adultes » (Ad) Stade « Larves 1 Nouveau-Nées » (L1NN) alyses de biologie moléculaire Isolement d'acides nucléiques et synthèse d'ADN complémentaires Amplification par une réaction en chaine par polymérase (PCR) Analyse des séquences SULTATS 1 : CARACTERISATION MOLECULAIRE DE NBL1 termination de la séquence de NBL1 chez Trichinella	52 52 54 54 54 54 54 58 60 62 62 64
4. 2 5. 4 8 9 8 11.	Réc 4.1 4.2 4.3 5.1 5.2 5.3 REC RTIE	cupération et mise en culture des différents stades parasitaires de Trichinella spiralis Stade « Larves 1 Musculaires » (L1M) Stade « Adultes » (Ad) Stade « Larves 1 Nouveau-Nées » (L1NN) alyses de biologie moléculaire Isolement d'acides nucléiques et synthèse d'ADN complémentaires Amplification par une réaction en chaine par polymérase (PCR) Analyse des séquences SULTATS 1 : CARACTERISATION MOLECULAIRE DE NBL1 termination de la séquence de NBL1 chez Trichinella Amplification avec le couple d'oligonucléotides GP1 / GP10 et analyses des séquences	52 52 54 54 54 54 58 60 62 62 64 64

1.3 Assemblage des séquences en ADN génomique de NBL1	66		
2. Etude génomique de <i>Trichinella</i> spp.	68		
3. Etude de la protéine déduite de NBL1 chez <i>Trichinella</i>			
4. Conclusion	74		
PARTIE 2 : MISE EN PLACE DU PROTOCOLE VISANT LA CARACTERISATION DU ROLE DE NBL1 PAR SPECIFIQUE	un siRNA 76		
1. Etude transcriptomique des différents stades parasitaires de Trichinella	76		
1.1 Détermination des oligonucléotides pour la PCR en temps réel	76		
1.2 Etude de la transcription du gène <i>nbl1</i> aux différents stades	78		
2 Essai in vitro d'inactivation de la protéine NBL1 au stade L1NN	82		
2.1 Mise en place du protocole d'infestation des souris par injection intraveineuse des L1NN	82		
2.2 Mise en contact des L1NN avec un siRNA spécifique de NBL1	82		
2.2.1 Eude de la mortalité in vitro	82		
2.2.2 Etude de l'infectiosité in vivo	84		
2. Conclusion	86		
IV. DISCUSSION GENERALE	88		
Partie 1 : Exploration de la séquence protéique de NBL1 chez Trichinella spp.	88		
1. Au niveau de la séquence nucléotidique	90		
2. Au niveau de la séquence protéique	90		
Partie 2 : Application du siRNA spécifique de NBL1	94		
1. Comparaison du taux de transcrits de NBL1 à différents stades parasitaires de <i>T. spiralis</i>	94		
2. Etude de siRNA ciblant le transcript du gène codant pour <i>nbl1</i>	96		
V. PERSPECTIVES	100		
BIBLIOGRAPHIE	106		
ANNEXES	114		

ABREVIATIONS

ADJ5 : stade Adultes après 5 jours post-infestation ADJ5+2 : stade Adultes après 5 jours post-infestation et 2 jours de culture in vitro ADN : acide désoxyribonucléique ADNc : ADN complémentaire ADNg : ADN génomique ARN : acide ribonucléique ARNm : ARN messager CPK : créatine phosphokinase dNTP : désoxyribonucléotides DTT : dithiothréitol dsRNA : double-stranded RNA EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid E/S: Excrétion / sécrétion IgG : Immunoglobuline G ISS : Istituto Superiore di Sanità J+(nombre) : jours + le nombre de jours après J_0 kDa : kiloDalton KO: Knock-out LDH : Lactate Deshydrogénase L1M : Larves de stade 1 musculaire L1NN : Larve de stade 1 Nouveau- Nées L1 / L2 / L3 / L4: Larve stade1 / Larve stade 2 / Larve stade 3 / Larve stade 4 miARN : microARN OF1 : Oncins France 1 pb : paire de bases PBS : Phosphate-buffered saline P/S : pénicilline et streptomycine PCR : Amplification en Chaîne par Polymérase (Polymerase Chain Reaction) pi : post-infestation RNAi ou ARNi : interférence par ARN **RISC : RNA-induced silencing complex** siRNA : small interfering RNA spp. (pluriel) : espèces, du latin species pluralis, généralement abrégé « spp. » (en caractères romains) sp. (singulier): espèces, du latin species pluralis, généralement abrégé « sp. » (en caractères romains)

- T.: Trichinella
- Δ : delta

INDEX DES TABLEAUX ET FIGURES

<u>Tableaux</u>

Tableau 1 : Les différentes espèces ou génotypes dans le genre Trichinella ; caractéristiques principales
et répartition géographique17
Tableau 2 : Principaux antigènes identifiés chez T.spiralis 31
Tableau 3 : Analyse des différences entre les deux isoformes de NBL1
Tableau 4: Séquences nucléotidiques des amorces pour amplifier l'ADN génomique de NBL145
Tableau 5: Séquences nucléotidiques des amorces pour amplifier l'ADN complémentaire de NBL145
Tableau 6: Séquences nucléotidiques des amorces pour amplifier les gènes de ménage 45
Tableau 7: Séquences nucléotidiques des sondes siRNA spécifiques du gène nbl1 47
Tableau 8: Cycle PCR du thermocycleur lors de l'utilisation de la Taq phusion 57
Tableau 9: Cycle de PCR du LightCycler 480 (Roche) lors de l'utilisation du Luminaris Color HiGreen57
Tableau 10 : Analyse du pourcentage d'identité du gène nbl1 au niveau nucléotidique, des différentes
espèces de <i>Trichinella</i> spp. analysées68

Figures

Figure 1 : Répartition mondiale des différentes espèces de Trichinella spp	15
Figure 2 : Cycle parasitaire de <i>T. spirali</i> s	21
Figure 3 : Représentation du stade Adulte J+5 de <i>T. spiralis</i>	23
Figure 4 : Représentation du stade L1NN de <i>T.spiralis</i>	23
Figure 5 : Vascularisation de la cellule nourricière	25
Figure 6 : Représentation du stade L1M de <i>T.spiralis</i>	25
Figure 7 : Mécanisme général d'action de l'ARN à interférence	33
Figure 8 : Alignement des séquences protéiques des 2 isoformes de NBL1	39
Figure 9 : Visualisation des oligonucléotides lors de l'amplification par qPCR sur la séquence du gè <i>nbl1</i>	ne de 46
Figure 10: Schéma de l'infestation des souris <i>per os</i>	49
Figure 11: Schéma de la préparation des seringues pour des injections par voie intraveineuse	49
Figure 12: Schéma de la digestion artificielle	51

Figure 13: Schéma de la récupération des adultes à partir des intestins de souris
Figure 14 : Amplicons obtenus à partir des couples d'oligonucléotides GP1/GP10 et GP1int/GP10int63
Figure 15: Profil de migration des produits de PCR ciblant le gène entier de <i>nbl1</i> à partir de l'ADNg de <i>Trichinella</i> spp
Figure 16: Profil de migration des produits de PCR ciblant une partie du gène <i>nbl1</i> à partir de l'ADNg de <i>Trichinella</i> spp
Figure 17 : Profil de migration des produits de PCR ciblant différents fragments du gène <i>nbl1</i> à partir de l'ADNg de <i>Trichinella</i> spp
Figure 18 : Profil de migration des produits de PCR ciblant différents fragments du gène <i>nbl1</i> l'ADNg de <i>T. pseudospiralis</i>
Figure 19: Alignement nucléotidique par espèce de <i>Trichinella</i> spp., réalisé par CLC Genomics, des différents fragments d'ADN génomique amplifiés
Figure 20 : Alignement nucléotidique des ADN génomiques reconstitués du gène <i>nbl1</i> de <i>T. spiralis</i> , <i>T. nativa</i> , <i>T. britovi</i> et <i>T. pseudospiralis</i> , réalisé par Multalin
Figure 21 : Alignement des séquences protéiques déduites des séquences nucléotidiques du gène <i>nbl1</i> de <i>T. spiralis</i> , <i>T. nativa</i> , <i>T. britovi</i> et <i>T. pseudospiralis</i> par homologie au gène codant pour NBL1 chez <i>T. spiralis</i>
Figure 22 : Amplicons théoriques obtenus lors de l'amplification de l'ADNc du gène <i>nbl1</i> 75
Figure 23 : Profil de migration des produits de PCR ciblant la séquence codante de la protéine NBL1 chez <i>T. spiralis</i>
Figure 24 : Analyse transcriptomique du gène <i>nbl1</i>
Figure 25 : Expression des ARNm de NBL1 dans les stades L1NN et Adultes J5 par rapport à celle des L1M
Figure 26 : Rendement parasitaire obtenu par digestion artificielle 6 semaines post-infestation par intraveineuse de différentes doses de L1NN
Figure 27 : Mortalité des L1NN au cours du temps en milieu de culture en présence ou non de siRNA n°1 spécifique de NBL1
Figure 28 : Installation des L1NN traitées ou non par un siRNA spécifique du gène <i>nbl1</i> dans les muscles des souris
Figure 29 : Alignement protéogénomique, réalisé par Multalin, des séquences protéiques du gène <i>nbl1</i> de <i>T. spiralis</i> , et du gène chymotrypsine C de <i>T. spiralis</i>

I. INTRODUCTION

1. Avant-propos

Le nématode *Trichinella* spp. est un parasite zoonotique des viandes à l'origine de la trichinellose. Les larves de *Trichinella* spp. sont présentes dans les fibres musculaires et infectent l'hôte lorsque la viande est consommée crue ou peu cuite (Dorny et al., 2009). Ce nématode a la particularité de pouvoir envahir son hôte tout en développant des stratégies complexes pour détourner la cellule hôte en cellule nourricière, dans laquelle il est capable de vivre pendant des années à l'abri du système immunitaire. *Trichinella* spp. a également la caractéristique de pouvoir s'adapter à une grande diversité d'hôtes (mammifères monogastriques, oiseaux, reptiles). De fait, ce parasite est présent à l'échelle mondiale et engendre un problème majeur de santé publique. La trichinellose humaine est une maladie émergente ou ré-émergente dans de nombreuses parties du monde en fonction, notamment, des habitudes culinaires, du contexte épidémiologique et socio-économique des pays, mais également par sa présence dans la faune sauvage et au niveau des élevages porcins.

Malgré le manque d'informations récentes sur cette maladie à l'échelle mondiale, on considère que 11 millions de personnes seraient séropositives (Dupouy-Camet, 2000); il n'y a pas eu d'autre recensement publié depuis 2000. A l'échelle européenne, en 2012, il a été recensé 6 cas de trichinellose humaine pour 10 millions d'habitants dans les pays de l'Union Européenne ; les taux de déclaration les plus élevés ont été signalés en Lettonie (201 cas pour 10 millions d'habitants), suivie de la Lituanie, la Roumanie et la Bulgarie (930, 700 et 410 cas pour 10 millions d'habitants) (European Food Safety Authority, and European Centre for Disease Prevention and Control, 2014). Il est à savoir que nombre d'infections ne sont pas signalées dans de nombreux pays en raison de l'absence de tests sérologiques appropriés et de la faible connaissance de cette maladie de la part des médecins. Au niveau français, aucun cas de trichinellose humaine due à de la viande contrôlée et/ou commercialisée n'a été relevé depuis 1998, et notamment en raison d'un renforcement des méthodes de contrôle (Vallée et al., 2007; Vallée I et al., 2016). Une réglementation européenne imposant le contrôle en abattoir des viandes porcines et autres espèces sensibles (sanglier, cheval), a fait régresser cette maladie en Europe (2015, Règlement d'exécution (UE) 2015/1375). Ce règlement stipule que tout animal de boucherie ou tout gibier sensible à Trichinella doit être soumis à la recherche de larves de trichine. Le laboratoire assurant le dépistage doit être agrée par le Ministère en charge de l'Agriculture et soumis à une accréditation délivrée par le Comité Français d'Accréditation (COFRAC). Des cas autochtones ont été répertoriés en France mais depuis 1999, ils sont dus à la consommation de viande non contrôlée par les services vétérinaires. En 2015, 3 cas de trichinellose humaine ont été déclarés suite à la consommation de figatelles crues provenant d'un porc plein air Corse non contrôlé par les services vétérinaires (Ruetsch et al., 2016). D'autres cas humains ont été déclarés importés, comme les récentes contaminations de voyageurs au Groenland ayant consommé de la viande d'ours (Dupouy-Camet et al., 2016).

Développer des stratégies de lutte efficaces contre le parasite Trichinella spp. chez l'animal est une nécessité afin d'empêcher la contamination humaine à l'échelle mondiale. La première approche consiste à protéger les élevages porcins de tout contact avec la faune sauvage extérieure et à maitriser leur alimentation, et ainsi à disposer d'élevages en conditions d'hébergement contrôlé. Ce type d'élevage est reconnu par la règlementation européenne (EU 2015/1375) et pourra permettre de déroger au dépistage individuel systématique des carcasses avec le test direct lorsqu'un test sérologique sera validé pour une surveillance épidémiologique. Il n'existe malheureusement pas encore de test sérologique suffisamment fiable pour que cette mesure s'applique. Ainsi la vaccination se présenterait comme une autre alternative au test direct lorsque ce test n'est pas envisageable pour des raisons de coût élevé (principalement dans les pays en voie de développement et de forte endémie de trichinellose). Une vaccination anti-Trichinella des porcs protégerait les porcs plein-air ou les porcs d'élevages intensifs dans les pays (ou régions) où le contrôle vétérinaire par test direct est trop difficile à mettre en place ou reste peu fiable. Une telle stratégie est envisageable pour lutter contre un parasite en élevage porcin comme en témoigne la mise en place d'une stratégie d'éradication de Taenia solium au Pérou. L'utilisation d'un vaccin constitué d'un antigène recombinant d'oncosphère (ensemble d'une larve de cestode qui a 3 paires de crochets fixateurs ou d'épines) nommée TSOL18 permet d'obtenir l'interruption du cycle parasitaire de Taenia solium dans une région de forte endémicité en alliant vaccination animale et traitement humain en cas de contamination humaine (Garcia et al., 2016). Aucun vaccin préventif n'existe à l'heure actuelle sur le marché pour protéger les porcs contre le parasite Trichinella. En revanche, des études de vaccination précédemment conduites au laboratoire ont montré que la protéine nommée NBL1 induit une diminution de 72% de la charge parasitaire chez les porcs vaccinés (Vallée I et al., 2012). Cette protéine NBL1 est une sérine protéase spécifique du stade L1 nouveau-né (L1NN) ; ce stade L1NN infeste la fibre musculaire de l'hôte.

La stratégie de l'équipe au sein de laquelle je travaille consiste à développer des outils innovants de lutte contre *Trichinella* chez les porcins, en proposant de développer des tests sérologiques spécifiques et sensibles, et une vaccination efficace.

Le travail présenté dans ce mémoire est constitué de deux parties. La première porte sur l'étude de la séquence génomique codant pour le gène *nbl1* des espèces *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*. Et la seconde partie concerne la mise au point de l'inactivation transitoire de l'expression du gène codant pour la protéine NBL1 *in vivo* grâce au mécanisme d'interférence à l'ARN (ARNi) chez les larves du stade invasif L1 nouveau-né (L1NN).

2. Trichinella et la trichinellose

2.1 Le contexte historique

En 1835, au cours d'une séance de dissection à l'hôpital de Londres, James Paget, jeune étudiant en médecine, découvre de petits grains blancs dans la chair d'un cadavre. Il décide de les étudier au microscope et observe des vers. Lors d'une réunion du club des étudiants de l'hôpital, il rend compte de ses résultats. Richard Owen, biologiste à l'hôpital Saint Bartholomew, décrit alors le parasite comme une nouvelle espèce qu'il nomme *Trichina spiralis*. En 1895, Louis-Joseph Alcide Railliet, zoologiste à l'école vétérinaire d'Alfort, constatant que le nom de *Trichina* était déjà attribué à un genre d'insecte depuis 1830, propose le nom de *Trichinella*. La découverte de la plus ancienne capsule de *Trichinella* remonte à 1200 ans avant J.C., et a été faite rétrospectivement en 1974 au niveau des muscles intercostaux d'une momie égyptienne (Millet, N.B. et al., 1980).

C'est en 1860 que des expérimentations menées par Zenker ont mis en évidence la pathogénicité et le pouvoir létal du parasite, ainsi que la transmission du parasite à l'Homme par l'ingestion de viande porcine contaminée (Zenker, 1860). Les signes cliniques de la trichinellose sont alors connus et de nombreux cas sont ainsi décrits aux États-Unis, en Irlande, en Grande Bretagne et en Allemagne où les premiers contrôles des viandes de porcs ont eu lieu en 1963.

Depuis le 19^{ème} siècle, ces parasites ont été considérés comme un problème majeur chez le porc. Pendant la période 1879-1888, plusieurs pays ont interdit l'importation de viande de porc des États-Unis car il n'y avait pas de contrôle systématique des carcasses. Depuis la seconde guerre mondiale, les changements dans les pratiques d'élevages de porcs ont fortement réduit la transmission de *Trichinella* spp. au niveau mondial. Ainsi cette maladie est aujourd'hui confinée à des zones pauvres, défavorisées et /ou déstabilisées par des conflits où les contrôles sanitaires des viandes sont difficiles à mettre en place voire inexistants (Pozio, 2014). De façon inattendue c'est en 1975, que la viande de cheval a été identifiée comme source de contamination humaine en France et en Italie ; ces deux pays sont les principaux pays à consommer la viande chevaline crue (Boireau et al., 2000). De 1975 à 2005, 8 épisodes ont été déclarés en France provenant de la consommation de viande chevaline importée des pays de l'Est ou de l'Amérique du Nord. Le plus important épisode survenu en France a eu lieu en 1985 et a engendré 2296 cas humains dont 5 cas mortels (Pozio, 2015).

Suite à ces crises sanitaires en France, un dispositif renforcé de contrôle des viandes a été mis en place depuis 1999. Celui-ci se décline en plusieurs points : i) la formation des techniciens des services vétérinaires qui effectuent le dépistage direct quotidien dans les viandes, ii) la standardisation de la méthode d'analyse et l'harmonisation au plan national, et iii) l'agrément des laboratoires par le ministère en charge de l'agriculture et leur accréditation par le Cofrac (Vallée et al., 2007; Vallée I et al., 2016). Grâce à ce dispositif, en France, il n'y a plus de trichinellose humaine due à la consommation de viande contrôlée.



Figure 1 : Répartition mondiale des différentes espèces de *Trichinella* spp. (modifié de (De Bruyne A. et al., 2006))

Les seuls cas déclarés (26 cas depuis 2004 en France) sont, soit des cas autochtones avec consommation de viande n'ayant pas été contrôlée par les services vétérinaires, soit des cas importés lors de voyages à l'étranger, notamment en région polaire comme en témoignent les derniers cas dus à la consommation de viande d'ours (Ruetsch et al., 2016).

2.2 Le parasite : Trichinella

Trichinella spp est un nématode microscopique du genre *Trichinella* appartenant au phylum des Nématodes, à la classe des Enoplea, à l'ordre des Trichocephalida et la famille des Trichinellidae. La première espèce décrite en 1896 fut *T. spiralis*-T1. Par la suite, les critères basés sur les caractères biologiques ont permis de différencier 3 nouvelles espèces en 1972 (Britov V.A. and Boev S.N, 1972; Garkavi, 1972): *T. nativa*-T2:, espèce encapsulée retrouvée dans les zones arctiques ; *T. nelsoni*-T7, également encapsulée et retrouvée dans les zones tropicales ; et *T. pseudospiralis*-T4, espèce non encapsulée et cosmopolite. Mais au vu des faibles différences morphologiques et de la répartition cosmopolite de ces parasites, ces critères d'identification étaient insuffisants pour différencier les espèces entre elles. Grâce à la biologie moléculaire, en 1992, une nouvelle classification a conduit à l'identification de 5 espèces (*T. spiralis, T. nativa, T. nelsoni, T. pseudospiralis*, et *T. britovi*-T3 et 3 génotypes (T5, T6 et T8) (Pozio et al., 1992). Par la suite en 1999, le génotype T9 (Nagano et al., 1999), et l'espèce *T. papuae* (T10) (Pozio et al., 1999) ont pu être différenciés. Le génotype T5 a été nommé *T. murrelli*-T5 en 2000 (Pozio and La Rosa, 2000). Puis plus récemment, en 2002, *T. zimbawensis*-T11 (Pozio et al., 2002), et *T. patagoniensis*-T12 en 2008 (Krivokapich et al., 2012) ont pu être décrits.

A ce jour, 9 espèces ont donc été décrites en fonction de leur distribution géographique (Figure 1), de leurs propriétés biologiques et de leur morphologie, et 3 génotypes non caractérisés à ce jour ont été décrits (Pozio and Zarlenga, 2013; Pozio et al., 2009). Seules les méthodes moléculaires offrent la possibilité de différencier les différentes espèces (Pozio, E. and La Rosa, G., 2003; Zarlenga et al., 1999, 2001). Ce parasite a un large spectre d'hôtes qui inclut plus de 100 espèces de mammifères, d'oiseaux et de reptiles. Les espèces du genre *Trichinella* sont largement réparties sur tous les continents, des zones froides aux zones chaudes (Tableau 1).

• *T. spiralis* - T1 a une répartition cosmopolite et est essentiellement distribuée dans les zones tempérées. Cette espèce est plus étroitement associée au porc domestique mais contamine également beaucoup de mammifères de la faune sauvage (ex : sangliers, rongeurs) et domestique (ex ; cheval, chien). Sa répartition est mondiale et elle est le principal agent de la trichinellose humaine.

• *T. nativa* - T2 semble être caractéristique de la zone holarctique (zone au nord du tropique du Cancer ; température inférieure à -4°C en Janvier) (Pozio, 2005). Les principales caractéristiques biologiques de *T. nativa* sont un indice de faible capacité reproductive chez les rongeurs de laboratoire (Airas et al., 2012; Calvet, 2016) et chez le porc domestique et sauvage, ainsi qu'une grande résistance à

Tableau 1 : Les différentes espèces ou génotypes dans le genre Trichinella ;
caractéristiques principales et répartition géographique
(Pozio et al., 2009)

Espèce / génotype	Répartition géographique	Cycle	Hôte naturel	Année d'isolement			
Clade des « Encapsulés »							
T. spiralis T1	Cosmopolite	Domestique et sauvage	Porc, rat et quelquefois les carnivores	1835			
<i>T. nativa</i> T2	Région arctique et subarctique	Sauvage	Carnivores terrestres et marins	1972			
T. britovi T3	Zones tempérées des régions Paléarctique, et du Nord et de l'Ouest de l'Afrique	Sauvage et quelque fois domestique	Carnivores et quelquefois le porc	1992			
T. murrelli T5	Zone tempérée de la région néarctique	sauvage	Carnivores	1992			
T. nelsoni T7	Région éthiopique	sauvage	Carnivores et quelquefois le porc	1972			
Т6	Amérique du Nord	sauvage	Carnivores	1992			
Т8	Afrique du Sud et Namibie	sauvage	Carnivores	1992			
Т9	Japon	sauvage	Carnivores	1999			
<i>T. patagoniensis</i> T12	Argentine	sauvage	Carnivores	2008			
	Clad	<u>e des « Non enca</u>	apsulés »				
T. pseudospiralis T4	Cosmopolite	Sauvage et quelquefois domestique	Mammifères et oiseaux	1972			
<i>T. papuae</i> T10	Papouasie- Nouvelle-Guinée, Thaïlande	Sauvage et quelquefois domestique	Porc et quelquefois crocodiles	1999			
<i>T. zimbabwensis</i> T11	Ethiopie, Mozambique,Afriqu e du Sud, Zimbabwe	Sauvage et domestique	Crocodiles, varan, lézard, lion	2002			

la congélation dans les muscles de carnivores (Pozio and Darwin Murrell, 2006). Ce caractère biologique est perdu lors d'infestations expérimentales du porc ou des rongeurs (Kapel, 2000; Malakauskas and Kapel, 2003), ce qui suggère un certain niveau de relation hôte-parasite. Les infections humaines se produisent fréquemment chez les personnes vivant dans les zones glaciales du Canada, du Groenland, de la Sibérie et de la Finlande (Airas et al., 2010; Reichard et al., 2008; Skírnisson et al., 2010).

• *T. britovi* - T3 est principalement rencontrée chez les carnivores sauvages, bien que l'espèce puisse être retrouvée chez les porcs et sangliers. Cette espèce se rencontre essentiellement dans les régions tempérées d'Europe, d'Asie et du nord-ouest de l'Afrique (Pozio and Darwin Murrell, 2006). En cas d'infestation humaine, celle-ci est atténuée par le pouvoir modéré d'infection de cette espèce. Les infections humaines causées par *T. britovi*, lors de la consommation de porcs en liberté, de gibier et de viande de cheval, ont été documentées en France, Italie, Espagne et Turquie.

• *T. murrelli* - **T5** a été isolée en Amérique du Nord. Cette espèce touche particulièrement les mammifères sauvages, et occasionnellement le cheval et l'Homme. À ce jour, 2 épisodes causés par cette espèce ont été recensés. L'un est survenu suite à la consommation de viande de cheval du Connecticut importée en France en 1985 (Ancelle et al., 1998; Boireau et al., 2000; Touratier, 2001). Un deuxième épisode a été documenté suite à la consommation de viande crue d'un ours noir chassé dans le nord de la Californie (Hall et al., 2012). Il est connu que ce parasite circule en Amérique du Nord dans la faune sauvage (Hill et al., 2008; Pozio et al., 2001; Reichard et al., 2011); il a également été rapporté chez un chien domestique américain (Dubey et al., 2006).

• *Trichinella* **T6** - **T6** a été détectée chez des mammifères carnivores (grizzlis) mais aussi chez l'Homme, dans quelques régions du Canada et des Etats Unis (Larter et al., 2011). Cette population est très proche de *T. nativa*, sachant que des hybrides de ces deux espèces ont été découverts dans la nature, suggérant une séparation récente (La Rosa et al., 2003). Comme avec *T. nativa*, les larves de *Trichinella* T6 peuvent survivre dans les muscles congelés de carnivores durant de longues périodes de temps.

• *T. nelsoni* - **T7** a été sporadiquement rencontrée chez les mammifères de la faune sauvage en Afrique (Marucci et al., 2009; Pozio et al., 1997) mais peu d'informations sur cette espèce sont actuellement disponibles.

• **Trichinella T8 - T8** est très proche de *T. britovi* (Pozio et al., 2009). *Trichinella* T8 a été détectée chez les carnivores (lions, hyènes et un léopard) en Afrique du Sud et en Namibie (Marucci et al., 2009; Mukaratirwa et al., 2013). Ce parasite n'a jamais été signalé comme une cause de trichinellose humaine. Du fait de la similitude génétique de cette espèce avec *T. britovi*, il est difficile de différencier les deux espèces dans les études épidémiologiques.

• **Trichinella T9** - **T9** a uniquement été détectée chez des carnivores sauvages du Japon (Kanai et al., 2007). Elle est également assimilée à *T. britovi*. Pourtant l'étude génomique montre un pourcentage d'identité plus élevé avec *T. murrelli*. (Krivokapich et al., 2012). *Trichinella* T9 n'a pas encore été détectée comme une cause d'infection humaine et sa distribution est peu connue pour des raisons similaires à celles exprimées pour *Trichinella* T8.

• *T. patagoniensis* - T12 a été identifiée chez un couguar provenant de la Patagonie en Argentine (Krivokapich et al., 2008). Cette espèce se retrouve principalement chez les carnivores et montre une faible infectiosité chez le porc. Les larves musculaires de *T. patagoniensis* sont infectieuses dans du tissu musculaire de chat maintenu à -5°C pendant 3 mois, mais ne survivent pas dans les muscles de chats congelés à -18°C pendant 1 semaine. Aucune infection humaine causée par *T. patagoniensis* n'a été décrite à ce jour.

Trois espèces du genre *Trichinella* ne forment pas de capsule épaisse de collagène à la périphérie de la cellule nourricière (Pozio and Zarlenga, 2013); ces espèces sont appelées les « non encapsulées » :

• *T. pseudospiralis* - T4 est cosmopolite et infecte les mammifères (ex : renard, panthère) et les oiseaux carnivores (ex : corbeau, chouette hulotte) (Pozio, 2016). Sa répartition est mondiale et peut s'expliquer par la migration des oiseaux.

• *T. papuae* - T10 a été rencontrée pour la première fois chez le porc en Nouvelle-Guinée et par la suite chez le crocodile et la tortue. La viande des porcs sauvages infestés naturellement conserve son infectiosité jusqu'à neuf jours après que les porcs aient été abattus et que leur carcasse ait été laissée dans un environnement tropical (35°C, 79,0% d'humidité relative). Ceci est cohérent avec la capacité d'adaptation de ce parasite à ces conditions environnementales tropicales (Owen and Reid, 2007).

T. zimbabwensis - T11 a été identifiée chez des crocodiles élevés dans des fermes au Zimbabwe, au Mozambique, en Afrique du sud et en Ethiopie. Il y eu un cas positif sur un lion en Afrique du Sud qui est le seul mammifère infecté par T. *zimbabwensis* détecté dans la nature à ce jour (La Grange et al., 2010). Expérimentalement, cette espèce peut infester un large spectre de mammifères mais aucun cas humain n'a été décrit à ce jour. La répartition de cette espèce est encore inconnue.



Figure 2 : Cycle parasitaire de *T. spiralis* (Modifié de (Despommier, D.D. et al., 2000))

2.3 <u>Le cycle parasitaire de Trichinella spiralis</u>

Trichinella est un nématode à cycle auto-hétéroxène c'est-à-dire qu'il est à la fois hôte intermédiaire et hôte définitif (Soulé, C. et al., 1991a).

L'ensemble du cycle parasitaire se réalise avec une phase intestinale suivie d'une phase musculaire entre lesquelles s'intercale une phase de migration lymphatico-sanguine (Figure 2).

L'infection débute par l'ingestion de viande contenant le parasite infestant au stade L1M (Larves de stade 1 Musculaire). Sous l'action des enzymes digestives de l'estomac, les L1M sont libérées de la fibre musculaire de l'hôte et sont rapidement rendues libres dans l'estomac (Stewart et al., 1987) afin d'atteindre l'intestin par des mouvements de reptation (Despommier et al., 1978). Ces mouvements de reptation sont favorisés par les sels biliaires, et facilitent ainsi la pénétration dans les cellules épithéliales. La partie externe de la cuticule (épicuticule) est altérée par les conditions de lyse alcaline et par les enzymes digestives pancréatiques (Stewart et al., 1987). Cela permet aux parasites libres de percevoir les marqueurs environnementaux et de discerner leur localisation dans l'hôte soit, à ce stade, la muqueuse intestinale. Les parasites immatures sont stimulés par des facteurs encore inconnus pour pénétrer dans l'épithélium à la base des villosités (Wright, 1979). Au cours de sa migration, le parasite va générer des tunnels dans l'épithélium intestinal, à la recherche d'un partenaire sexuel (ce phénomène est encore mal connu).

Dans les 30 heures suivant l'invasion de l'épithélium intestinal, les larves subissent rapidement 4 mues et atteignent le stade final d'adulte mâle ou femelle différencié (acquisition de la maturité sexuelle). Les accouplements se produisent dans les 3 jours suivant l'infestation et les premières larves L1 nouveau-nées (L1NN) sont émises par les femelles dans les 48h suivant la fécondation ; l'émission des L1NN peut durer plusieurs jours. Les adultes mâles ou femelles persistent dans l'intestin puis meurent dans les jours (ou semaines en fonction de l'espèce hôte) qui suivent et sont éliminés dans la lumière intestinale (Soulé, C. et al., 1991a).

Les L1NN expulsées traversent la *lamina propria* des villosités de la muqueuse intestinale à l'aide de leur stylet (situé au niveau de la cavité buccale) et pénètrent dans les vaisseaux lymphatiques ou dans les capillaires sanguins en moins d'une heure après leur naissance. Elles diffusent ainsi dans tout l'organisme et vont pénétrer dans les cellules des fibres musculaires striées squelettiques où elles trouveront un nouvel habitat dès 6 jours post-infestation. Les muscles les plus irrigués sont généralement les plus infestés. Les L1NN peuvent infester transitoirement les cellules du cœur, du cerveau, du foie, de la rate sans toutefois y poursuivre leur développement (Harley and Gallicchio, 1971; Wang and Bell, 1986). Chez le rat, une étude a montré que des L1NN étaient retrouvées dans le sang, la cavité abdominale, le foie, les reins et les poumons jusqu'à 14 jours post-infestation (Harley and Gallicchio, 1971).

Dans les 24h qui suivent la pénétration dans la cellule musculaire, la larve va doubler de volume et



Figure 3 : Représentation du stade Adulte J+5 de T. spiralis.

A : Femelle, 3 mm x 36 μ m, les L1NN sont visibles dans l'utérus. B : Mâle, les appendices copulateurs sont caractéristiques, 1,5 mm x 36 μ m (Villella, J.B, 1970)



Figure 4 : Représentation du stade L1NN de T.spiralis

A : Larve L1NN provenant du sang de souris et récupérée 6 jours post infestation par des L1M ; L1NN fixée avec de l'éthanol à 70% et à chaud puis une coloration à l'hématoxyline de Ehrlich. **B** : L1NN (115 à 140µm x 9 à 13µm) provenant du muscle de souris après 7 jours post infestation par des L1M. (d'après (Khan, 1966) modifiée)

ne plus grossir jusqu'au 4^{ème} jour. La cellule musculaire va alors subir un réarrangement de nature biologique et physiologique : elle va perdre son organisation de cellule musculaire et acquérir les propriétés de la cellule nourricière. Ce programme de transformation de la cellule musculaire en cellule nourricière est déclenché par le parasite ; ainsi la survie de cette cellule nourricière devient étroitement dépendante de celle du parasite (Despommier, 1998). Un véritable dialogue existe entre le parasite et la cellule hôte. Des médiateurs protéiques d'origine parasitaire sont impliqués mais aucun d'entre eux n'est identifié avec certitude. Cette différenciation va se produire entre le 4^{ème} et le 20^{ème} jour qui suit la pénétration de la larve L1NN. Pendant les 20 jours qui suivent la pénétration de la larve L1NN dans la cellule musculaire, le parasite va subir une maturation pour atteindre le stade L1M. La formation de la capsule autour de la larve L1M commence aux alentours du 15^{ème} jour après l'infestation. Elle est complète entre la 4^{ème} et la 5^{ème} semaine chez l'homme et les animaux de laboratoire. La formation de la capsule résulterait d'une adaptation de la fibre musculaire infestée à la présence du parasite (Despommier, 1990). Parallèlement, un réseau capillaire se met en place (Despommier, 1998).

Après une période variable de quelques mois à quelques années, suivant les espèces hôtes et suivant les individus de chaque espèce, la capsule va commencer à se calcifier (Soulé, C. et al., 1991a).

2.4 La morphologie des différents stades parasitaires

Au sein du même hôte, *Trichinella* spp. passe par 3 phases différentes : une phase entérique avec les stades L1M, L1, L2, L3, L4 puis Adultes, une phase circulante avec le stade « L1NN », et une phase musculaire de latence avec le stade L1M.

Le stade Adulte (Figure 3) est intra-épithélial et passe par une succession de 4 mues (L1, L2, L3, L4, Adultes) pour être différencié en mâles et femelles ; les femelles sont pratiquement 2 fois plus grandes que les mâles. La durée de vide de ce stade chez l'hôte est de l'ordre de quelques jours.

Les larves L1NN circulent dans l'organisme pendant plusieurs jours avant de rejoindre la cellule musculaire. Les premières L1NN arrivent dans le muscle après 6 jours post-infestation. Á 7 jours, lorsque la larve L1NN est dans le muscle, on distingue un étranglement marquant la jonction entre l'œsophage et l'intestin, des cellules irrégulièrement disposées qui formeront le stichosome et le rectum. Les larves mesurent entre 115µm et 140µm de longueur et ont un diamètre de 9 à 13µm (Figure 4) (Khan, 1966). A ce stade commence la synthèse de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) par la cellule nourricière (Capó et al., 1998), favorisant ainsi l'angiogenèse avec la néovascularisation par un fin réseau de capillaires (veinules et artérioles) entourant alors la cellule nourricière achevée (Figure 5).

En parallèle de la formation de la cellule nourricière, les L1NN maturent pour passer au stade L1M (Figure 6). Leur volume augmente de 270 fois (Despommier, D.D., 1983), la cuticule s'épaissit, les stichocytes (cellules unicellulaires disposées en empilement autour de l'œsophage) se développent et se



Figure 5 : Vascularisation de la cellule nourricière

(<u>www.Trichinella.org</u>). Le parasite est responsable du remodelage de la cellule musculaire et le fait de sécréter une variété de protéines dans son créneau intracellulaire entraîne une reprogrammation d'expression génomique de la cellule hôte (Despommier, 1998). La capsule est composée principalement de collagène IV et VI dont la synthèse est programmée par la cellule nourricière. En même temps, l'angiogenèse commence au sein de la cellule nourricière ; cela permet au parasite et la cellule d'acquérir les nutriments qui leur sont nécessaires et d'éliminer les déchets.



Figure 6 : Représentation du stade L1M de *T.spiralis.*

A ce stade le parasite mesure 1 mm x 36 µm. L'organe spécifique du genre *Trichinella* appelé stichosome constitué d'une rangée de stichocytes est présent à ce stade.

multiplient pour former le stichosome. La formation de la cellule nourricière est supposée être induite par des protéines sécrétées par le parasite (non connues et non caractérisées à ce jour) (Figure 6). Plusieurs de ces protéines sont sécrétées dans le cytoplasme de la cellule nourricière (Despommier, 1998), et certaines seraient impliquées dans le développement des L1M, mais aucun facteur n'a été caractérisé avec certitude jusqu'à ce jour.

La formation de la cellule nourricière est caractérisée par une suite graduelle de réarrangements permettant la croissance du parasite ainsi que sa nutrition. Les noyaux cellulaires sont élargis et leur nombre est réduit (Despommier et al., 1991). Une surexpression des ARNm du collagène de type IV et VI est observée, la synthèse de collagène étant impliquée dans l'élaboration de la capsule (Polvere et al., 1997). Durant cette phase, les L1NN vont grandir, en même temps que la cellule musculaire deviendra cellule nourricière, pour atteindre une longueur de 252 à 705µm et un diamètre de 24 à 29µm à 17 jours post-infestation, qui est le moment où les larves résistent à la digestion gastrique et deviennent ainsi infestantes pour un hôte (Khan, 1966). L'évolution de la cellule nourricière est permanente, entraînant un épaississement progressif de la capsule qui va mesurer plusieurs microns d'épaisseur en quelques mois. Les cellules infectées entrent ensuite dans un processus lent de dégénérescence et de calcification qui peut durer des années mais qui peut être accéléré si une réponse immunitaire se développe. Lors de biopsie de patients, des larves vivantes ont été obtenues près de 10 ans post-infestation (Dupouy-Camet et al., 2001).

2.5 La trichinellose humaine

Le parasite *Trichinella* génère la trichinellose qui est une helminthiase cosmopolite. Les mammifères monogastriques, les oiseaux et les reptiles peuvent être contaminés. Cette parasitose est une zoonose ; elle est asymptomatique chez les animaux mais symptomatique chez l'Homme, chez qui elle provoque des symptômes peu spécifiques.

Les infections humaines sont les plus courantes chez les peuples où les cultures alimentaires incluent la consommation de viande crue ou insuffisamment cuite. La trichinellose peut être une maladie humaine grave, en particulier chez les personnes âgées, chez qui des complications telles que la myocardite ou l'encéphalite peuvent entraîner la mort (Dupouy-Camet et al., 2010). Le diagnostic de la trichinellose humaine est basé sur un ensemble de signes cliniques et biologiques associés aux caractéristiques épidémiologiques. Les signes cliniques de la trichinellose humaine sont directement liés au parcours du parasite dans l'organisme, et sont dépendants de la dose infestante (Pozio et al., 2003).

Ces signes cliniques sont dans un premier temps des douleurs intestinales, dues à la présence de larves adultes dans le tube digestif et dans l'épithélium intestinal qui altèrent les muqueuses (Krivokapich et al., 2012; Pozio and Zarlenga, 2013). Les signes cliniques de cette phase dépendent de la dose

infestante et cette phase est souvent silencieuse ou confondue avec une gastro-entérite (de J+2 à J+30 post-infection). Dans un deuxième temps, l'œdème du visage, les myalgies, et l'hyperthermie constituent la triade de symptômes caractéristiques de la trichinellose. L'œdème de la face est causé par la migration des L1NN *via* le système sanguin et lymphatique. Les myalgies sont dues à la pénétration des L1NN dans les muscles striés squelettiques (symptômes à partir de J+15 post-infestation). L'intense fièvre est induite par la libération de facteurs pro-inflammatoires provoquée par la présence des L1NN dans la circulation sanguine.

L'invasion du diaphragme et des muscles intercostaux peut entraîner des dyspnées. Lors d'infestation massive (plusieurs dizaines de milliers de L1M ingérées en une seule fois), des embolies cérébrales peuvent survenir en raison de l'occlusion des petits capillaires par les L1NN (Soulé, C. et al., 1991b).

La phase de convalescence commence 5 à 6 semaines après l'infestation. Des manifestations douloureuses persistantes après un délai de plusieurs mois post-infestation sont observées en cas de trichinellose chronique. Elle peut se manifester chez l'Homme par des épisodes de myosite durant plusieurs années.

2.5.1 Le diagnostic clinique

Le diagnostic clinique de cette maladie repose sur la triade des symptômes (œdème de la face, myalgies et fièvre) qui sont proches de ceux induits par une grippe ou par certaines parasitoses comme la distomatose (Bruschi et al., 2002).

Le diagnostic chez l'Homme demeure délicat, principalement dans les régions de faible endémicité, et requiert un interrogatoire précis du malade, des examens complémentaires et si possible la mise en évidence d'anticorps spécifiques de *Trichinella*. L'interrogatoire des patients permet toujours de révéler une tendance à la consommation de viande peu cuite d'espèces de mammifères (cheval, ours, sanglier, porc, etc.) particulièrement réceptives à *Trichinella*.

2.5.2 Le diagnostic biologique

L'analyse de la formule sanguine avec une forte éosinophilie (60%) et une élévation des enzymes circulantes musculaires (créatine phosphokinase CPK, lacticodéshydrogénase LDH) sont de bons indicateurs. Le diagnostic de certitude de la trichinellose inclut, selon les possibilités, le diagnostic parasitologique, le sérodiagnostic et l'identification par PCR.

• Le diagnostic parasitologique consiste à visualiser les larves de *Trichinella* spp. Cet examen est réalisé à partir d'une biopsie et demeure exceptionnel étant donné le caractère invasif de la biopsie. Il est fondé sur une digestion artificielle adaptée ou sur un examen microscopique après écrasement pour visualiser les larves.
• Les tests sérologiques indirects sont nombreux et font appel à la technique ELISA, à l'immunofluorescence indirecte ou à la technique d'immunoempreinte (Western Blot). L'immunodiagnostic est basé sur la détection d'IgG spécifiques qui apparaissent dès le 10-20^{ième} jour post-infestation mais la réponse sérologique n'est clairement positive qu'un mois après l'infestation. Cependant, le titre en anticorps est très variable en fonction des individus, de la charge parasitaire et de l'espèces infestante (Bruschi *et al.*, 1990; Pozio *et al.*, 1993). De très nombreux tests ont été décrits mais les systèmes les plus performants demeurent l'ELISA basé sur l'utilisation des antigènes d'excrétion/sécrétion (Ag E/S) et le Western blot pratiqué avec de l'antigène total. Le résultat du test ELISA peut être positif dès la deuxième semaine post- infestation chez l'Homme, mais généralement les réactions sérologiques ne sont clairement positives qu'un mois après l'infestation (Gamble et al., 2004; Gómez-Morales et al., 2008). Et la technique de Western Blot est généralement utilisée comme test de confirmation (Yera et al., 2003).

• Le diagnostic par PCR permet d'identifier sans équivoque l'espèce de parasite isolée. Le système le plus simple et le plus sensible décrit, est la méthode de PCR multiplex (Zarlenga et al., 1999) qui permet d'identifier l'espèce à partir d'une seule larve. Cependant cette technique nécessite la récupération de larves, soit par biopsie du patient (exceptionnel), soit lors de l'enquête par les services sanitaires vétérinaires permettant d'identifier la source de contamination.

2.5.3 Le traitement

Seul un traitement à base d'anthelminthiques (médicaments permettant l'inhibition ou la mort des parasites helminthes dont les nématodes, cestodes, trématodes) peut permettre de lutter contre les vers adultes présents dans l'intestin au début de l'infection. Sachant qu'il est très rare de pouvoir détecter spécifiquement la trichinellose dans les premiers jours, ce traitement n'a qu'une efficacité partielle. L'élimination des larves L1M au niveau du muscle du patient n'est pas possible ; le parasite reste en latence dans la fibre musculaire sans que le système immunitaire ne puisse détruire cet agent pathogène.

2.6 Le complexe parasite / cellule nourricière

Trichinella possède un tropisme cellulaire fort. Le stade Adulte se développe et se reproduit dans les entérocytes de l'intestin grêle et les larves L1NN colonisent spécifiquement les fibres musculaires striées. Au niveau de la fibre musculaire striée, celle-ci subit une dédifférenciation en cellule nourricière en perdant ses fonctions spécifiques associées (morphologique et biochimique).

La formation de ce complexe permet au parasite d'échapper au système immunitaire de son hôte. La structure cellulaire remodelée forme une niche protectrice. Le complexe parasite-cellule nourricière assure alors, selon l'espèce, une plus ou moins longue survie des larves de *Trichinella* : résistance à la

Stade	Groupe de protéine / Nom d'antigène	Masse moléculaire	Caractéristiques	Références
Ad	411	25 kDa	Immunodiagnostic	(Boireau P et al., 2007)
Ad	E/S	18, 40 et 50 kDa	Protéase à sérine	(Todorova and Stoyanov, 2000)
Ad	E/S	16-95 kDa	Immunodiagnostic	(Hassanain et al., 2004)
Ad	Ts87	40 kDa	Immunodiagnostic et protection	(Zhu et al., 2003); (Yang et al., 2013)
Ad/L1NN /L1M	Extrait total	HSP70	Localisation nucléaire	(Vayssier et al., 1999)
L1NN	NBL1	40 kDa	Immunodiagnostic, Protéase à sérine	(Boireau P et al., 2007)
L1NN/L1M 18 jours	Extrait total	42 kDa	Inhibiteur de protéase à sérine	(Nagano et al., 2001)
Ad / L1M	Ts14-3-3	ND	Immunodominant et protection	(Yang et al., 2016a)
Ad / L1M	rts-ES-1	20 kDa	Immunodominant et protection	(Bi et al., 2015)
Ad / L1M	L20hTs3	13,1 kDa	Immunodiagnostic	(Zocevic et al., 2014)
L1M	Ts-PMY	97 kDa	Antigène protecteur	(Yang et al., 2010)
L1M	Ts21	63,5 kDa	Immunodiagnostic	(Wang et al., 2009)
L1M	TSL-1	40-70 kDa	Immunodiagnostic et protection	(Ortega-Pierres et al., 1996)
L1M	Gp53 (TSL-1)	53 kDa	immunodominants	(Perteguer et al., 2004; Zarlenga and Gamble, 1990)
L1M	Groupes 1 à 11	Plusieurs protéines	Epitopes linéaires et conformationnels	(Boireau et al., 1997)
L1M	E/S	Plusieurs protéines	Immunodiagnostic	(Zhu and Bell, 1990)
L1M	E/S	TspE1 : 40-50 kDa TspM6 : 45 kDa	Antigène protecteur	(Arasu et al., 1994)
L1M	E/S	20-86 kDa	HSPs	(Ko and Fan, 1996)
L1M	E/S	Plusieurs protéines	Protéases à sérine	(Moczon and Wranicz, 1999)
L1M	Antigènes nucléaires	79, 86, et 97 kDa	Régulation du phénotype de la cellule musculaire	(Yao and Jasmer, 1998)
CM-L1M	Tsmyd-1	35 kDa	Maintien de la cellule musculaire	(Connolly et al., 1996)
CM-L1M	E/S	49 kDa	Rôle possible dans la formation et le maintien de la cellule nourricière	(Su et al., 1991; Vassilatis et al., 1992)

Tableau 2 : Principaux antigènes identifiés chez T.spiralis

Ad : adulte ; L1M : Larve 1 musculaire ; L1NN : Larves 1 Nouveau-Nées ; CM : cellule musculaire ; E/S : Excrétion/Sécrétion.

congélation, à la putréfaction, ou à d'autres procédés. La cellule hôte n'est pas tuée, ce qui est plutôt inhabituel dans le monde des parasites. Le processus de formation de la cellule nourricière n'est pas une réponse de l'hôte vis-à-vis de l'invasion parasitaire mais un remaniement actif et programmé induit par *Trichinella* (Despommier, 1998), reposant sur l'établissement d'un dialogue moléculaire entre les deux protagonistes : c'est le concept de parakines (Despommier, 1990). Les relations hôte-parasite sont rendues complexes car *Trichinella* a développé des mécanismes lui permettant d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (Bruschi et al., 2002).

3. Les protéines et antigènes spécifiques de Trichinella

Les relations entre l'hôte infesté et *Trichinella* sont complexes en raison des localisations diverses du parasite dans l'organisme et des changements de stades successifs à l'intérieur de ce même organisme. D'une façon générale, il existe des communautés antigéniques entre les différentes populations mais aussi des fractions spécifiques d'espèce ou de stade. Les antigènes de *Trichinella* peuvent être définis en fonction du stade parasitaire et en fonction d'anticorps monoclonaux (AcM) reconnaissant les déterminants antigéniques correspondants.

Des études sérologiques réalisées sur plusieurs espèces animales infestées par différentes espèces de *Trichinella* ont montré qu'il existe trois principaux stades antigéniques importants correspondant aux trois étapes principales de développement du parasite : le stade Adulte, le stade L1NN et le stade L1M (Gamble, 1985; Marti et al., 1987). Une liste non exhaustive des antigènes identifiés chez *T. spiralis* est présentée dans le Tableau 2.

Les antigènes L1M proviennent principalement des stichocytes. Ces antigènes ont été classés en huit groupes (TSL-1 à TSL-8) sur la base de leur reconnaissance par les différents anticorps monoclonaux et des anticorps polyclonaux : TSL1 (45-100 kDa sous forme native), TSL-2 (45 kDa sous forme native), TSL-3 (45 kDa sous forme native), TLS4 (35 et 45kDa sous la forme native), TSL-5 (35 kDa sous la forme native), TSL-6 (17 kDa sous la forme native) TSL-7 (32 et 45 kDa sous la forme native) et TSL-8 (43 kDa sous la forme native). Le groupe TSL-1 correspond aux antigènes les plus abondants dans les produits d'excrétion/sécrétion, dits antigènes E/S (Ortega-Pierres et al., 1996) et ont la particularité d'être glycosylés et de porter le β -tyvelose (Ellis et al., 1997). Une étude d'mmunocytolocalisation utilisant des anticorps polyclonaux et monoclonaux contre les antigènes E/S a montré qu'ils sont distribués dans les noyaux hypertrophiques, le cytoplasme des cellules nourricières parasitées, les stichocytes, la surface de la cuticule, la lumière de l'œsophage et dans le lumen de l'intestin des larves (Lee et al., 1991). Le stade L1M expose un certain nombre d'épitopes au cours de la réaction inflammatoire ou lors de la dédifférenciation de la cellule musculaire.



Figure 7 : Mécanisme général d'action de l'ARN à interférence

L'ARNdb (ARN double-brin) est clivé en siRNA (*small interference RNA*) par une ribonucléase de la famille III, DICER. Une fois clivés, les siRNA ou les miRNA (micro-ARN) vont être pris en charge par le complexe protéique RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) composé entre autres de la protéine ARGONAUTE qui va fixer et dénaturer les siRNA ou les miRNA. Le siRNA ou le miRNA simple brin va alors reconnaître son ARNm complémentaire et permettre le clivage de cet ARNm.

Les antigènes adultes proviennent des granules β et δ de sécrétion des stichocytes et des organes internes (Choy et al., 1991; Sanmartín et al., 1991). Certains d'entre eux portent un épitope phosphorylcholine contrairement aux antigènes exprimés plus tardivement (Takahashi, 1997; Takahashi et al., 1993).

Les antigènes L1NN se caractérisent par leur fugacité. Le rôle de ces antigènes dans l'immunogénicité du stade L1NN est probablement important. En effet, des essais de vaccination du porc avec des larves L1NN ont apporté des résultats intéressants comparés aux résultats obtenus avec des extraits de larves L1M (Marti et al., 1987). Récemment, la protéine NBL1, spécifique du stade L1NN, a été identifiée et a démontré un potentiel antigénique élevé permettant son utilisation pour le dépistage précoce de la trichinellose chez le porc (Boireau P et al., 2007).

4. Le mécanisme de l'interférence par ARN

4.1 Le principe

L'existence du mécanisme d'interférence par ARN a été découvert de façon inattendue en 1990 par Jorgensen et ses collaborateurs (Napoli et al., 1990) en tentant de renforcer la couleur pourpre des Pétunia par l'introduction d'un vecteur codant pour un pigment de cette plante. En 1994, Wassenegger (Wassenegger et al., 1994) montre que l'introduction d'ARN double brin dans des cellules d'*Arabidopsis thaliana* déclenche une méthylation de l'ADN correspondant. En 1998, Andrew Z. Fire et Craig C.Mello ont montré que l'on pouvait réduire spécifiquement l'expression de gènes dans des cellules du nématode *Caenorhabditis elegans*, en introduisant de l'ARN double brin dans celles-ci (Andrew Z. Fire and Craig C.Mello, 2006). Ce phénomène fut alors nommé « interférence par ARN ». Ces 2 chercheurs ont obtenu le prix Nobel de physiologie et de médecine en 2006 pour cette avancée technologique dans la compréhension des mécanismes de la régulation de l'expression des gènes chez *Caenorhabditis elegans*.

L'interférence par ARN (RNAi) est un mécanisme de génétique inversée mis en place grâce à des mécanismes cellulaires communs à la plupart des eucaryotes (Liu and Paroo, 2010). Il existe deux formes principales d'interférence ; l'une et l'autre font intervenir des ARN intraduisibles en protéines, appelés dans un cas les petits ARN interférents (siRNA) et dans l'autre les micro-ARN (miARN). Les siRNA (*short interfering RNA*) sont des ARNs bicaténaires de 21 à 22 nucléotides de long, provenant de la dégradation de dsARN (*double-stranded RNA*). Ils rendent les gènes silencieux en favorisant la dégradation des ARNm auxquels ils se lient spécifiquement. Ce mécanisme serait un moyen de défense contre les virus. Les miARNs sont des ARNs de 19 à 25 nucléotides, monocaténaires, codés par le génome (souvent conservés au cours de l'évolution) et provenant d'un repliement en épingle à cheveux de l'ARNm de la cellule. Ils interviennent dans la régulation des gènes des organismes et bloquent l'expression des gènes lors de la synthèse protéique.

Le principe d'action des siRNA et des miRNA commence par la prise en charge de ces ARN doubles brins par une ribonucléase de type III appelée Dicer, l'« éminceuse ». Celle-ci clive l'ARN double brin. Dicer transfère alors les petits ARN à un gros complexe multi-protéique, le complexe RISC (RNA-induced silencing complex). Un des brins, dit « passager » ou « sens », est éliminé, tandis que l'autre appelé « guide » ou « anti-sens » dirige le complexe RISC vers les ARNm possédant une séquence complémentaire au brin guide. Dans le cas des siRNA, si la complémentarité est parfaite, le complexe RISC clive l'ARNm cible qui est alors dégradé et n'est donc plus traduit en protéine. Pour les miRNA, la complémentarité est partielle et l'ARNm n'est pas détruit, il y a uniquement inhibition de la synthèse des protéines.

4.2 Etat des lieux de la machinerie du RNAi chez Trichinella spiralis

Une étude a été réalisée sur la similarité de séquences primaires orthologues des 77 protéines de *C. elegans* impliquées dans le mécanisme du RNAi chez 13 espèces de nématodes dont *T. spiralis* (Dalzell et al., 2011). Il en résulte que 22 protéines sont homologues entre *C. elegans* et *T. spiralis*. Ce faible nombre de protéines homologues est néanmoins à considérer avec précaution car cela peut être dû à i) un pourcentage d'identité trop faible pour être considérées homologues ; ii) des données incomplètes, après séquençage, du génome au niveau du gène cible. Au niveau de la biosynthèse des siRNA chez *Trichinella*, l'enzyme nommée Dicer a été retrouvée ; plus précisément elle est nommée DCR-1 (Dicer -1) et est liée à 2 hélicases d'ARN (DRH-1 et 3 (dicer-related helicases)). Cette protéine Dicer permet ainsi d'obtenir des fragments d'ARN de 19 à 25 paires de bases à partir d'ARN double brin ou de micro-ARN. Au niveau du complexe protéine RISC (RNA-induced silencing complex) chez *Trichinella*, il a été montré l'existence de la protéine tsn-1 (Tudor staphylococcique nucléase) liée à une protéine Argnotes nommée alg-1, 2, 4 (Argonaute[Plant]-Like Gene) ou ergo-1 (Endogenous Rnai deficient arGOnaute). Ce complexe protéique a un rôle essentiel puisqu'il permet la dissociation des deux brins d'ARN et le guidage vers l'ARNm complémentaire du gène ciblé (Dalzell et al., 2011).

Une particularité de la protéine Dicer a été montrée chez *T. spiralis* ; les 2 sous familles Dicer-1 et Dicer-2 sont présentes chez ce nématode alors que la plupart des nématodes ne possèdent que Dicer -1. Cette particularité d'avoir les 2 sous familles est retrouvée chez les plathelminthes et les insectes (Gao et al., 2014) et permettrait à *Trichinella* de réguler l'expression de ses gènes aussi bien par des siRNA que des miRNA.

T. spiralis est un bon modèle expérimental pour mettre en place la technique d'ARNi puisque les différents complexes et facteurs constituant la machinerie endogène de cette technique existent. De plus, un système de régulation endogène est mis en place par le parasite pour réguler ses propres gènes.

4.3 Etude bibliographique chez Trichinella spiralis

A l'heure actuelle, 3 articles ont montré des résultats encourageants lors de l'utilisation d'un siRNA et d'un dsRNA spécifique d'un gène cible chez *T. spiralis*. Un premier en 2012, présente l'extinction du gène de la Paramyosine aux stades L1M et Adultes (Chen et al., 2012) ; et 2 autres ont suivi en 2015 et 2016, concernant l'extinction du gène de la Nudix hydrolase, également chez les larves L1M par un siRNA ou dsRNA (Wang et al., 2015; Zhang et al., 2016). Dans ces différents articles, les techniques d'ingestion naturelles par « trempage » ou d'électroporation ont été testées pour introduire un siRNA ou un dsRNA ; ces deux techniques n'ont pas montré de différences significatives.

Les fonctions de la Paramyosine chez *T. spiralis* pour la viabilité et le développement ont été mises en évidence par la technique du RNAi; les résultats ont montré une réduction significative de son expression tant au niveau transcriptomique que protéique.

Suite à la transfection du siRNA ou dsRNA spécifique de la Paramyosine dans le nématode par électroporation, une diminution de 66,4% et 60,4% a été observée respectivement du niveau des ARNm et de 52,0% et 64,7% respectivement du niveau des protéines. L'infectiosité des larves L1M traitées au siRNA et inoculées à des souris saines a mis en évidence une diminution de 23,2% des L1M au niveau des cellules musculaires et de 37,6% au niveau des adultes dans les intestins.

L'étude de la fonction de la Nudix hydrolase de *T.spiralis* a également été réalisée par la technique d'ARNi. En utilisant des siRNA, cette étude a montré une diminution du niveau des ARNm et de la protéine de 73,3% et 76,7%, respectivement, après une électroporation pendant 1 jour. L'infectiosité des larves L1M traitées au siRNA par électroporation et inoculées à des souris saines a mis en évidence une diminution de 68,8% des L1M au niveau des cellules musculaires et de 63,6% au niveau des adultes dans les intestins. D'autre part, en testant la technique de « trempage » avec des dsRNA spécifiques du gène, une diminution de 65,8% des ARNm et de 56,4% de la protéine a été mise en évidence. Quant à la diminution de la charge parasitaire suite à l'extinction du gène par un dsARN, celle-ci a été de 49,9% (par incubation) et 83,4% (par électroporation) au niveau des adultes retrouvés dans les intestins, et de 39,9% (par incubation) et 69,5% (par électroporation) au niveau des larves retrouvées dans les muscles.

	<u>SS2</u>	<u>SS2-1</u>
Date de publication	07 Mars 2001	22 décembre 2003
N° d'accession dans GenBank	AF331160	AY491941
Nombre de paires de base	1609	1600
Nombre d'acides aminés	465	430
Poids moléculaire	50,99 kDa	46,89 kDa
Point isoélectrique	9,56	9,46
Analyse de la partie N terminale	Présence de 2 domaines transmembranaires (15-33 et 40-58)	Présence d'un peptide signal (1-28)
Analyse de la partie C terminale	Pas de différence	Pas de différence

Tableau 3 : Analyse des différences entre les deux isoformes de NBL1



Figure 8 : Alignement des séquences protéiques des 2 isoformes de NBL1

5. Objectifs et stratégie de recherche

5.1 Objectif général

L'objectif est de développer de nouvelles stratégies de lutte contre le parasite *Trichinella* afin d'améliorer les outils actuels de détection du parasite et de limiter la contamination humaine. Certaines protéines peuvent s'avérer utiles pour le développement d'outils de lutte complémentaires à ceux liés à la détection sérologique, comme par exemple la vaccinologie. Pour cela, des cibles diagnostiques et/ou vaccinales de différents stades parasitaires de *Trichinella* sont en cours d'identification.

5.2 Contexte du travail

L'équipe s'intéresse particulièrement aux protéines spécifiques des stades Adultes à L1NN qui sont indispensables au cycle de *Trichinella* et sont la cible du système immunitaire de l'hôte par leur passage dans le système sanguin et lymphatique. Ces protéines sont impliquées dans la migration des L1NN de l'épithélium intestinal vers la fibre musculaire striée squelettique, dans l'installation des L1NN dans leur cellule hôte et pourraient être des facteurs parasitaires impliqués dans les mécanismes de dé-différenciation de la cellule musculaire en cellule nourricière.

Parmi les protéines candidates, notre laboratoire en a identifié une nommée NBL1. Cette protéine est la première décrite dans le genre Trichinella comme étant spécifique du stade L1NN (Liu et al., 2007) et permettant une détection précoce (J+15) lors d'infestation chez le porc principalement (Boireau et al 2007). Outre l'intérêt que cette protéine représente pour l'amélioration des tests de sérodiagnostic précoce des trichinelloses porcines (Boireau P et al., 2007), NBL1 s'avère également être une cible de choix pour le développement de vaccins anti-Trichinella. Des études vaccinales, conduites dans notre laboratoire, ont en effet mis en évidence qu'un vaccin prototype constitué de cette protéine confère à elle seule une protection de l'ordre de 72% chez le porc (Vallée I et al., 2012). En tant que protéase, NBL1 jouerait un rôle dans la migration du parasite en favorisant le franchissement de la mugueuse intestinale et donc la migration à travers les tissus. Par ailleurs, NBL1 étant une protéase à sérine, son implication dans la migration intra-tissulaire est suspectée de par sa fonction de clivage des protéines ou des peptides en hydrolysant leurs liaisons peptiques. Cela expliquerait l'éventuelle implication de la protéine NBL1 lors de l'installation de Trichinella dans le muscle strié squelettique, d'une part en permettant la pénétration du parasite dans la fibre musculaire, mais aussi en participant au détournement de sa fonction musculaire au profit de la formation de la cellule nourricière (collaboration avec le Pr Liu Mingyan, Université de Jilin, Chine). Il est à noter que les protéases à sérine sont normalement synthétisées sous forme de zymogènes inactifs puis clivées dans la partie N-terminale pour être actives (Nagano et al., 2003).

Deux isoformes de NBL1 existent, les différences sont décrites dans le Tableau 3 et la Figure 8 cidessous. Au niveau nucléotidique, la seule différence entre ces deux isoformes se situe au niveau de lapartie N-terminale (https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/). Pour l'isoforme NBL1-SS2, la présence de 2 domaines transmembranaires (analyses *in silico*) indiquerait son maintien 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. En ce qui concerne l'isoforme NBL1-SS2-1, la présence d'un peptide signal (analyses *in silico*) 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.

La partie C-terminale est commune aux deux isoformes, et un motif répété 4 fois (PSSGSRPTYP) a été mis en évidence (Yang et al., 2016b). Ce motif est encore mal connu mais une cartographie d'épitopes a permis de mettre en évidence que cette partie est immuno-dominante ; 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. Par la suite, des essais d'un vaccin prototype, formulé à partir de cette séquence répétée, a permis d'obtenir une diminution de la charge parasitaire de 72% chez le porc.

5.3 <u>Stratégie de recherche mise en œuvre</u>

Notre approche pour comprendre les fonctions de NBL1 est basée sur l'obtention du parasite *Trichinella spiralis* inactivé pour l'expression de NBL1. Il n'est pas possible à l'heure actuelle de générer des nématodes KO (knock-out) permanents pour un gène donné, en revanche, l'une des stratégies est d'obtenir des nématodes KO transitoires. Cela consiste en l'inactivation d'un gène par la technique de l'ARN à interférence (RNAi). Cette technologie est à ce jour très peu utilisée sur le nématode *Trichinella*. Cependant elle a montré son efficacité sur l'espèce *T. spiralis* avec l'extinction du gène codant pour la Paramyosine et la Nudix Hydrolase sur les stades Adultes et L1M. La stratégie de recherche est basée sur 2 grands axes :

- l'approfondissement de la caractérisation moléculaire de NBL1 au niveau génomique et de la prédiction en protéines des différentes espèces de *Trichinella*,

- et la caractérisation des fonctions de NBL1 par une étude transcriptomique de NBL1 aux différents stades parasitaires et des essais *in vivo* de l'inactivation de cette protéine chez les L1NN par un siRNA spécifique de NBL1.

II. MATERIELS ET METHODES

1. Analyses in silico

1.1 Alignement des séquences

Les oligonucléotides (=amorces) ont été dessinés et vérifiés à l'aide des logiciels :

- <u>AmplifiX</u> (AmplifX 1.7.0 by Nicolas Jullien; CNRS, Aix-Marseille Université <u>http://crn2m.univ-mrs.fr/pub/amplifx-dist</u>) grâce auquel les oligonucléotides ont été déterminés. L'absence de formation potentielle de dimères a également pu être vérifiée;
- <u>Oligo Calc</u> version 3.27 (<u>http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html</u>) permettant, pour chaque amorce, de vérifier que l'oligonucléotide ne s'auto-hybride pas, ainsi que l'absence de formation potentielle d'épingle à cheveux (repliement transitoire du brin ADN sur lui-même).

Les alignements de séquences multiples ont été réalisés à l'aide des logiciels :

- <u>BioEdit</u> version 7.1.3.0 du 11/04/2011 (Hall, 1999), permettant d'aligner différentes séquences entre elles par un alignement ClustalW mais également de façon manuelle;
- CLC Genomics Workbench version 7.0.4 permettant de schématiser les différents alignements;
- <u>Multalin</u> (<u>http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin</u>) (Corpet, 1988), permettant également de visualiser de façon générale les différents alignements effectués.

Les **analyses des séquences protéiques** ont été réalisées par le logiciel HMMER (<u>https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/</u>).

1.2 Détermination des oligonucléotides spécifiques

Les oligonucléotides utilisés ont été synthétisés par Eurofins MWG. Ils ont été livrés sous forme lyophilisée, et ont été repris dans de l'eau exempte de nucléases de façon à obtenir une concentration stock de 100 µM. Ces oligonucléotides ont ensuite été dilués à 10µM dans de l'eau exempte de nucléases et conservés à -20°C.

Les **oligonucléotides** « **GP1** » **et** « **GP10** » utilisés, avaient été préalablement définis dans la thèse de Baoquan FU (FU Baoquan, 2005); ces oligonucléotides avaient été utilisés pour confirmer le bon clonage de l'ADNc codant pour la protéine NBL1 par PCR.

Les autres oligonucléotides utilisés ont été sélectionnés en fonction des critères suivants :

- avoir une longueur de 18 à 24 bases,
- contenir entre 40 et 60% de GC,
- avoir un Tm (température de demi-dénaturation) de 55 à 65°C,
- ne pas contenir de structure secondaire interne (épingles à cheveux),

Nom		Séquence nucléotidique	TM	T° hybridation
GP1	sens	5' - CAAATGTGCTTTGCTGA - 3'	47,9°C	48°C, 51°C
GP10	anti-sens	5' - CGTTCAGAGCAGTAGTGA - 3'	53,7°C	48°C, 51°C
GP1 int	sens	5' - CACACTCACATCCATGGCAGATTC - 3'	62,7°C	60°C, 62°C, 64°C
GP10 int	anti-sens	5' - TGGCATACACTCCGGGATAACCT - 3'	62,4°C	60°C, 62°C, 64°C
P2	anti-sens	5' - GGGAAAATGATCAGTTCAGTTG - 3'	56,5°C	61°C
P3	sens	5' - TTATCCGCAGCTTCGCCATCACTA - 3'	62,7°C	61°C
P4	anti-sens	5' - TGAACATAACGCACGCCTAGCA - 3'	60,3°C	61°C
P5	sens	5' - AGTTCATGAGTCCGAGGTCGAAGT - 3'	62,7°C	61°C
P6	anti-sens	5' - CCATCCGGTGACAACGCAAAT - 3'	59,8°C	59°C
P7	sens	5' - ATGTTCAGCACTGGAACCCT - 3'	57,3°C	59°C
P8	anti-sens	5' - AACCTTTTCTGGCGCATCCAGT - 3'	60,3°C	62°C
P9	sens	5' - GGTGGCCCACTGATATGCAAGAAA - 3'	62,7°C	62°C
P10	anti-sens	5' - GCGTATTCGATCGTTCCTTGCGT - 3'	62,4°C	57°C
P11	sens	5' - ATATCCGCCAGCAGTTCGTAAG - 3'	60,3°C	57°C
P5Tps	sens	5'-AGTTCATAAGTCAGACCTCGAAGT-3'	59,3°C	59°C
P1TpsIR	sens	5'-GGATATTCCATACGAACAGTAGCCA-3'	61,3°C	61°C
P2TpsIR	anti-sens	5'- GAATCCAAGCCTCGTGCATTGA -3'	59,3°C	61°C
P1TpsHK	sens	5'-GTTAGTGGTCAGAAACTGC-3'	54,5°C	55°C
P2TpsHK	anti-sens	5'-CACCGCATTCAAACGCC-3'	55,2°C	55°C

Tableau 4: Séquences nucléotidiques des amorces pour amplifier l'ADN génomique de NBL1

Tableau 5: Séquences nucléotidiques des amorces pour amplifier l'ADN complémentaire de NBL1

<u>Nom</u>		Séquence nucléotidique	<u>TM</u>	T° hybridation
NBL1 qPCR 2 F	sens	5'-CTCCATCACTAGGGGCGTTTGAA-3'	62,4°C	60°C
NBL1 qPCR 2 R	anti-sens	5'-GAATCTGCCATGGATGTGAGTGTG-3'	62,7°C	60°C
NBL1 qPCR 3 F	sens	5'-CCGCGCACTGTATAACTACTAGCAATATGTATC-3'	67,0°C	60°C
NBL1 qPCR 3 R	anti-sens	5'-GCGAAGCAACGCAATGTCGTTT-3'	60,3°C	60°C
NBL1 qPCR 3b R	anti-sens	5'-ATGTTGTGGGCACCGGTCACA-3'	61,8°C	60°C
NBL1 qPCR 4 F	sens	5'-GGGGTGATACGACTGAAAATGG-3'	60,3°C	60°C
NBL1 qPCR 4 R	anti-sens	5'-CAACCAGAATCACCTTGACAACTGTC-3'	63,2°C	60°C

Tableau 6: Séquences nucléotidiques des amorces pour amplifier les gènes de ménage

Nom		Séquence nucléotidique	<u>TM</u>	T° hybridation
Tsp_act F	sens	5'-ATCCGGTCTTGCTAACTGAAGCTC-3'	62,7°C	60°C
Tsp_act R	anti-sens	5'-CCACCGCAATCTAAAACAATGCCT-3'	61,0°C	60°C
Tsp_eif3C F	sens	5'-AACGATTAGCATCAATGTTTGACCT-3'	58,1°C	60°C
Tsp_eif3C R	anti-sens	5'-GGTCAACTGCAAAGCTAACGTG-3'	60,3°C	60°C

 ne pas avoir des zones complémentaires entre les deux oligonucléotides (en particulier dans la région 3').

Les oligonucléotides (autres que GP1 et GP10) du Tableau 4 ont été dessinés en fonction des résultats de séquençage avec les oligonucléotides GP1 et GP10 afin de reconstruire la séquence entière de l'ADN génomique des espèces *Trichinella spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi* et *T. pseudospiralis*. Les oligonucléotides sélectionnés ont été les suivants :

Les oligonucléotides spécifiques de l'ADNc codant pour la protéine NBL1 (Tableau 5) ont été dessinés en fonction des résultats d'alignement de l'ADN génomique du gène *nbl1* de *T.spiralis* et de la séquence de l'ADN complémentaire (ADNc) de NBL1 (n° d'accession de GenBank AF331160). Ces oligonucléotides ont été dessinés afin qu'ils s'hybrident uniquement avec l'ADN complémentaire et non génomique (Figure 9). Ce dessin d'oligonucléotides permet d'amplifier l'ADNc du gène uniquement, en cas de contamination de l'extraction par de l'ADN génomique.



Figure 9 : Visualisation des oligonucléotides lors de l'amplification par qPCR sur la séquence du gène de *nbl1*

Enchaînement des introns et exons (boites grises). Les oligonucléotides qPCR2 F, qPCR3 F, qPCR4 F et qPCR4 R sont dessinés en chevauchant 2 exons.

Les oligonucléotides spécifiques des gènes de ménage (Tableau **6**) ont été choisis pour cette étude en fonction de la présence d'introns dans leurs séquences génomique. Ces gènes appelés également gènes de référence ou constitutifs s'expriment dans tous les types cellulaires et assurent des fonctions indispensables à la survie des cellules. Ils ne subissent donc pas de régulation en fonction des conditions expérimentales. La présence d'introns dans les gènes de ménages choisis, permettra de visualiser une éventuelle contamination de l'ADNc par de l'ADNg. Les gènes de l'Actine (Act) et du facteur d'initiation eucaryotique de la sous unité 3C (Eucaryotic Initiation factor 3 subunit C_ eif3C) ont montré de bons résultats lors de leur utilisation en PCR en temps réel sur le parasite *C. elegans* (Zhang et al., 2012) ; et ces deux gènes sont présents chez *Trichinella spiralis* et leur séquence nucléotidique est disponible dans

 Tableau 7: Séquences nucléotidiques des sondes siRNA spécifiques du gène nbl1

<u>Nom</u>	<u>Nom de la cible</u>		Séquence nucléotidique
Nbl1-1S	siRNA1	sens	5' – GAA-AGG-AAC-UUG-UGC-AAA-U55 – 3'
NbI1-1AS	siRNA1	anti-sens	5' – AUU-UGC-ACA-AGU-UCC-UUU-C55 – 3'
Nbl2-1S	siRNA2	sens	5' – CGU-CAA-GAU-UUA-CAG-UUG-U55 – 3'
Nbl2-1AS	siRNA2	anti-sens	5' – ACA-ACU-GUA-AAU-CUU-GAC-G55 – 3'
Nbl3-1S	siRNA3	sens	5' – GUC-GAU-UUA-UCU-ACU-GCA-U55 – 3'
Nbl3-1AS	siRNA3	anti-sens	5' – AUG-CAG-UAG-AUA-AAU-GGA-C55 – 3'

GenBank (n° accession de l'actine 3 :XM_003368833 et n° d'accession de l'eif3C :XM_003369653). Les oligonucléotides ont été dessinés de façon à avoir le couple d'oligonucléotides sur 2 exons différents. Cela permettra de confirmer l'absence d'ADN génomique par la taille de l'amplicon.

1.3 Détermination des sondes siRNA spécifiques du gène nbl1

Les sondes siRNA utilisées ont été dessinées et synthétisées par la société Eurogentec (France). Pour cela, la séquence de NBL1 (n° accession GaneBank : AF331160.1) nommée NBL1-SS2 leur a été fournie. Plusieurs critères ont permis de déterminer les bons candidats pour une expérimentation : une extrémité plus riche en G-C (trois liaisons covalentes) et l'autre en A-T (deux liaisons covalentes), un pourcentage de G et de C inférieur à 50%, et éviter l'effet « off target » (= non ciblé, ce qui signifie éviter que les brins d'ARN ne se fixent à un autre gène que celui ciblé). Ces critères ont pu mettre en évidence 3 candidats potentiels :

- GAAAGGAACTTGTGCAAAT, nommé siRNA1 et localisé entre les bases 824 et 842 ;
- CGTCAAGATTTACAGTTGT, nommé siRNA2 et localisé entre les bases 520 et 538 ;
- GTCGATTTATCTACTGCAT, nommé siRNA3 et localisé entre les bases 520 et 538.

Comme un ARN monobrin artificiel ne serait pas reconnu par la cellule et serait détruit par ses endonucléases, les siRNA sont synthétisés en double brin selon les séquences indiquées dans le Tableau 7. Les siRNA ont été réceptionnés sous forme lyophilisée et ont été repris avec le tampon fourni (50mM Tris-HCl pH 7.6, 100mM NaCl) de façon à obtenir une concentration stock de 100µM. Ces siRNA sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

2. Modèle souris et mode d'administration des parasites

2.1 Le modèle murin

Les expérimentations animales ont été faites sur des souris OF1 femelles (Charles River, L'Arbresle, France) âgées d'au moins 6 semaines et ayant été au minimum 1 semaine en acclimatation dans l'animalerie. Les expérimentations sont soumises et validées au comité d'éthique de l'Anses (ComEth Enva, Anses, Upec). Les souris sont élevées en niveau de confinement A2, en portoirs ventilés, avec de la sciure mélangée avec des copeaux et avec un enrichissement de leur environnement ; cet enrichissement est composé d'un igloo (Plexx, ref : 13100) et d'un balcon (Tecniplast, ref : mouse balcony). La température de leur environnement est comprise entre 20°C et 24°C. Les souris sont hébergées par cages de 5 souris (Tecniplast, ref : GM500). Leur nourriture est sous forme de petits bouchons non stériles et un biberon d'eau du robinet est à leur disposition.



Figure 10: Schéma de l'infestation des souris per os



Figure 11: Schéma de la préparation des seringues pour des injections par voie intraveineuse

2.2 Infestation par voie orale

L'infestation des larves L1M se fait uniquement par voie orale. Dans un premier temps, 20µl d'une solution de 15 L1M/µl sont prélevés à l'aide d'une micropipette et d'un cône à usage unique. Et dans un second temps, la souris subit une contention afin de maintenir son dos et sa tête en arrière dans une seule main ; avec l'autre main libre, la souris est gavée. Une fois la solution injectée au niveau de la bouche, la souris est maintenue par la queue pendant 2 secondes au-dessus d'un papier absorbant. Puis elle est remise dans sa cage (Figure 10).

2.3 Infestation des souris par intraveineuse

L'infestation des larves L1NN se fait uniquement par voie intraveineuse au niveau de la queue. Dans un premier temps, les seringues contenant les L1NN sont préparées au laboratoire. Pour cela, un nombre déterminé de L1NN est récupéré à l'aide d'une micropipette dans un volume de 50µl. Ces 50µl sont déposés dans la seringue à insuline, comportant une aiguille de 29G x 13mm (Myjector, VWR, ref : 613-4897), après avoir enlevé le piston. Le piston est remis dans la seringue, et celle-ci est mise avec l'aiguille vers le haut afin que les larves L1NN se déposent au niveau du piston et le piston est remonté en chassant les bulles d'air jusqu'au ras de l'aiguille. Après 30 minutes, le piston est poussé de sorte à faire perler une goutte ne contenant donc aucune larve. L'aiguille est pour finir mise la tête en bas pendant 30 minutes afin que les L1NN se retrouvent au niveau de la sortie de l'aiguille (Figure 11).

Dans un deuxième temps, les souris sont inoculées à l'animalerie. L'injection intraveineuse s'effectue au niveau de la veine caudale gauche ou droite. La souris est placée dans une boîte à contention (Intellibio Innovation, réf : BC/A-S). Celle-ci est préalablement placée sous une lampe infrarouge (Centravet, Réf : LAM703 ; ampoule réf : AMP031) pendant 5 minutes afin de dilater les veines et faciliter l'injection. L'injection s'effectue en plaçant l'aiguille dans un angle de 30°, biseau vers le haut, puis parallèlement à la queue une fois la peau transpercée afin d'atteindre la veine. Cinquante microlitres sont injectés et l'aiguille est retirée. Si l'intraveineuse est bien réussie, un retour de sang au niveau du point d'injection est observé, et un papier absorbant est mis en appuyant fermement afin d'arrêter le saignement par compression.

3. Entretien des souches de Trichinella

Le cycle de *Trichinella* sp. est entretenu sur des souris OF1 femelles (ce parasite ne peut être entretenu vivant que sur animaux vivants), infectées oralement par gavage (voir paragraphe 2.2) avec 300 L1M ou 500 L1M (respectivement souches encapsulées et souches « non encapsulées ») et euthanasiées au minimum 6 semaines plus tard. Cette euthanasie est effectuée en introduisant lentement



Figure 12: Schéma de la digestion artificielle

les 30L de gaz carbonique dans une chambre hermétique (Genestil, ref : chariot euthanasie O_2 - CO_2) pendant 4 minutes ; puis la vanne est fermée et la chambre est laissée fermée 1 minute afin que le gaz se dissolve. Les L1M présentes dans les muscles des souris sont immédiatement récupérées par digestion artificielle chloro-pepsique (voir paragraphe 4.1) afin de pouvoir réinfecter de nouvelles souris saines avec la souche vivante de *Trichinella* sp. Les souches utilisées lors des différentes expérimentations sont :

- T. spiralis ISS 004 isolée en 1950 sur un sanglier originaire du Maryland, Etats-Unis ;
- T. nativa ISS 042 isolée en 1985 sur un ours originaire l'Alaska, Etats-Unis ;
- T. britovi ISS 235 isolée en 1992 sur un sanglier originaire d'Italie ;
- T. pseudospiralis ISS13 isolée en 1972 sur un raton laveur originaire de la Russie.

4. <u>Récupération et mise en culture des différents stades parasitaires de</u> <u>*Trichinella spiralis*</u>

4.1 Stade « Larves 1 Musculaires » (L1M)

Les larves L1M de *T. spiralis* ont été obtenues par digestion artificielle des carcasses de souris, infestées avec 300 L1M depuis au moins 6 semaines, selon la méthode décrite dans le chapitre 1 de l'annexe 1 du règlement européen n°2015/1375 du 10 Août 2015 (2015).

Après broyage (Grindomix GM 200, Restsh, Haan, Allemagne. 3 sec, 6000 tr/min), les carcasses ont subi une digestion enzymatique par la pepsine (19 800 unités pharmacopée européenne, Panréac AppliChem, ref : 176408.1214) en milieu acide (0,06 M HCl 25%, Acros Organics, ref : 387800010), pendant 30 min à +45°C (+/- 1°C). Cette réaction est réalisée, pour une masse de 100 g de souris, sous 2 L d'eau du robinet en ajoutant 30ml de pepsine liquide à 660U Ph. Eur/ml et 16 ml d'acide chlorhydrique (HCl) à 25%. Le liquide de digestion obtenu a été filtré sur tamis (maille 180 µm) et décanté dans une ampoule conique en pyrex. Un éluât de 50 mL a été récupéré et laissé à décanter dans une éprouvette pendant 10 minutes. Après un lavage des larves à l'eau, le surnageant a été soigneusement aspiré de manière à garder 10 mL de sédiments contenant les larves. Les larves ont ensuite été dénombrées à l'aide d'une loupe binoculaire (grossissement X20), (Wild Heerbrugg M8, Gais, Suisse) dans une boîte de Pétri quadrillée (Figure 12).

4.2 Stade « Adultes » (Ad)

Pour la récupération des stades Adultes, 10 souris ont été infestées *per os* à raison de 1500 L1M de *T. spiralis* dans un volume de 20µl d'eau et euthanasiées 5 jours après l'infestation. Les souris ont été mises à jeuner 24h avant l'euthanasie : elles ont été placées sur des grilles afin qu'elles ne soient pas en contact avec la litière et leurs excréments car elles sont coprophages.



Figure 13: Schéma de la récupération des adultes à partir des intestins de souris

Après euthanasie des souris à 5 jours post-infestation, l'intestin grêle a été prélevé et déposé dans une boîte de Pétri contenant du PBS 1X (Gibco, ref : 18912-014) préchauffé à +37°C et supplémenté avec 2% de pénicilline 10000 UI/ml / streptomycine 10000 µg/ml (P/S) (Thermo, ref : 11556461). L'intestin grêle a ensuite été ouvert sur toute sa longueur et lavé de son contenu du PBS 1 X supplémenté de P/S. Puis, l'intestin grêle a été découpé en segments de 4 à 5 cm, déposés sur un tamis (mailles de 315 µm) lui-même placé dans un cristallisoir contenant le PBS supplémenté de P/S. Le milieu de lavage des intestins ne contenant pas de morceaux de cet organe a été placé dans un second cristallisoir contenant un tamis de plus petites mailles (200 µm). Les deux cristallisoirs ont alors été incubés à +37°C pendant 1h30 en présence de 5% de CO₂. Chaque milieu a ensuite été filtré sur deux compresses de gaze (10x10cm / 16plis / 17 fils, Raffins, ref : 010118) et laissé à décanter dans une ampoule conique pendant 30 min. Le culot formé au fond de l'ampoule a été récupéré dans un tube conique de 50 ml et laissé décanter pendant 10 min à +37°C. Le culot (mâles et femelles confondus) a été repris dans 10ml de PBS supplémenté de P/S. Puis, celui-ci a été transféré dans un tube conique de 15 ml et laissé décanter une nouvelle fois pendant 10 min. Après plusieurs lavages avec le PBS supplémenté en P/S, les larves adultes J5 (AdJ5) ainsi récupérées ont été dénombrées (Figure 13).

Ces adultes J5 sont soit utilisés à ce stade pour les expériences, soit mis en culture afin de récupérer le stade L1NN (voir paragraphe 4.3).

4.3 Stade « Larves 1 Nouveau-Nées » (L1NN)

Les AdJ5 sont mis en culture à raison de 3 000 adultes dans 10ml dans une flasque de culture de 25cm² (Dominique Dutscher / Falcon, ref : 353109). Le milieu de culture est composé de RPMI 1640 (VWR, ref : L0490), 2% de L-glutamine à 200mM (Dominique Dutcher, ref : X0550), 2% de pénicilline 10000 Ul/mL / streptomycine 10000 µg/mL (P/S) (Thermo, ref : 11556461), 1% de sodium pyruvate à 100mM (PanBiotech, ref : P04-43100), et 5% de Sérum de Veau Foetal décomplémenté (Gibco, ref : 10270-106). Après une incubation à +37°C en présence de 5% de CO₂ pendant au moins 48h, le milieu de culture a été filtré sur un tamis cellulaire de 40 µm au-dessus d'un tube conique de 50 ml. Les L1NN ayant un diamètre de 10µm et une longueur moyenne de 130µm passent facilement à travers le tamis et se retrouvent dans la solution filtrée ; alors que les adultes J5+2 ont un diamètre de 36µm et une longueur de 1,5mm à 3mm sont principalement retenus sur le tamis.

5. Analyses de biologie moléculaire

5.1 Isolement d'acides nucléiques et synthèse d'ADN complémentaires

Deux méthodes d'extraction ont été utilisées lors des expérimentations, l'une permettant d'obtenir l'ADN génomique, et l'autre les ARN totaux à partir desquels l'ADN complémentaire est synthétisé par rétro-transcription. L'extraction d'ADN génomique a été effectuée à l'aide des kits DNA IQ System (Promega, ref : DC6701) et Tissue and Hair Extraction Kit (Promega, ref : DC6740). Le protocole est basé sur celui de l'Institut Supérieur Sanitaire de Rome (Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy). Le principe repose sur la liaison entre les billes de silice (paramagnétiques) et l'ADN, par adsorption en présence de certains sels et sous certaines conditions de pH (force ionique élevée).

La première étape est d'extraire l'ADN du parasite. Pour cela, les parasites ont été mis en contact avec 20µl de tampon « Incubation Buffer » (composition non connue), contenant du dithiothréitol (DTT) à 0,1M et de la protéinase K à 1,8mg/ml. Une incubation a été effectuée à +55°C pendant 30 minutes sous agitation (1400 vibrations/minute). Une fois l'ADN extrait, 4µl de résine paramagnétique et 40µl de tampon « Lysis Buffer » (composition non connue) contenant 0,01M de DTT ont été ajoutés. Après une incubation de 5 minutes à +25°C pour lier l'ADN aux billes, les tubes ont été posés sur un portoir paramagnétique. Les billes sont ainsi attirées par l'aimant et ne peuvent pas être aspirées lors des lavages. Un premier lavage a été effectué avec 100µl de tampon « Lysis Buffer » contenant 0,01M de DTT puis 4 autres lavages avec le tampon « Wash Buffer ». L'élution a été effectuée en ajoutant 50µl de tampon « Elution Buffer » (composition non connue) en homogénéisant délicatement les billes. Après une incubation de 5 minutes à +65°C, les tubes ont été remis sur le portoir paramagnétique afin de récupérer la phase liquide contenant l'ADN des parasites extraits dans un nouveau tube. Ces ADN extraits ont été stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

La synthèse d'ADN complémentaires a été effectuée en plusieurs étapes :

- le <u>broyage mécanique et chimique</u> en utilisant un ribolyseur (Bertin Technologies, ref : Precellys 24) : les différents stades parasitaires, conservés à -80°C en culot sec, ont été repris dans 50µl de tampon « Lysis buffer » (composition non connue) (kit « RNAaqueous-Micro kit » (Ambion, ref : 740955)), puis mis dans un tube spécifiquement adapté au ribolyseur contenant des billes en verre de 0,5mm diamètre et de contenance 500µl (Ozyme, ref : 03961-2045). Le programme suivant, répété 2 fois, a été utilisé pour broyer les larves : 6500rpm, 15 sec x3 avec 10 sec de pause entre chaque agitation. Le contrôle de l'altération des larves s'est fait par observation au microscope. Le liquide contenant le lysat de parasites a ensuite été récupéré pour être mis dans un nouveau tube et 50µl de tampon « Lysis buffer » ont ajoutés été au tube contenant les billes afin de les rincer (ces 50µl sont ajoutés aux 50µl de lysat déjà récupérés).

- <u>l'extraction des ARN totaux</u>, a été effectuée en suivant les prescriptions du fournisseur du kit « RNAaqueous-Micro kit » (Ambion, ref : 740955) : Tout d'abord, une étape de précipitation des ARN a été réalisée en ajoutant 50µl d'éthanol 100% aux 100µl de broyat, puis différents lavages à l'éthanol (composition des tampons non connue), et une élution avec 20µl de « Elution solution » (composition non connue). Pour éliminer l'ADN génomique restant, un traitement à la DNase I a été effectué pendant 20 min à +37°C en ajoutant 2µl de tampon « 10X DNAse I Buffer » (composition non connue) et 1µl de DNAse I aux 20µl d'échantillon élué. Une inactivation de la rDNAse a été réalisée pendant 2min à

Dénaturation initiale et activation de la polymérase	2 min / 98°C
	10 sec / 98°
Amplification (35 cycles)	30 sec / TM
	1 min / 72°C
Extension finale	10 min / 72°C

Tableau 8: Cycle PCR du thermocycleur lors de l'utilisation de la Taq phusion

Tableau 9: Cycle de PCR du LightCycler 480 (Roche) lors de l'utilisation du Luminaris Color HiGreen

	Temps / Température	Mode d'acquisition	Ramp rate (°C/sec)
Dénaturation initiale	10 min / 95°C	Aucun	4,40
	10 sec / 98°	Aucun	4,40
Amplification (45 cycles)	30 sec / 60°C	Aucun	2,20
	1 min / 72°C	Unique	4,40
	5 sec / 95°C	Aucun	4,40
Courbe de fusion	1 min / 95°C	Aucun	2,20
	5 sec / 95°C	En continue	0,11

température ambiante en ajoutant 2µl de tampon « DNAse Inactivation Reagent » (composition non connue). Par la suite l'échantillon est dosé au spectrophotomètre (Thermo, ref : ND-2000) à 260nm, et une partie de l'échantillon a été transcrit en ADNc ; l'autre partie a été conservée à -80°C jusqu'à utilisation.

 la <u>rétro-transcription en ADN complémentaire</u> (ADNc), a été réalisée avec la Maxima reverse transcriptase (Thermo, ref : EP0742) selon les protocoles du fournisseur et en présence de RiboLock RNase Inhibitor (Thermo, ref : EO0381) dans un volume réactionnel de 20µl. Une première incubation de 30min à +50°C a été faite suivi d'une deuxième pendant 5min à +85°C. Les échantillons ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

5.2 <u>Amplification par une réaction en chaine par polymérase (PCR)</u>

En fonction de l'échantillon, l'amplification a été différente : PCR conventionnelle pour l'extraction d'ADN génomique, et PCR en temps réel dans le cas de l'ADN complémentaire.

Les réactions **de PCR conventionnelle** ont été réalisées dans un volume final de 50µl comportant 1 unité de Taq phusion en présence de son tampon HF 1X (Thermo, ref : F549S), 200µM de chaque dNTP et 0,3µM de chaque oligonucléotide utilisé. Le cycle de PCR utilisé est donné dans le Tableau 8 et la température d'hybridation (TM) est fonction du couple d'oligonucléotides utilisé. La migration des fragments d'ADN amplifiés a été réalisée sur gel d'agarose de 1% à 2% (selon la taille du fragment amplifié) ; le gel d'agarose (Ozyme, ref : LON50004) contient du tampon 1X contenant du Tris, Acétate, et EDTA (40mM de Tris-Acétate, 1mM d'EDTA pH8,3; Lonza, ref : BE51216) et 5 ng/ml de Bromure d'éthidium (Bet) (Sigma, ref : E1510). Deux marqueurs de tailles de poids moléculaire ont été utilisés en fonction de la taille des amplicons : 1kb DNA Ladder (Fermentas, ref : SM0313) et 100pb DNA Ladder (Fermentas, ref : SM0323). Les produits de PCR ont été visualisés sous ultra-violet.

Les réactions de **PCR en temps réel** (qPCR) ont été réalisées dans un volume final de 12µI : 6µI Luminaris Color HiGreen low ROX qPCR Master Mix 2X (Thermo, ref : K0371), 0,3µM d'oligonucléotides spécifiques à la cible et 5,28µI d'ADNc dilué au 1/10^{ème}, 1/100^{ème} ou 1/1 000^{ème}. Le cycle PCR utilisé est précisé dans le Tableau 9. La visualisation des courbes d'amplification a été faite par la combinaison de 2 filtres nommés SYBER Green I et HRM Dye (465nm et 510nm) et par le logiciel LightCycler ® 480 (version 1.5.1.62 / Roche).

Afin de confirmer l'absence d'ADN génomique dans les différents échantillons analysés par qPCR, les produits de PCR sont analysés une deuxième fois par migration sur gel d'agarose à 2% en TAE 1X contenant 5 ng/ml de Bet. Une visualisation sous ultra-violets est réalisée afin de confirmer la taille de l'amplicon.

5.3 Analyse des séquences

Afin d'analyser les séquences nucléotidiques, les amplicons ont été envoyés à la société Eurofins MWG (Paris, Plateforme de l'Hôpital Cochin). Dans le cas où une seule bande a été obtenue après migration du produit de PCR conventionnelle, le produit de PCR a été envoyé tel quel et une purification a été demandée au prestataire. Dans le cas où plusieurs bandes ont été obtenues pour un même échantillon, la bande d'intérêt a été purifiée à l'aide du kit GeneJet Gel Extraction (Thermo, ref : K0691) avant d'être envoyée au prestataire.

Un chromatogramme de chaque échantillon a été envoyé par le prestataire afin de faire l'analyse *in silico*.

III. <u>RESULTATS</u>

PARTIE 1 : CARACTERISATION MOLECULAIRE DE NBL1

GP	1 <u>2 400pb</u>	GP10
5'	GP1int 1 200pb	GP10int 3'

Figure 14 : Amplicons obtenus à partir des couples d'oligonucléotides GP1/GP10 et GP1int/GP10int

La ligne noire représente le gène *nbl1* et les flèches les amorces. Les tailles des amplicons obtenus par PCR sont indiquées dans les encadrés orange ou bleu.



Figure 15: Profil de migration des produits de PCR ciblant le gène entier de *nbl1* à partir de l'ADNg de *Trichinella* spp.

Migration sur un gel d'agarose à 1% après dépôt de 15µl de produits de PCR avec le couple d'amorces GP1/GP10 et à des températures d'hybridation de 48°C (puits impairs) ou 51°C (puits pairs). 1 et 2: *T. spiralis*; 3 et 4: *T. nativa*; 5 : Marqueur de poids moléculaire; 6 et 7: *T. britovi*; 8 et 9: *T. pseudospiralis*; 10 : Négatif à 51°C.



Figure 16: Profil de migration des produits de PCR ciblant une partie du gène *nbl1* à partir de l'ADNg de *Trichinella* spp.

Migration sur un gel d'agarose à 1% après dépôt de 15µl de produit de PCR amplifié avec le couple d'amorces GP1 int /GP10 int et à des températures d'hybridation de 60°C, 62°C ou 64°C. **4** et **11** : Marqueur de masse moléculaire ; **1** à **3**: *T. spiralis* à 60°C, 62°C et 64°C ; **5** à **7**: *T. nativa* à 60°C, 62°C et 64°C ; **8** à **10**: *T. britovi* à 60°C, 62°C et 64°C ; **12** à **14**: *T. pseudospiralis* à 60°C, 62°C et 64°C ; **15** à **17**: Négatif à 60°C, 62°C et 64°C .

1. Détermination de la séquence de NBL1 chez Trichinella

1.1 <u>Amplification avec le couple d'oligonucléotides GP1 / GP10 et analyses</u> <u>des séquences</u>

A l'heure actuelle, aucune séquence nucléotidique de l'ADN génomique du gène *nbl1* n'a été publiée, ni recensée. Compte tenu de cela, une amplification du gène a été réalisée avec le couple d'oligonucléotides (GP1 / GP10, Tableau 4) ; la visualisation des amplicons obtenus avec le couple d'oligonucléotides GP1/GP10 est présentée dans la Figure 14. Une migration sur un gel d'agarose a mis en évidence la présence de 2 fragments d'ADN au niveau des espèces *T. spiralis, T. nativa* et *T. britovi* (Figure 15) : une bande à environ 2400 paires de bases (pb) et une autre à environ 1150pb. La bande à 2400pb pourrait correspondre à l'ADN génomique du gène *nbl 1* mais la bande à 1150pb est inconnue ; cette bande à 1150pb pourrait être une amplification aspécifique des oligonucléotides.

Les différents fragments d'ADN amplifiés à 2400pb et 1150pb ont été extraits puis purifiés pour être ensuite séquencés. Les résultats de séquençage pour les différentes bandes à 1150pb ont donné des résultats ininterprétables (chromatogrammes avec un mélange de pics de manière anarchique) pour les 3 espèces. Cela provient sûrement du fait que ces amplicons sont le résultat d'une amplification non spécifique.

Le résultat de séquençage a donné des résultats corrects pour la bande à 2400pb mais n'a pas permis de séquencer la totalité du gène de NBL1 chez les différentes espèces analysées. Le schéma des différents fragments amplifiés de chaque espèce est disponible en Annexe 1.

Le séquençage a permis d'obtenir une séquence de 739pb avec GP1 et 899pb avec GP10, pour *T. spiralis*; 493pb avec GP1 et 509pb avec GP10, pour *T. nativa*; 709pb avec GP1 et 665pb avec GP10, pour *T. britovi*.

Afin de pouvoir déterminer la séquence dans sa totalité, de nouveaux oligonucléotides (GP1int et GP10int) ont été dessinés à l'aide du logiciel AmplifX. La visualisation des amplicons obtenus avec le couple d'oligonucléotides GP1int/GP10int est présentée dans la Figure 14. Les profils de migration obtenus à partir des produits des PCR réalisés sur les ADN génomiques de *T. spiralis, T. nativa, T. britovi* et *T. pseudospiralis* en utilisant les oligonucléotides GP1int et GP10int sont présentés en Figure 16. Le fragment amplifié de chaque espèce a été séquencé. Le résultat de séquençage de chaque espèce est correct sur l'ensemble des fragments amplifiés. Le schéma des différents fragments amplifiés de chaque espèce 1.

Le séquençage a permis d'obtenir une séquence : de 914pb avec GP1int et 1041pb avec GP10int, pour *T. spiralis*; 948pb avec GP1int et 1146pb avec GP10int, pour *T. nativa* ; 924pb avec GP1int et 971pb avec GP10int pour T. *britovi*; 907pb avec GP1int et 1110pb avec GP10int, pour T. *pseudospiralis*.


Figure 17 : Profil de migration des produits de PCR ciblant différents fragments du gène *nbl1* à partir de l'ADNg de *Trichinella* spp.

Migration sur un gel d'agarose à 2% après dépôt de 15µl de produit de PCR amplifié avec différents couples d'amorces. *T. spiralis* (**A**), *T. nativa* (**B**), *T. britovi* (**C**), *T. pseudospiralis* (**D**). **1** et **8** : Marqueur de poids moléculaire; **2** : Fragment 1 : Couple d'amorces GP1 / P2 ; **3** : Fragment 2 : Couple d'amorces P3/ P4 ; **4** : Fragment 3 : Couple d'amorces P5 / P6 ; **5** : Fragment 4 : Couple d'amorces P7 / P8 ; **6** : Fragment 5 : Couple d'amorces P9 / P10 ; **7** : Fragment 6 : Couple d'amorces P11 / GP10.



Figure 18 : Profil de migration des produits de PCR ciblant différents fragments du gène *nbl1* l'ADNg de *T. pseudospiralis*.

Migration sur un gel d'agarose à 2% après dépôt de 15µl de produit de PCR amplifié avec différents couples d'amorces. 1 : Marqueur de poids moléculaire; 2: Fragment 2 - couple d'amorces P1TpsHK/ P2TpsHK ; 3: Fragment 2 - couple d'amorces P1TpsIR/ P2TpsIR ; 4: Fragment 3 - couple d'amorces P5Tps/ P6.

1.2 <u>Amplification des différents fragments et analyse des produits de séquençage</u>

Afin de minimiser les erreurs de séquençage, de nouveaux oligonucléotides ont été dessinés pour obtenir des fragments plus petits de l'ordre de 500pb (Tableau 4). La taille théorique des fragments a été déterminée grâce au logiciel AmplifX (GP1/P2 = 320pb ; P3/P4 : 597pb ; P5/P6 : 527pb ; P7/P8 : 518pb ; P9/P10 : 610pb ; P11/GP10 : 193pb). La Figure 17 montre le profil de migration qui été réalisé sur les ADN génomiques de *T. spiralis, T. nativa, T. britovi* et *T. pseudospiralis* en utilisant les oligonucléotides nouvellement dessinés. Pour les espèces *T. spiralis, T. nativa et T. britovi*, tous les oligonucléotides ont bien été spécifiques de la séquence génomique de NBL1. Pour *T. pseudospiralis*, le fragment 3 n'a pas été amplifié et le fragment 1 a été amplifié mais la taille de l'amplicon obtenu ne correspond pas à celle attendue ; cela peut s'expliquer par un manque de spécificité de ces oligonucléotides sur la séquence de NBL1 de *T. pseudospiralis*.

Les différents fragments amplifiés de chaque espèce ont été séquencés. Le résultat de séquençage de chaque espèce est correct sur l'ensemble des fragments; et les alignements, dans les deux sens de lecture, ont pu être effectués sur chaque fragment amplifié grâce au logiciel BioEdit.

De nouveaux oligonuléotides (P5Tps ; P1TpsIR ; P2TpsIR ; P1TpsHK ; P2TpsHK) ont été dessinés afin de déterminer la séquence des fragments 1 et 3 de *T. pseudospiralis* (Tableau 4). Le profil de migration des produits de PCR a été réalisé sur les ADN génomique de *T. pseudospiralis* en utilisant ces nouveaux oligonucléotides (Figure 18). Il n'y a pas eu d'amplification avec le couple P1TpsIR/ P2TpsIR ce qui signifie que les oligonucléotides ne sont pas spécifiques de la séquence. Avec le couple P1TpsHK/ P2TpsHK, une forte bande a été observée à environ 320pb et quelques faibles bandes entre 800pb et 1200pb qui sembleraient être des bandes aspécifiques. Avec le couple P5Tps/ P6, l'amplification a été correcte.

Les fragments amplifiés de chaque espèce ont été séquencés. Le résultat de séquençage de chaque espèce est correct sur l'ensemble des fragments amplifiés ; et les alignements dans les deux sens de lecture ont pu être effectués sur chaque fragment amplifié grâce au logiciel BioEdit.

1.3 Assemblage des séquences en ADN génomique de NBL1

Les différents résultats de séquençage ont été analysés avec le logiciel BioEdit afin de pouvoir reconstituer les différents fragments amplifiés. Comme les différents fragments sont chevauchants, la séquence génomique codant pour la protéine NBL1 des 4 espèces étudiées a pu être reconstruite. Pour une meilleure visualisation le logiciel CLC Genomics a été utilisé (Figure 19).

Cette analyse nous a permis de visualiser les différents amplicons de chaque espèce de *Trichinella*. Une séquence consensus a été établie en fonction des résultats de séquençage obtenus. Cela a permis de déterminer la taille de l'ADN génomique codant pour la protéine NBL1 pour les 4 espèces : 2340 pb, *T. nativa* sur 2321pb, *T. britovi* sur 2319pb et *T. pseudospiralis* sur 2144pb.

A 1_Tspiralis+GP1/P2 2_Tspiralis+P3/P4 3_Tspiralis+P5/P6 4_Tspiralis+P7/P8		1000 	1 500	2 000 1	404 512 505 461
5_Tspiralis+P9/P10 6_Tspiralis+P11/GP10 Tsp_déduite_frag Tsp_finale_ALL Consensus					- 568 216 2340 2264 2340
Conservation					Wattan
B 1_Tna_Frag1+GP1/P2 2_TnaFrag2+P3/P4 3_TnaFrag3+P5/P6 4_TnaFrag3+P5/P6 5_TnaFrag3+P9/P10 5_TnaFrag5+P9/P10		1000 	++++++ 1 	2000	189 516 498 492 548
Tnativa_déduite_rag Tnativa_déduite_cap Tnativa_déduite_cap Tnativa_finale_All Consensus Conservation				101-10011000-101-09-0010-09-00-00	2165 2165 2148 2321
C 1_TbrFrag1+GP1/P2 2_TbrFrag2+P3/P4 3_TbrFrag3+P5/P6 4_TbrFrag4+P7/P8 5_TbrFrag5+P3/P10 6_TbrFrag6+P11/GP1 T.br_déduite_GP T.br_friale_ALL Consensus	500 	1 000 	" <u>"</u>	2 000	400 584 504 490 217 2319 2211 2319 2319
Conservation					
D 1_Tpseudo+P1TpsHK/P2TpsHK 2_Tpseudo+P3/P4 3_Tpseudo+P5TpsP6 4_Tpseudo+P7/P8	500 1	1000. 	1 500	2 000 1	269 583 549 426
5_Tpseudo+P9/P10 6_Tpseudo+P1/IGP10 Tps_déduite_Frag Tps_déduite_GP Tps_finale_ALL Consensus					550 207 1644 1133 2144
Conservation					

Figure 19: Alignement nucléotidique par espèce de *Trichinella* spp., réalisé par CLC Genomics, des différents fragments d'ADN génomique amplifiés.

A : *T. spiralis*; B : *T. nativa*; C : *T. britovi*; D : *T. pseudospiralis*. Alignements des différents fragments amplifiés pour déduire la séquence génomique codant pour le gène *nbl 1*. Les séquences ont été déduites en fonction, d'une part, du séquençage avec les oligonucléotides GP1, GP1int, GP10int et GP10, et d'autre part avec les oligonucléotides P2 à P11. Enfin, la séquence la plus proche de la réalité (seq Finale) a pu être déduite pour les 4 espèces.

2. Etude génomique de Trichinella spp.

L'alignement a permis de mettre en évidence les similitudes et les différences de nucléotides entre les 4 espèces analysées. Grâce au module BLAST sur le site NCBI, le pourcentage d'identité entre les espèces a pu être déterminé (Tableau 10). Pour les espèces *T. spiralis, T. nativa* et *T. britovi*, le recouvrement des séquences est de 100%. Avec l'espèce *T. pseudospiralis*, cette couverture est de l'ordre de 90%. Ce pourcentage peut s'expliquer par le fait que la totalité du gène n'a pas pu être séquencée ou que le gène est plus court. Dans le cas où le gène est plus court, cela peut se justifier par le fait que cette espèce est « non encapsulée » et donc que cette protéine NBL1 est différente de celle des espèces *T. spiralis, T. nativa* et *T. britovi*. Au niveau du pourcentage d'identité entre les espèces, une moyenne de 90% est observée.

	% d'identité	taux de recouvrement
T.spiralis Vs T.nativa	95%	100%
T.spiralis Vs T.britovi	94%	100%
T.spiralis Vs T.pseudospiralis	87%	90%
T.nativa Vs T.britovi	98%	100%
T.nativa Vs T.pseudospiralis	88%	90%
T.britovi Vs T.pseudospiralis	88%	90%

Tableau 10 : Analyse du pourcentage d'identité du gène *nbl1* au niveau nucléotidique, des différentesespèces de *Trichinella* spp. analysées.

L'alignement nucléotidique des séquences déterminées pour les 4 espèces analysées par le logiciel Multalin (Figure 20) a permis de mettre en évidence des différences nucléotidiques, mutations synonymes ou non synonymes, ayant ou non un impact sur la séquence protéique traduite principalement dans les zones d'insertion nucléotidiques.

Ces zones supplémentaires sont définies ci-dessous en fonction des espèces :

- Au niveau uniquement de :
 - T. spiralis, à 2041pb, une séquence de 27 nucléotides;
 - T. nativa, à 237pb, une séquence de 9 nucléotides;
 - T. britovi, à 237pb, une séquence de 4 nucléotides;
 - *T. pseudospiralis*, à 416pb, une séquence de 4 nucléotides, à 952pb, une séquence de 17 nucléotides, et à 1100pb, une séquence de 15 nucléotides.
- Au niveau de T. spiralis et T. pseudospiralis : à 1928 pb, une séquence de 9 nucléotides.



Figure 20 : Alignement nucléotidique des ADN génomiques reconstitués du gène *nbl1* de *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi* et *T. pseudospiralis*, réalisé par Multalin.

Les bases bleues correspondent à une concordance parfaite entre les 4 espèces ; les bases rouges correspondent à une concordance forte entre 2 ou 3 espèces uniquement et les bases noires correspondent à une non concordance avec les 3 autres espèces.

- Au niveau de *T. nativa* et *T. britovi*: à 444pb, une séquence de 14 nucléotides est présente.
- Au niveau de T. spiralis, T. nativa et T. britovi : à 2230 pb, une séquence de 9 nucléotides.

La conséquence des insertions et/ou délétions de nucléotides dépend de sa localisation (intron ou exon) et du changement ou non du cadre de lecture. Dans le cas où cela se produit au niveau d'un intron, il n'y a aucune conséquence sur la séquence de la protéine. A l'inverse, l'insertion ou la délétion intervenant sur un exon, deux situations sont possibles puisque chaque codon comporte trois nucléotides :

- les insertions et/ou délétions multiples de 3 nucléotides n'entraînent pas de décalage du cadre de lecture. La conséquence au niveau protéique pourra être un gain ou une perte en acidesaminés. L'impact fonctionnel est variable selon la nature et la localisation de la protéine.

- les insertions et/ou délétions non-multiples de 3 nucléotides sont responsables d'un décalage du cadre de lecture. Cela peut entraîner la venue prématurée ou plus tardive d'un codon stop et ainsi l'obtention d'une protéine tronquée qui risque d'être dégradée ou une protéine allongée dont sa fonction serait différente. Cela peut également engendrer le changement partiel de la séquence en acides aminés ; l'impact est variable selon le nombre d'acides aminés changés, et la nature et la localisation de la protéine.

Il est à noter qu'au niveau de *T. pseudospiralis*, une zone de 214 paires de bases au début de l'alignement n'a pas été séquencée et explique le taux de recouvrement inférieur à 100%. Pour le moment, il n'est pas possible de savoir si cette partie existe et est différente de celle des 3 autres espèces ou si elle est absente de cette espèce.

Un certain nombre de nucléotides indépendants ou par groupe de 2 ou 3 nucléotides consécutifs ne sont pas identiques entre les 4 espèces. Certains appartiennent à des introns et n'auront donc pas d'incidence sur la traduction en protéines et d'autres font partie des exons et changeront éventuellement la composition en acides aminés de la protéine. Ces informations seront confirmées dans le paragraphe suivant.



Figure 21 : Alignement des séquences protéiques déduites des séquences nucléotidiques du gène *nbl1* de *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi* et *T. pseudospiralis* par homologie au gène codant pour NBL1 chez *T. spiralis*.

Les bases bleues correspondent à une concordance parfaite entre les 5 séquences ; les bases rouges correspondent à une concordance forte entre 2 ou 3 espèces uniquement et les bases noires correspondent à une non concordance avec les 3 autres espèces. Les encadrés verts correspondent à la séquence PSSGSRPTYP et les oranges à la séquence GSRPT.

3. Etude de la protéine déduite de NBL1 chez Trichinella

Les différentes séquences déduites à partir des séquences nucléotidiques déterminées des 4 espèces étudiées ont été traduites en protéines grâce au logiciel BioEdit et par homologie à la séquence de NBL1 nommée SS2 (n° accession GenBank : AF331160). Afin de comparer les séquences entre elles, un alignement a été réalisé par le logiciel Multalin (Figure 21).

L'analyse *in silico* de la protéine NBL1 déduite chez *T. spiralis*, par le logiciel HMMER, a mis en évidence 2 domaines transmembranaires, ce qui correspondrait à l'isoforme SS2 de NBL1 chez *T. spiralis*. Cela ne signifie pas que l'autre isofome n'est pas présente puisque l'extraction d'ADN et l'analyse nucléotidique n'ont été réalisées qu'une seule fois. Au niveau des espèces *T. nativa*, *T. britovi* et *T. pseudospiralis*, le logiciel HMMER, a mis en évidence la présence d'un peptide signal (*T. nativa* et *T. britovi* du nucléotide 1 à 63, et *T. pseudospiralis* du 1 au 42) ; ce qui correspondrait à l'isoforme SS2-1 de NBL1 de *T. spiralis*. Comme pour l'analyse de *T. spiralis*, cela ne signifie pas que l'autre isoforme n'est pas présente dans ces 3 espèces.

L'analyse par le logiciel HMMER a également montré que ces 4 protéines ont un même domaine « trypsique », ce qui signifie qu'elles sont de la famille des protéases à sérine de type trypsine.

Cet alignement a fait ressortir les différents motifs répétés connus de la partie C-terminale de la protéine NBL1. Chez *T. spiralis*, les études antérieures ont mis en évidence un peptide de 10 acides aminés répété 4 fois, fortement immunogène et reconnu par un anticorps monoclonal dirigé contre le peptide PSSGSRPTYP. Ce motif est bien répété 3 fois chez *T. spiralis*, *T. nativa* et *T. britovi* (363 à 372 pb ; 390 à 389 ; 389 à 408 pb), mais n'est pas identique chez *T. pseudospiralis*. Par contre le motif GSRPT compris dans le peptide de 10 acides aminés (PSSGSRPTYP) est bien répété chez les 4 espèces ; ce motif est répété 7 fois au sein des 4 espèces étudiées.

Au niveau de l'analyse de l'ensemble de la séquence protéique déduite des 4 espèces, on observe en moyenne 90% d'identité entre les différentes séquences chez les espèces analysées (analyse par le module Blast sur le site NCBI). Il est intéressant de constater qu'une identité de 99% (et non 100%) a été déterminée entre la séquence publiée de NBL1 chez *T. spiralis* (AF331160) et la séquence déterminée de *T. spiralis* dans notre étude. Ce pourcentage s'expliquerait par le fait que la séquence de *T. spiralis* correspond en partie à une protéine publiée en 2015 et nommée Chymotrypsine C (n° accession GenBank : KRY40297.1; mise en ligne en novembre 2015). Aucune donnée bibliographique n'a pour le moment été mise en ligne sur cette protéine de *Trichinella* nommée Chymotrypsine C. Il est à noter que la fonction d'une Chymotrypsine est proche de celle d'une sérine à protéase de type trypsine. Ce sont des protéases digestives. La trypsine clive les protéines après les acides aminés portant une charge positive tels que la lysine ou l'arginine, la chymotrypsine après les acides aminés aromatiques ou hydrophobes tels que tyrosine, phénylalanine ou encore leucine. Ces deux protéases sont produites sous forme de précurseurs inactifs, le trypsinogène et le chymotrypsinogène respectivement, qui sont eux-mêmes activés par clivage protéolytique.

4. Conclusion

Notre étude a permis d'obtenir les séquences génomiques codant pour la protéine NBL1 des espèces *T. spiralis, T. nativa, T. britovi,* et *T. pseudospiralis.* Des similarités et des différences ont ainsi pu être mises en évidence au niveau génomique dont certaines ont un impact sur les séquences protéiques déduites des séquences nucléotidiques des ADN génomiques extraits. Les principales différences au niveau protéique se situent dans la partie C-terminale (partie antigénique). Cependant, ces différences doivent être confirmées par un séquençage des cDNA issus des ARN messagers codant pour la protéine NBL1 dans les différentes espèces de *Trichinella,* ainsi que la présence ou non des deux isofomes de NBL1 chez *T. nativa, T. britovi* et *T. pseudospiralis.*



Figure 22 : Amplicons théoriques obtenus lors de l'amplification de l'ADNc du gène nbl1

Enchaînement des introns et exons (boites grises). Les amorces ont été dessinées de sorte que le début et la fin soient complémentaires respectivement de la fin de l'exon précédent et du début de l'exon suivant. Les valeurs indiquent les tailles des amplicons attendus.



Figure 23 : Profil de migration des produits de PCR ciblant la séquence codante de la protéine NBL1 chez *T. spiralis*.

Migration sur gel d'agarose à 2% après un dépôt de 15μ l de produit de PCR amplifié avec les couples d'oligonucléotides servant à l'amplification en PCR en temps réel. **5** et **14** : Marqueur de poids moléculaire; **1** à **4** : amplification de l'ADN génomique ; **6** à **9** : amplification du cDNA d'adultes J5 à partir d'ARNtot; **10** à **13** : amplification du cDNA de L1M ; **15** à **18** : amplification du cDNA d'ARNm d'adultes J5 ; **19** : Négatif. **1**, **6**, **10** et **15** : couple NBL1 qPCR2F/qPCR2R ; **2**, **7**, **11** et **16** : couple NBL1 qPCR3F/qPCR3R ; **3**, **8**, **12** et **17** : couple NBL1 qPCR3F/qPCR3B ; **4**, **9**, **13**, **18** : couple NBL1 qPCR4F/qPCR4R.

PARTIE 2 : MISE EN PLACE DU PROTOCOLE VISANT LA CARACTERISATION DU ROLE DE NBL1 PAR UN SIRNA SPECIFIQUE

1. Etude transcriptomique des différents stades parasitaires de Trichinella

1.1 Détermination des oligonucléotides pour la PCR en temps réel

Pour éviter d'éventuelles contaminations par de l'ADN génomique, les oligonucléotides choisis permettent uniquement d'amplifier l'ADNc du gène nbl1. Des échantillons d'ADN génomique, d'ADNc rétro-transcrits à partir des ARN totaux (ARNtot) des stades Adultes J5 (5 jours post infection) et L1M, et d'ADNc provenant d'ARN messager (ARNm) du stade Adultes J5 de *T. spiralis* ont été testés avec les 4 couples d'oligonucléotides ciblés (Tableau 5). La visualisation de la taille des amplicons obtenus lors de l'amplification de l'ADNc du gène *nbl1* est présentée dans la Figure 22. Les résultats des amplifications PCR sont montrés sur la Figure 23.

Les faibles amplifications provenant de l'ADN génomique avec les couples d'oligonucléotides qPCR3 F/qPCR3 R et qPCR3 F/qPCR3b R n'auraient pas dû se produire (Figure 23, ligne 2 et 3). Cela suggère que ces couples ne sont pas spécifiques des zones définies *in silico* sur la séquence de l'ADNc du gène *nbl1*; cela nous permet d'éliminer ces couples lors des prochaines études. Par contre, aucune amplification avec les couples qPCR2 et qPCR4 n'a été obtenue (Figure 23, ligne 1 et 4), ce qui montre une bonne spécificité de ces 2 couples d'oligonucléotides.

Au niveau des amplifications des échantillons provenant des ADNc (issus des ARN totaux), les couples qPCR2 F/qPCR2 R, qPCR3 F/qPCR3 R et qPCR4 F/qPCR4 R montrent une seule amplification à la taille attendue (Figure 23, ligne 6, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 16, et 19). Cela suggère une bonne spécificité des oligonucléotides au niveau de l'amplification des fragments d'ADNc (issus des ARN totaux). En ce qui concerne le couple qPCR3 F/qPCR3b R (Figure 23, ligne 8, 12, 17), cette spécificité (un seul fragment d'amplicon amplifié) est visible uniquement en présence d'ARNm ; cela nous permet de confirmer l'élimination de ce couple dans les prochaines études.

Ces résultats nous permettent de retenir les couples qPCR2 F/qPCR2 R et qPCR4 F/qPCR4 R pour la suite des études transcriptomiques.

Les 2 fragments amplifiés avec les couples d'oligonucléotides sélectionnés (Figure 23, ligne 15 et 18) ont été séquencés et les résultats correspondent bien aux séquences de l'ADNc du gène *nbl1* étudié. Les alignements ont été faits grâce au logiciel BioEdit.



Figure 24 : Analyse transcriptomique du gène nbl1

En foncé sont représentés les résultats obtenus avec le couple d'oligonucléotides qPCR2F/qPCR2R et en clair avec le couple d'oligonucléotides qPCR4F/qPCR4R. **A, C, E**: Δ Ct (Ct_{NBL1} – Ct_{actine}) en fonction des différents stades parasitaires : L1M (A), L1NN (B), Adultes J5 (C); **B, D, F** : Δ Ct (Ct_{NBL1} - Ct_{eif3C}) en fonction des différents stades parasitaires L1M (D), L1NN (E), Adultes J5 (F).

1.2 Etude de la transcription du gène nbl1 aux différents stades

Une étude transcriptomique préliminaire de l'expression du gène *nbl1* a été réalisée à partir des ARNm des stades L1M, Adultes J5, Adultes J5+2 (5 jours post infection + 2 jours de culture *in vitro*) et L1NN en utilisant la qPCR. Les ARNm ont été détectés soit avec le couple d'oligonucléotides qPCR2 F/qPCR2 R, soit avec le couple d'oligonucléotides qPCR4 F/qPCR4 R (Tableau 5). Dans un premier temps, le delta des Ct (Cycle Threshold pour « cycle seuil ») entre le gène *nbl1* et un gène de ménage l'*Actine* ou l'*eif3C* (Tableau 6) ont été analysés pour chaque stade, à différentes concentrations en parasites et à différentes dilutions. Cette analyse a été réalisée en plaque de 96 puits par PCR en temps réel et chaque échantillon a été analysé en duplicats. La moyenne des duplicats a été utilisée pour l'analyse des données (Figure 24). L'absence d'ADN génomique dans les échantillons a été vérifiée par une migration sur gel d'agarose des produits de qPCR des échantillons de gènes de ménage dilué au 1/10^{ème}.

Les **graphiques A et B** correspondent à une même plaque sur laquelle différents échantillons de **larves musculaires** (L1M) ont été testés. Les valeurs de Δ Ct (Ct_{NBL1} - Ct_{gène de ménage}) sont toutes positives. Il a donc fallu plus de cycles de PCR pour atteindre la valeur seuil pour le gène d'intérêt que pour le gène de ménage, ce qui suggère que le gène *nbl1* est moins exprimé que le gène de ménage de l'*actine* ou de l'*eif3C*. Il est à noter qu'il n'y a pas eu de détection du cDNA de l'*actine*, de l'*eif3C* et de NBL1 lorsque le cDNA de 10L1M a été dilué au 1/100^{ème}; la limite de détection pour ce stade parasitaire est donc atteinte.

Les **graphiques C et D** correspondent à une même plaque sur laquelle différents échantillons de **larves nouveau-Nées** (L1NN) ont été testés. Les valeurs de Δ Ct (Ct_{NBL1} - Ct_{gène de ménage}) sont toutes très négatives, ce qui suggère que le gène *nbl1* est beaucoup plus exprimé que le gène de ménage de l'actine ou de l'*eif3C*. Cette forte différence de Δ Ct par rapport aux résultats obtenus avec les L1M indique qu'il y a une plus forte expression du gène *nbl1* chez les L1NN que chez les L1M. Pour le gène de l'*actine*, il n'y a pas de détection du cDNA à la dilution 1/100^{ème} lors de l'extraction de 1 000 ou 500 L1NN ; la limite de détection est atteinte mais uniquement pour ce gène de ménage. Lors des futures analyses, le gène de ménage de l'*eif3C* sera donc privilégié car la limite de détection n'a pas été atteinte lors des manipulations.

Les **graphiques E et F** correspondent à une même plaque sur laquelle différents échantillons de femelles **adultes à J+5** (stade où la plupart des L1NN n'ont pas encore été expulsées par les femelles) ont été testés ainsi qu'un échantillon de 50 000 L1NN. Cet échantillon de L1NN permet de comparer la différence d'expression entre ces deux stades. Les valeurs de Δ Ct (Ct_{NBL1} - Ct_{gène de ménage}) sont négatives ou inférieures à 1, ce qui suggère que le gène *nbl1* est plus exprimé que le gène de ménage de l'*actine* ou de l'*eif3C*. Ce résultat confirmerait le résultat précédent sur les L1NN. Il est à noter que ce Δ Ct est plus faible chez les femelles n'ayant pas expulsé la plupart des L1NN que chez les L1NN seules. Au stade des femelles J5 et J5+2, cette étude compare l'amplification du gène de ménage au niveau des cellules



Figure 25 : Expression des ARNm de NBL1 dans les stades L1NN et Adultes J5 par rapport à celle des L1M.

En foncé sont représentés les résultats obtenus avec le couple d'oligonucléotides qPCR2 F/qPCR2 R et en claire avec le couple d'oligonucléotides qPCR4 F/qPCR4 R. Le trait rouge représente la moyenne des groupes. A et **B** : Normalisation par échantillons de 50 L1M à la dilution $1/10^{\text{ème}}$; **C** et **D** : Normalisation par échantillons de 5 000L1M à la dilution $1/10^{\text{ème}}$; **C** et **D** : Normalisation par échantillons de 5 000L1M à la dilution $1/10^{\text{ème}}$; **C** et **D** : Normalisation par échantillons de 5 000L1M à la dilution $1/10^{\text{ème}}$; **C** et **D** : Normalisation par échantillons de 5 000L1M à la dilution $1/10^{\text{ème}}$; **C** et **D** : Normalisation par échantillons de 5 000L1M à la dilution $1/10^{\text{ème}}$.

des femelles et des cellules des L1NN développées et en cours de développement (de l'embryon au ver formé) par rapport à l'amplification du gène *nbl1* qui est principalement présent chez les larves L1NN ; cela pourrait expliquer le fait que le Δ Ct est plus faible chez les femelles que chez les L1NN.

Cette analyse indique que la dilution et le nombre de parasites n'influent pas sur le ∆Ct (NBL1 / gène de ménage) puisque les valeurs ne varient que très peu au sein d'un même stade parasitaire. Cependant ces résultats devraient être confirmés en triplicat afin de déterminer des écart-types.

Dans un deuxième temps, l'expression du gène *nbl1* chez les L1NN et chez les adultes J5 a été comparée à celle des L1M (Figure 25). Précédemment, il a été constaté que le niveau des ARNm codant pour la protéine NBL1 chez les L1M semblait plus faible que chez les adultes J5 et L1NN. Cette hypothèse nous amène à étudier l'expression relative de NBL1 en nous basant sur les valeurs obtenues précédemment. L'étude par PCR quantitative a été privilégiée dans ce travail puisque qu'il est plus simple de détecter l'ARN dans les L1NN que les protéines totales.

La quantification relative des ARNm codant pour NLB1 dans les stades Adultes J5 et L1NN a été réalisée en utilisant la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$ avec $\Delta\Delta Ct = (CT_{NBL1} - CT_{gène\ de\ ménage})_{stade\ d'intérêt} - (CT_{NBL1} - CT_{gène\ de\ ménage})_{L1M}$. Les valeurs obtenues avaient un tel écart d'un groupe à l'autre que cela n'était pas représentable sur un graphique linéaire. Les valeurs sont donc représentées en utilisant la fonction « log ».

Les **graphiques A et B** correspondent à l'analyse de l'expression de NBL1, par RT qPCR, dans les différents échantillons de femelles J5 et de L1NN à partir des extractions de **50 L1M**. 2 groupes sont obtenus, que l'on soit dans le cas de l'analyse par rapport au gène de ménage de l'actine ou de l'*eif3C*; un groupe incluant les femelles J5 (moyenne de 1,54 ou 2,71 pour les couples d'oligonucléotides qPCR2 et qPCR4 respectivement) et l'autre incluant les L1NN (moyenne de 4,54 ou 4,79 pour les couples d'oligonucléotides qPCR2 et qPCR4 respectivement). Le groupe des « L1NN » présente des niveaux d'ARNm NBL1 plus élevés que celui des femelles J5 fécondes, ce qui confirme l'hypothèse précédente : les larves L1NN expriment plus fortement le gène de NBL1 que les femelles J5 fécondées. Il est à noter que la congélation n'impacte pas l'analyse.

Les **graphiques C et D** correspondent à l'analyse de l'expression de NBL1, par RT qPCR, dans les différents échantillons de femelles J5 et de L1NN à partir des extractions de **5 000 L1M**. Les 2 groupes, sont retrouvés, les femelles J5 (moyenne de 1,29 ou 2,50 pour les couples d'oligonucléotides qPCR2 et qPCR4 respectivement) et les L1NN (moyenne de 4,29 ou 4,58 pour les couples d'oligonucléotides qPCR2 et qPCR2 et qPCR4 respectivement), ce qui indique qu'il n'y a pas d'influence de la quantité de larves extraites pour les RT qPCR sur les résultats obtenus. L'hypothèse précédente relative à la surexpression du gène *nbl1* dans les L1NN par rapport aux femelles fécondes est confirmée. Cette analyse confirme également que la dilution et le nombre de parasites n'influencent pas la quantification relative de l'expression du gène *nbl1*.





La moyenne en fonction de la charge parasitaire est représentée par un trait rouge, et la charge parasitaire de chaque souris par un triangle bleu.

2 Essai in vitro d'inactivation de la protéine NBL1 au stade L1NN

2.1 <u>Mise en place du protocole d'infestation des souris par injection</u> intraveineuse des L1NN

Dix souris ont été infestées avec 1 500 L1M afin de récupérer un grand nombre d'adultes au niveau des intestins. Ces souris ont été euthanasiées après 5 jours infestation; puis les intestins ont été récupérés dans le but d'obtenir des L1NN. Environ 2000 adultes ont été récupérés et cela nous a permis d'obtenir environ 40 000 L1NN après 2 jours de culture *in vitro* des adultes J5.

Afin d'étudier l'influence du nombre de L1NN injectées à une souris sur le rendement parasitaire (capacité des L1NN à s'installer dans la fibre musculaire), trois groupes de 5 souris ont été infestés par voie intraveineuse avec des doses variables de L1NN (74 L1NN, 740 L1NN et 7 400 L1NN). Après 6 semaines les souris ont été sacrifiées (temps permettant aux L1NN de s'installer dans la fibre musculaire et passer au stade L1M), et le nombre de larves L1M de chaque souris a été déterminé ; le nombre de L1M correspond au nombre de L1NN qui se sont installées dans la fibre musculaire. Cela nous permet d'estimer le rendement parasitaire en fonction de la dose de L1NN infestées.

Les données brutes sont données en annexe 2. Les résultats montrent qu'une moyenne de 30% des L1NN injectées par voie intraveineuse se sont installées dans les muscles, quelle que soit la dose inoculée (Figure 26). Ainsi une dose de l'ordre de 700 L1NN / souris a été définit pour les prochaines expérimentations ; un rendement de 30% permet d'obtenir environ 200 L1M lors des digestions artificielle des carcasses de souris. De plus, dans ce groupe une moins grande dispersion du nombre de larves L1M d'une souris à l'autre est observée. Ces résultats sont préliminaires et restent à confirmer mais ils permettent de calibrer les doses d'injection.

2.2 <u>Mise en contact des L1NN avec un siRNA spécifique de NBL1</u>

2.2.1 Eude de la mortalité in vitro

Dans un premier temps, l'impact d'un siRNA spécifique du gène *nbl1* sur la survie des L1NN a été évalué en observant la mortalité des L1NN *in vitro*.

Les L1NN ont été obtenues de la même façon que précédemment. L'infestation des 10 souris a permis d'obtenir environ 2000 adultes J5 (mâles et femelles confondus) et après 2 jours de culture *in vitro* des adultes J5, environ 40 000 L1NN ont été récupérées dans 25ml de milieu de culture.

Dans une plaque de culture de 96 puits à fond plat, environ 45 L1NN sont mises dans 10 puits différents contenant déjà 200µl de milieu de culture (même composition que le milieu utilisé pour la culture des adultes). Dans 5 puits, le siRNA spécifique de NBL1 n°1 est ajouté afin d'avoir une concentration



Figure 27 : Mortalité des L1NN au cours du temps en milieu de culture en présence ou non de siRNA n°1 spécifique de NBL1.

En bleu est représenté le groupe contrôle sans siRNA et en violet le groupe ayant reçu le siRNA à une dose de 5µM. Les colonnes représentent la moyenne du pourcentage de L1NN mortes par puits, n=5 puits par condition. Et les barres d'erreur représentent les écarts-types.

finale de 5µM ; et les 5 autres puits (sans siRNA) correspondent au groupe témoin. Une larve de L1NN est considérée morte dans le cas où elle est complètement immobile. Le J_0 constitue le nombre de L1NN mortes avant la mise en contact du siRNA. Puis le nombre de L1NN mortes est dénombré à différents temps (J1, J4, J5, J6, J8 et J11) jusqu'à la mort de toutes les L1NN présentes dans les différents puits. Les données brutes sont indiquées dans l'annexe 3 et le pourcentage de mortalité des L1NN est représenté dans la Figure 27.

Cette étude ne montre aucune différence entre les L1NN traitées ou non avec du siRNA n°1, spécifique de NBL1, dans les conditions de mise en culture *in vitro*. Il aurait été intéressant d'avoir un groupe où les L1NN auraient été en contact avec un siRNA non spécifique d'un gène de *Trichinella* mais au vu des résultats de cette manipulation, ce témoin n'aurait pas apporté d'informations supplémentaires. Cette absence de différence entre les 2 groupes peut être due à la concentration en siRNA non adaptée. En absence d'essais avec différentes concentrations en siRNA, il est difficile de conclure sur la toxicité éventuelle de ce siRNA sur les L1NN ou même sur l'implication de la protéine NBL1 sur le développement des L1NN.

Il est à noter que classiquement, l'efficacité et le temps de mise en contact nécessaire pour observer l'effet d'un siRNA dépendent du turn-over de la protéine ciblée. Dans le cas de NBL1, il est connu que la protéine NBL1 est présente chez les L1NN dans l'utérus des femelles (étude protéomique en cours), le siRNA pourrait ne pas avoir d'effet sur les L1NN car la protéine NBL1 est déjà produite lorsque les L1NN sont expulsées des femelles. Cela pourrait avoir comme conséquence que l'inactivation de la protéine NBL1 par des siRNA au niveau des ARNm est trop tardive pour voir un effet visible et quantifiable.

Cette étude indique également que 80% des L1NN meurent après 8 jours de culture *in vitro* et donc que les manipulations sur les L1NN doivent être effectuées avant 6 jours de culture pour voir un effet autre que celui de la culture *in vitro*.

Afin de confirmer ces résultats, une nouvelle expérience pourra être réalisée en testant les siRNA n°2 et n°3 (autres zones ciblées sur la même séquence) à différentes concentrations. Des mesures des L1NN pourraient également apporter des informations complémentaires sur le développement des L1NN en présence d'une siRNA spécifique du gène *nbl1*.

2.2.2 <u>Etude de l'infectiosité in vivo</u>

Les L1NN ont été obtenues de la même façon que précédemment. L'infestation des 5 souris a permis d'obtenir environ 3 000 adultes J5 (mâles et femelles confondus) et après 2 jours de culture, environ 160 000 L1NN ont été récupérées.



Figure 28 : Installation des L1NN traitées ou non par un siRNA spécifique du gène *nbl1* dans les muscles des souris.

Les losanges représentent le pourcentage de L1M récupérées après digestion artificielle (6 semaines postinfestation) suite à une injection par voie intraveineuse d'environ 800 L1NN ayant été en contact (siRNA1, siRNA2, siRNA3) ou non (Ctl) d'un siRNA spécifique de NBL1. La moyenne de la charge parasitaire est représentée par un trait rouge, et la charge parasitaire de chaque souris par un triangle bleu. Afin de tester l'infectiosité des L1NN en présence ou non d'un siRNA spécifique de NBL1, les L1NN ont été mises en culture *in vitro* pendant 4 jours ou 6 jours en plaque de 96 puits dans 200µl de milieu de culture et 5µM de siRNA (pour les groupes « essai »); les L1NN d'un même puit ont été inoculées à une même souris. Après 4 ou 6 jours d'incubation *in vitro*, les L1NN ont été prélevées et injectées aux souris. Pour chaque condition, 5 souris ont été infectées puis digérées par une digestion chloro-pepsique individuellement 6 semaines après, afin de connaître le nombre de L1M présentes dans chaque souris.

Dans certains groupes, certaines souris ont été éliminées de l'analyse car l'injection intraveineuse n'avait pas été réussie (injection dans le cartilage de la queue plutôt que dans la veine). Les données brutes sont données dans l'annexe 4.

Cette expérience confirme les résultats retrouvés précédemment dans les conditions de culture *in vitro*. Au niveau de l'évaluation de l'impact du siRNA spécifique de NBL1 sur l'installation des larves L1NN dans la fibre musculaire, aucune différence n'a été observée entre les L1NN en contact ou non avec un siRNA (siRNA n°1, siRNA n°2 ou siRNA n°3). Ces trois siRNA ciblés n'ont également pas mis en évidence de différence à 4 ou 6 jours de culture *in vitro*. Il faut néanmoins prendre en compte le fait que les résultats obtenus après 6 jours de culture *in vitro* sont ininterprétables vis-à-vis de la détermination du nombre de L1M) puisque la charge parasitaire est uniquement de 1% (Figure 28).

D'autre part, l'infectiosité des L1NN a décru en fonction du temps d'incubation en milieu de culture des L1NN ; à J_0 , une infectiosité de 30% a été obtenue, alors qu'à J+4 et à J+6 elle était de 11% et de 1% respectivement. Ainsi, les L1NN encore vivantes au bout de 6 jours de culture dans l'expérience précédente (80%) (Figure 27) ne semblent finalement plus infectieuses.

2. Conclusion

Par une approche transcriptomique, les différences d'expression de l'ARNm codant pour la protéine NBL1 chez *T. spiralis* ont pu être mises en évidence au sein des 3 stades parasitaires étudiés (femelles J5, L1NN et L1M). L'expression est plus importante au stade L1NN mais n'est pas absente au stade L1M.

Suite à ces résultats, des essais d'extinction de l'expression du gène *nbl1* ont été réalisés en utilisant des siRNA spécifiques. Les étapes préliminaires ont permis de mettre en évidence un pourcentage de 30% de charge parasitaire avec *T. spiralis* lors d'infestation par des L1NN par voie intraveineuse. Ces essais *in vitro* et *in vivo* sur les L1NN n'ont pour le moment pas permis de mettre en évidence un phénotype par la technique d'ARNi.

IV. DISCUSSION GENERALE

Trichinella présente la particularité d'être un parasite pluricellulaire développant un cycle de vie principalement intracellulaire sauf pour le stade invasif L1 Nouveau-Nés (L1NN) pour lequel les larves sont libérées dans la circulation sanguine ou lymphatique afin d'atteindre les fibres musculaires. Ce stade est particulièrement intéressant puisqu'il est invasif et qu'il stimule une forte réponse du système immunitaire avec mise en place d'une réponse protectrice (Marti et al., 1987). Compte-tenu de cette particularité, l'analyse des protéines spécifiques des L1NN présente un intérêt afin d'identifier des cibles vaccinales et/ou de dépistage précoce.

Partie 1 : Exploration de la séquence protéique de NBL1 chez <u>Trichinella spp.</u>

Une protéase à sérine nommée NBL1 a été identifiée précédemment au laboratoire, par immunocriblage d'une banque soustractive du stade L1NN. Les analyses conduites sur cette protéine ont permis de mettre en évidence un potentiel antigénique intéressant pour le développement d'outils de détection précoce des infestations à *Trichinella* chez le porc (FU Baoquan, 2005). L'analyse antigénique et la carte d'épitopes ont révélé le premier épitope peptidique et antigénique du stade L1NN présent dans le domaine C-terminal de NBL1 : NH2-RPTSPSSGSRPTYPS-CONH2. Ce domaine C-terminal a été exprimé sous forme de protéine recombinante, et a permis de détecter avec succès des infestations à *T. spiralis, T. britovi, T. nativa*, et *T. pseudospiralis* par ELISA indirect chez le porc et par la technique de Western Blot entre 20 jours et 60 jours post-infestation. Cet antigène représente ainsi un candidat majeur pour le dépistage précoce de la trichinellose porcine.

Par la suite, des études portant sur la partie C-terminale de la protéine NBL1 ont mis en évidence la reconnaissance spécifique de la forme native de NBL1 par un anticorps monoclonal dirigé contre cette partie et la localisation de NBL1 au niveau de la cuticule des embryons présents dans les femelles gestantes (Yang et al., 2015). De plus, une cartographie d'épitopes constituée de peptides de 15 acides aminés couvrant le domaine C-terminal de NBL1 a conduit à l'identification de la séquence reconnue par cinq clones d'anticorps monoclonaux. Il s'agit d'une séquence de 10 acides aminés (PSSGSRPTYP) répétée quatre fois (Boireau P et al., 2007). Cette cartographie d'épitopes a également permis d'identifier par immunoempreinte (Western-Blot) les épitopes reconnus par différents échantillons de sérum provenant d'animaux (souris, porc, sanglier) expérimentalement infestés par *Trichinella*.



Figure 29 : Alignement protéogénomique, réalisé par Multalin, des séquences protéiques du gène *nbl1* de *T. spiralis*, et du gène chymotrypsine C de *T. spiralis*.

Les bases bleues correspondent à une concordance parfaite entre les 2 séquences ; les bases rouges ou noires correspondent à une non concordance.

1. Au niveau de la séquence nucléotidique

Les résultats obtenus lors de ce travail sur les séquences génomiques des espèces *T. spiralis*, *T. britovi*, *T. nativa*, et *T. pseudospiralis*, confirment la forte similarité de la séquence de NBL1 entre ces 4 espèces et principalement au niveau de la partie C-terminale.

Lors de l'analyse du pourcentage d'identité entre les séquences nucléotidiques des 4 espèces analysées, 88% à 98% d'identité ont été mis en évidence. Ces pourcentages correspondent aux 4 isolats analysés (*T. spiralis* ISS 004, *T. nativa* ISS 042, *T. britovi* ISS 235 et *T. pseudospiralis* ISS 13). Il serait intéressant de vérifier si ces résultats sont reproductibles avec d'autres isolats des mêmes espèces. Cela pourrait mettre en avant des éventuelles mutations au cours de l'évolution de ces espèces.

2. Au niveau de la séquence protéique

Cette étude des protéines déduites à partir des cDNA des différentes espèces analysées, a mis en évidence la présence d'un peptide de 5 acides aminés (GSRPT) répété 7 fois chez ces 4 espèces au niveau de la partie C-terminale. Ce peptide de 5 acides aminés est présent dans les différents peptides utilisés lors de la cartographie d'épitopes qui avait été réalisée sur cette protéine et est plus précisément présent dans le peptide de 10 acides aminés (PSSGSRPTYP) déjà mis en évidence pour sa forte antigénicité. L'épitope qui semble être primordial pour l'antigénicité de la protéine NBL1 est : GSRPT. Cela permet indirectement de confirmer la spécificité de l'ELISA indirect développé par de précédentes études sur ces 4 espèces de *Trichinella* (FU Baoquan, 2005).

Les premières analyses du protéome de *T. spiralis* à différents stades (L1M, Adultes H62, Adultes J5, Adultes J5+2, L1NN), 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. Sa 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 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 (Figure 29). Les différences entre ces 2 protéines sont les suivantes:

- au niveau de la partie N terminale de NBL1 SS2, il y présence de 35 acides aminés ;
- au niveau de la partie C Terminale de la Chymotrypsine C, il y a présence de 117 acides aminés ;
- 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 SPSSGSRPT est répétée une fois de plus au niveau de la Chymotrypsine C (position : 398 à 406).

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 : séquences SS2 et SS2-1. 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 signifier que ces protéines sont portées par deux gènes différents. Comme ces deux gènes montrent de très hauts degrés 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. D'autre part, le nom « Chymotrypsine-C » a été donné à trois autres séquences chez *T. spiralis* complètement différentes de celle-ci (numéro UniProtKB : A0A0V1C1N0, E5SE11 et E5SE62). Il est donc possible que la séquence proche de NBL1 ne soit pas une Chymotrypsine-C, bien qu'elle semble bien avoir des fonctions chymotrypsine (analyses *in silico*).

La mise en évidence de cette protéine Chymotrypsine C (n° accession GenBank : KRY40297.1) ayant un 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 (PSSGSRPTYP) qui est présente sur la protéine NBL1, mais également sur la Chymotrypsine C et potentiellement sur d'autres protéases trypsine- like non identifiées à ce jour. 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.

Partie 2 : Application du siRNA spécifique de NBL1

En l'absence de la possibilité d'obtenir des mutants stables chez le nématode parasite *Trichinella*, l'ARNi reste l'une des seules approches à l'heure actuelle pour étudier la fonctionnalité *in vivo* d'une protéine par inactivation transitoire. Le fait que cette technologie ait déjà été réalisée sur le ver libre *C. elegans* depuis quelques années et chez *T. spiralis* depuis 2012, nous a confortés dans l'idée d'utiliser cette approche technologique dans notre travail. Cependant, les limites de la technique sont à prendre en considération lors de l'utilisation des siRNA lors d'expérimentations. Cette technique a une action transitoire, et par ailleurs ne permet pas une inhibition à 100% de la protéine cible. De fait, cela représente un facteur limitant dans l'efficacité de l'inactivation de l'expression du gène ciblé. Dans ces conditions, il est donc important de bien connaitre le type cellulaire et/ou la fonction ciblés afin d'utiliser au mieux cette technique et de mettre en évidence un phénotype quantifiable. Dans notre étude, la particularité du stade L1NN est d'une part la difficulté de cultiver le parasite *in vitro*, et d'autre part le peu de marqueurs phénotypiques quantifiables. Puisque nos travaux ciblent la protéine NBL1 qui pourrait être impliquée dans la migration du parasite de l'intestin jusqu'aux muscles mais également dans l'installation du parasite dans la fibre musculaire, il est donc important d'analyser l'impact de l'inactivation *in vivo*, aucun modèle ne permettant d'étudier ces phases du cycle parasitaire *in vitro*.

1. <u>Comparaison du taux de transcrits de NBL1 à différents stades parasitaires</u> <u>de *T. spiralis*</u>

La mise en place de la technologie de l'ARNi nécessite la connaissance des transcrits de la protéine cible, ici NBL1. Pour cela, la détection de la cible par PCR en temps réel était nécessaire ainsi que celle d'un gène de ménage, afin d'étudier l'expression de NBL1 à différents stades parasitaires. Des oligonucléotides ont été dessinés permettant spécifiquement l'amplification du cDNA rétrotranscrit à partir de l'ARN de *nbl1* (gène d'intérêt) et d'autres oligonucléotides permettant l'amplification du cDNA des gènes de ménage actine (*act*) et de l'Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 (*eif3C*) mais également des ADN génomiques correspondants, afin de vérifier la bonne extraction des ARN totaux sans contamination par l'ADN génomique.

Cette étude a montré que le gène *nbl1* est fortement exprimé au sein du stade L1NN ; cela montre l'importance de cette protéine à ce stade. Les études antérieures faites par Northern Blot n'ont pas montré la présence de l'ARN de *nbl1* au sein du stade L1M, or notre étude a montré sa présence à un faible niveau d'expression à ce stade parasitaire. Cela pourrait s'expliquer par la technologie utilisée : la Reverse Transcriptase suivie d'une PCR en temps réel (RT-qPCR) est plus sensible que la technique de Northern Blot effectuée il y a un dizaine d'années. Ainsi il est donc intéressant d'utiliser le stade L1NN

pour faire les premiers essais d'ARN à interférence dans le but de mieux comprendre le rôle de la protéine NBL1 dans l'installation des larves L1NN chez l'hôte.

2. Etude de siRNA ciblant le transcript du gène codant pour nbl1

Jusqu'à présent peu d'études utilisant la technologie de l'interférence à l'ARN ont été réalisées au stade L1M et Adulte de *Trichinella* puisque seulement trois articles ont été publiés. Ces travaux d'inactivation de gênes par l'ARN à interférence mettent en avant une diminution des ARNm de l'ordre de 60% et du succès parasitaire lors d'infestation de 20% à 60% sur les stades Adulte et L1M de *T. spiralis* (Chen et al., 2012; Wang et al., 2015; Zhang et al., 2016). Les modes d'administration des siRNA à des concentrations entre 2µM et 8µM étaient les suivants : un trempage pendant 6 jours ou une électroporation puis une incubation pendant 6 jours. Nous avons retenu dans notre étude l'administration par trempage qui nous a semblé moins traumatique pour les L1NN, et sachant que l'ingestion d'une siRNA est possible par ingestion du parasite à ce stade. De plus, les L1NN sont relativement fragiles car elles ne disposent pas d'une cuticule épaisse comme celle des L1M, donc l'électroporation ne serait pas favorable à la survie des L1NN.

Le fait que les protéines impliquées dans le processus de l'ARN à interférence sont présentes chez *Trichinella* et l'implication fortement supposée de NBL1 lors de l'installation des L1NN chez l'hôte, nous ont conduits à envisager l'étude du rôle de la protéine NBL1 au sein du parasite par la technique de l'ARN à interférence. L'originalité de notre étude est le stade L1NN puisque les différentes publications sur *Trichinella* décrivent l'utilisation de cette technique sur les stades L1M et Adultes (Chen et al., 2012; Wang et al., 2015; Zhang et al., 2016). L'étude de ce stade est délicate d'une part car il n'existe pas de modèles *in vitro* pour étudier l'installation du parasite dans la fibre musculaire et d'autre part car il faut réinjecter les L1NN par voie intraveineuse afin de quantifier le succès de l'installation parasitaire par évaluation de la charge musculaire.

Notre travail a mis en évidence que 30% des L1NN injectées vont finalement évoluer jusqu'au stade L1M que l'on quantifie par digestion chlorhydro-pepsique de la masse musculaire totale. Deux hypothèses sont envisageables, soit le taux de survie des L1NN isolées *in vitro* puis injectées n'est que de 30% dans la circulation sanguine ou lymphatique, soit seulement 30% des L1NN arrivent à se développer jusqu'au stade L1M lorsqu'elles atteignent la cellule musculaire. Les 30% de récupération de larves L1M au niveau de l'hôte étaient donc à prendre en considération dans nos travaux afin d'initier notre inhibition transitoire sur un nombre suffisamment important de L1NN et d'estimer l'impact de cette inactivation sur l'installation dans les fibres musculaires. L'étude de l'extinction du gène *nbl1* par la technique de l'ARNi nécessite une ingestion du siRNA par le parasite. Au sein du laboratoire de l'Anses de Maisons-Alfort, la visualisation par trempage de l'ingestion d'un fluorochrome et d'un siRNA non spécifique couplé à un fluorochrome par les stades L1M, Adultes J5 et L1NN a été réalisée.

Un autre critère important pour évaluer notre modèle d'étude, a été d'estimer le temps de survie des L1NN in vitro en présence ou en absence du siRNA spécifique du gène nbl1. Cette étude n'a pas mis en évidence de différence en présence et absence du siRNA spécifique. Ces résultats indiquent une viabilité des L1NN de 80% à 6 jours de culture et qui diminue jusqu'à 20% de viabilité à 8 jours. Ainsi, passé 6 jours de culture in vitro, il n'est pas envisageable d'inoculer des L1NN aux souris pour une expérimentation in vitro. L'étude in vivo a confirmé cette hypothèse puisque la charge parasitaire est de 1% après inoculation par voie intraveineuse de L1NN ayant été en culture in vitro pendant 6 jours. Il est à noter qu'après 4 jours de culture des L1NN, la charge parasitaire est de 11% alors qu'à J₀, la charge parasitaire est de 30%. L'expérimentation in vivo pour infecter des souris par des L1NN préalablement incubées avec un siRNA spécifique de la protéine NBL1, pendant 4 ou 6 jours, n'a pas donné de résultat concluant sur l'implication de la protéine NBL1 lors de l'installation du parasite chez la souris. En fait, il n'est pas possible de conclure pour l'instant sur ces essais d'inactivation in vivo puisque nous sommes face à certaines difficultés techniques. En effet, il apparaît que les conditions de maintien en culture des L1NN ne sont pas optimales pour permettre de maintenir leur infectiosité puisque le taux de succès parasitaire diminue très rapidement avec le temps de mise en culture. Cependant, l'éventualité que le stade L1NN de Trichinella ne soit pas capable d'utiliser la machinerie de l'ARN à interférence contrairement aux stades Adultes et L1M est à prendre en considération. Cependant, des expérimentations complémentaires sont nécessaires afin de vérifier l'efficacité du siRNA sur le gène nbl1. Il serait nécessaire de déterminer le niveau d'expression des ARNm (par RT qPCR) et de la protéine NBL1 (par western Blot) afin de confirmer ou non l'action du siRNA. Notre première approche de la technique de l'ARN interférence par des siRNA sur les L1NN, s'est focalisée sur un effet visible ou non de l'extinction du gène nbl1 sur les L1NN.

En parallèle de ce travail, des études protéomiques des différents stades parasitaires de *T. spiralis* ont été réalisées au sein du laboratoire et ont permis de mettre en évidence la présence de la protéine NBL1 chez les femelles gravides. Cela signifie que la protéine NBL1 est déjà synthétisée avant l'expulsion des L1NN par les femelles et donc que le siRNA ne peut agir que partiellement sur l'extinction de cette protéine. Il serait donc intéressant de cibler les femelles tout justes fécondées (entre 2 et 5 jours post-infestation). Il est à noter que ce stade pose des contraintes techniques car chaque femelle et chaque L1NN seront à des stades de développement différents lors de la récupération *in vitro*; il est impossible d'obtenir des populations parasitaires synchronisées avec des femelles ayant été fécondées au même moment. De plus, dans ce cas de figure, la contrainte serait que le siRNA puisse pénétrer au sein des L1NN encore dans l'utérus des femelles avant que ces L1NN soient expulsées par les femelles. Nous n'avons jusqu'à présent pas de données qualitatives ni quantitatives sur la diffusion des siRNA dans les tissus de *Trichinella*.

V. PERSPECTIVES

La lutte contre les maladies infectieuses est tributaire de la recherche fondamentale comme de la recherche appliquée. Dans le cas de la trichinellose qui est une des zoonoses parasitaires majeures émergentes et ré-émergentes au niveau mondial, cette lutte se fonde également sur une part de recherche fondamentale, par l'identification des facteurs clés du cycle parasitaire de *Trichinella* liés à sa virulence, à sa persistance ou à l'induction d'une réponse immunitaire de son hôte ; et sur une part de recherche appliquée, qui découle de la recherche fondamentale, par la mise en place d'outils de lutte comme la vaccination ou la détection précoce par des techniques sérologiques.

Les espèces *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi* et *T. pseudospiralis* sont les espèces les plus repandues au niveau mondial, il est donc important d'orienter les études sur ces quatre espèces avec une priorité pour l'espèce *T. spiralis* qui est la principale cause de trichinellose humaine. Ce travail a porté sur l'étude au niveau fondamental de ce parasite par une approche ciblée sur l'étude de la protéine NBL1 au sein du stade L1NN.

Dans une première partie, les séquences génomiques codant pour la protéine NBL1 des quatre principales espèces ont été comparées *in silico*. Une forte similarité au niveau des séquences protéiques, déduites des séquences nucléotidiques, a été mise en évidence, en particulier dans la partie C-terminale de cette protéine qui est fortement antigénique. La partie C-terminale de la protéine NBL1 a également été retrouvée au niveau d'une protéine nommée « Chymotrypsine C » (publié en 2015). A l'heure actuelle aucune étude n'a été faite sur cette protéine Chymotrypsine C. Le fait que la séquence immunogène de NBL1 (10 acides aminés / PSSGSRPTYP) soit retrouvée au niveau d'une autre protéine, soulève la question de la spécificité de l'antigène ciblé par l'ELISA indirect développé et les premiers essais vaccinaux mais pourrait également expliquer la forte efficacité.

Cependant, il serait intéressant d'étudier l'expression et la localisation de la Chymotrypsine C au sein des différents stades parasitaires de *Trichinella*. Des expérimentations par Western Blot utilisant l'anticorps monoclonal dirigé contre le peptide immunogène de 10 acides aminés (PSSGSRPTYP) et de l'Ag total soluble de *Trichinella*, ont uniquement mis en évidence la protéine NBL1. La non détection de la protéine Chymotrypsine C lors de ces expérimentations peut s'expliquer par le fait qu'elle est insoluble. L'étude par RT qPCR pourra également nous donner des informations sur l'expression des ARNm aux différents stades parasitaires ; cela pourra se faire en ciblant la partie C-terminale de la protéine Chymotrypsine C qui est absente de la protéine NBL1.

L'étude d'éventuelles autres protéases trypsine-like présentes au stade L1NN et ayant en commun cette séquence C-terminale devrait également être entreprise. L'anticorps monoclonal anti-NBL1 reconnaissant l'épitope PSSGSRPTYP dont nous disposons pourrait permettre l'immuno-précipitation des
protéines présentes au stade L1NN et partageant cet épitope, et l'analyse des protéines éluées par spectrophotométrie de masse pourrait être réalisée.

Dans une seconde partie, la technologie de l'ARN à interférence a été utilisée afin d'étudier le rôle de la protéine NBL1. Ces premiers essais sur le stade L1NN n'ont pas permis de visualiser une diminution de la charge parasitaire après ingestion de siRNA spécifique du gène *nbl1* par L1NN. Certains problèmes techniques et biologiques ont été mis en avant. Les L1NN perdent leur virulence lorsqu'elles ont été cultivées plus de 4 jours en milieu de culture basique ; cela pose donc un problème majeur lors de la mise en œuvre de la technique d'ARN à interférence. La composition du milieu de culture pourra être améliorée en se rapprochant au maximum de la composition du sang et de la lymphe (ajout de protéines, hormones, et nutriments), ce qui pourrait limiter cette perte de virulence et permettre de visualiser un effet du siRNA sur le stade L1NN. Les conditions d'entrée des siRNA chez les L1NN pourraient également être améliorées, par électroporation éventuellement (l'intégration du siRNA dans les cellules pourrait être plus rapide que par ingestion lors du trempage), une concentration en siRNA différente (dose inférieure ou supérieure à 5 µM), un temps de culture et d'action *in vitro* diminué (temps inférieur à 4 jours) ou même en utilisant des dsRNA (double-stranded RNA) ciblant l'ARNm (l'utilisation des dsRNA a montré son efficacité chez *T. spiralis*).

Une autre alternative à la culture *in vitro* des L1NN puis l'injection *in vivo* pourrait être envisagée : incuber sous perfusion un muscle de souris (type muscle de la cuisse) et injecter directement par canulation des vaisseaux les larves L1NN ayant été incubées avec du siRNA ciblé contre NBL1. Ce modèle *ex vivo*, nous permettrait de court-circuiter la phase sanguine et lymphatique lors des injections intraveineuses et donc de diminuer le temps durant lequel les larves L1NN sont dans un milieu non favorable (milieu de culture). Ainsi cette technique pourrait permettre de visualiser plus facilement par microscopie l'installation des L1NN dans la cellule musculaire.

Les premiers essais d'inactivation protéique par l'interférence à ARN n'ont pas donné de résultat satisfaisant et aucune étude de cette technique sur le stade L1NN de *Trichinella* n'a pour le moment été publiée ; on peut se poser la question de savoir si les protéines impliquées dans le mécanisme de siRNA sont actives à ce stade. A l'heure actuelle, les études des gènes codant pour les protéines impliquées ont été faites au stade L1M (Dalzell et al., 2011). Les protéines totales (solubles et insolubles) du stade L1NN seront étudiées par spectrophotométrie de masse afin de déterminer la présence ou non des protéines impliquées dans le mécanisme de l'interférence à ARN. Nous disposons au laboratoire de la base de données brutes de protéomique pour le stade L1NN (Calvet, 2016), l'analyse de ces données sera donc conduite afin de vérifier la présence ou non au stade L1NN de ces protéines impliquées dans le mécanisme de l'interférence à ARN.

Dans le cas où cette technique d'ARN à interférence ne pourrait pas être utilisée sur le stade L1NN, une neutralisation du parasite chez les souris par l'anticorps monoclonal ciblant la protéine NBL1 puis une injection par voie intraveineuse de L1NN fraîchement isolées pourrait mettre en évidence une diminution de la charge parasitaire chez la souris. Les anticorps monoclonaux circulant dans le sang pourraient bloquer la fonction de NBL1 et ainsi limiter l'installation des L1NN dans le muscle.

Au final, cette étude a permis d'approfondir notre connaissance sur la protéine NBL1 même si nous ne sommes pas encore parvenus à identifier sa fonction *in vivo*. Nos travaux soulèvent un certain nombre de questions qu'il nous faudra résoudre pour atteindre cet objectif. L'identification de facteurs de virulence chez les L1NN, liés notamment à leur installation dans les muscles de l'hôte, reste une priorité dans la lutte contre *Trichinella* afin de développer de nouveaux outils efficaces de dépistage et de lutte.

BIBLIOGRAPHIE

Airas, N., Saari, S., Mikkonen, T., Virtala, A.-M., Pellikka, J., Oksanen, A., Isomursu, M., Kilpelä, S.-S., Lim, C.W., and Sukura, A. (2010). Sylvatic *Trichinella* spp. infection in Finland. J. Parasitol. *96*, 67–76.

Airas, N., Näreaho, A., Lindén, J., Tuomola, K., and Sukura, A. (2012). The different infectivity of *Trichinella spiralis* and *Trichinella nativa* in rat does not solely localize to enteral or parenteral phase. Parasitol. Res. *111*, 2281–2288.

Ancelle, T., Dupouy-Camet, J., Desenclos, J.C., Maillot, E., Savage-Houze, S., Charlet, F., Drucker, J., and Moren, A. (1998). A multifocal outbreak of trichinellosis linked to horse meat imported from North America to France in 1993. Am. J. Trop. Med. Hyg. *59*, 615–619.

Andrew Z. Fire, and Craig C.Mello (2006). for their discovery of RNA interference - gene silencing by double-stranded RNA. In The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006, p.

Arasu, P., Ellis, L.A., Iglesias, R., Ubeira, F.M., and Appleton, J.A. (1994). Molecular analysis of antigens targeted by protective antibodies in rapid expulsion of *Trichinella spiralis*. Mol. Biochem. Parasitol. *65*, 201–211.

Bi, K., Yang, J., Wang, L., Gu, Y., Zhan, B., and Zhu, X. (2015). Partially Protective Immunity Induced by a 20 kDa Protein Secreted by *Trichinella spiralis* Stichocytes. PLoS ONE *10*.

Boireau, P., Vayssier, M., Fabien, J.F., Perret, C., Calamel, M., and Soulé, C. (1997). Characterization of eleven antigenic groups in *Trichinella* genus and identification of stage and species markers. Parasitology *115*, 641–651.

Boireau, P., Vallée, I., Roman, T., Perret, C., Mingyuan, L., Gamble, H., and Gajadhar, A. (2000). *Trichinella* in horses: a low frequency infection with high human risk. Vet. Parasitol. *93*, 309–320.

Boireau P, Liu Myngyuan, Le Rhun D, Wu Xinping, Baoquan Fu, Le Guerhier F, Hernandez Bello R, Vallée I, and Bahuon C (2007). Polypeptides reconnus par des anticorps anti-*Trichinella* et leurs applications.

Britov V.A., and Boev S.N (1972). Taxonomic rank of various strains of *Trichinella* and their circulation in nature. Vestn. Akad. Nauk KSSR 27–32.

Bruschi, F., Dupouy-Camet, J., Kociecka, W., Pozio, E., and Bolas-Fernandez, F. (2002). Opinion on the diagnosis and treatment of human trichinellosis. Expert Opin. Pharmacother. *3*, 1117–1130.

Calvet, C. (2016). New proteomic tools for the identification of proteins influencing the infectivity of the parasitic nematode *Trichinella* (UMR BIPAR, Maisons-Alfort: Anses, LSAn).

Capó, V.A., Despommier, D.D., and Polvere, R.I. (1998). *Trichinella spiralis*: vascular endothelial growth factor is up-regulated within the nurse cell during the early phase of its formation. J. Parasitol. *84*, 209–214.

Chen, X., Yang, Y., Yang, J., Zhang, Z., and Zhu, X. (2012). RNAi-mediated silencing of paramyosin expression in *Trichinella spiralis* results in impaired viability of the parasite. PloS One 7, e49913.

Choy, W.F., Ng, M.H., and Lim, P.L. (1991). *Trichinella spiralis*: Light microscope monoclonal antibody localization and immunochemical characterization of phosphorylcholine and other antigens in the muscle larva. Exp. Parasitol. *73*, 172–183.

Connolly, B., Trenholme, K., and Smith, D.F. (1996). Molecular cloning of a myoD-like gene from the parasitic nematode, *Trichinella spiralis*. Mol. Biochem. Parasitol. *81*, 137–149.

Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res. *16*, 10881–10890.

Dalzell, J.J., McVeigh, P., Warnock, N.D., Mitreva, M., Bird, D.M., Abad, P., Fleming, C.C., Day, T.A., Mousley, A., Marks, N.J., et al. (2011). RNAi Effector Diversity in Nematodes. PLoS Negl. Trop. Dis. *5*.

De Bruyne A., Vallée I., Ancelle, T., Brochériou I., Bonafé A., Boireau P., and Dupouy-Camet, J. (2006). Trichinelloses. 8-517-NaN-10.

Despommier, D. (1998). How Does *Trichinella spiralis* Make Itself at Home? Parasitol. Today 14, 318–323.

Despommier, D.D. (1990). Trichinella spiralis: The worm that would be virus. Parasitol. Today 6, 193–196.

Despommier, D., Symmans, W.F., and Dell, R. (1991). Changes in nurse cell nuclei during synchronous infection with *Trichinella spiralis*. J. Parasitol. 77, 290–295.

Despommier, D.D., Sukhdeo, M., and Meerovitch, E. (1978). *Trichinella spiralis*: Site selection by the larva during the enteral phase of infection in mice. Exp. Parasitol. *44*, 209–215.

Despommier, D.D. (1983). Biology. In: "Trichinella and trichinosis" (W. C. Campbell).

Despommier, D.D., Gwadz, R.W., Hotez, P.J., and Knirsch, C.A. (2000). Parasitic Diseases (New York).

Dorny, P., Praet, N., Deckers, N., and Gabriel, S. (2009). Emerging food-borne parasites. One World One Health Parasites Chang. LandscapePlenary Lect. Present. 22nd Int. Conf. World Assoc. Adv. Vet. Parasitol. Alta. Can. 9-13 August 2009 *163*, 196–206.

Dubey, J.P., Hill, D.E., and Zarlenga, D.S. (2006). A *Trichinella murrelli* infection in a domestic dog in the United States. Vet. Parasitol. *137*, 374–378.

Dupouy-Camet, J. (2000). Trichinellosis: a worldwide zoonosis. Vet. Parasitol. 93, 191–200.

Dupouy-Camet, J., Paugam, A., De Pinieux, G., Lavarde, V., and Vieillefond, A. (2001). *Trichinella murrelli*: pathological features in human muscles at different delays after infection. Parasite Paris Fr. *8*, S176-179.

Dupouy-Camet, J., Talabani, H., and Ancelle, T. (2010). [Trichinellosis]. Rev. Prat. 60, 159–164.

Dupouy-Camet, J., Yera, H., Dahane, N., Bouthry, E., and Kapel, C.M.O. (2016). A cluster of three cases of trichinellosis linked to bear meat consumption in the Arctic. J. Travel Med. 23, taw037.

Ellis, L.A., McVay, C.S., Probert, M.A., Zhang, J., Bundle, D.R., and Appleton, J.A. (1997). Terminal βlinked tyvelose creates unique epitopes in *Trichinella spiralis* glycan antigens. Glycobiology *7*, 383–390.

European Food Safety Authority, and European Centre for Disease Prevention and Control (2014). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012 | European Food Safety Authority. 192.

FU Baoquan (2005). Clonage moléculaire et caractéristique d'antigènes des stades larves nouveau-nées et adultes de *Trichinella spiralis* et développement d'un test ELISA pour le diagnostic précoce de la trichinellose chez le porc. Université Paris XII.

Gamble, H.R. (1985). *Trichinella spiralis*: immunization of mice using monoclonal antibody affinity-isolated antigens. Exp. Parasitol. *59*, 398–404.

Gamble, H.R., Pozio, E., Bruschi, F., Nöckler, K., Kapel, C.M., and Gajadhar, A.A. (2004). International Commission on Trichinellosis: recommendations on the use of serological tests for the detection of *Trichinella* infection in animals and man. Parasite Paris Fr. *11*, 3–13.

Gao, Z., Wang, M., Blair, D., Zheng, Y., and Dou, Y. (2014). Phylogenetic Analysis of the Endoribonuclease Dicer Family. PLoS ONE 9.

Garcia, H.H., Gonzalez, A.E., Tsang, V.C.W., O'Neal, S.E., Llanos-Zavalaga, F., Gonzalvez, G., Romero, J., Rodriguez, S., Moyano, L.M., Ayvar, V., et al. (2016). Elimination of *Taenia solium* Transmission in Northern Peru. N. Engl. J. Med. *374*, 2335–2344.

Garkavi, B.L. (1972). The species of Trichinella isolated from wild carnivores. Veterinariia 10, 90–91.

Gómez-Morales, M.A., Ludovisi, A., Amati, M., Cherchi, S., Pezzotti, P., and Pozio, E. (2008). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Human Trichinellosis. Clin. Vaccine Immunol. CVI *15*, 1723–1729.

Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. *41*, 95–98.

Hall, R.L., Lindsay, A., Hammond, C., Montgomery, S.P., Wilkins, P.P., Da Silva, A.J., McAuliffe, I., De Almeida, M., Bishop, H., Mathison, B., et al. (2012). Outbreak of human trichinellosis in Northern California caused by *Trichinella murrelli*. Am. J. Trop. Med. Hyg. *87*, 297–302.

Harley, J.P., and Gallicchio, V. (1971). *Trichinella spiralis*: Migration of larvae in the rat. Exp. Parasitol. *30*, 11–21.

Hassanain, M.A., Hassanain, N.A., and El-Mogazy, F.M. (2004). Identification of immunoreactive proteins of *Trichinella spiralis* adult and adult excretory/secretory (E/S) antigens in sera of human and animals. J. Egypt. Soc. Parasitol. *34*, 281–295.

Hill, D.E., Samuel, M.D., Nolden, C.A., Sundar, N., Zarlenga, D.S., and Dubey, J.P. (2008). *Trichinella murrelli* in scavenging mammals from south-central Wisconsin, USA. J. Wildl. Dis. *44*, 629–635.

Kanai, Y., Inoue, T., Mano, T., Nonaka, N., Katakura, K., and Oku, Y. (2007). Epizootiological survey of *Trichinella* spp. infection in carnivores, rodents and insectivores in Hokkaido, Japan. Jpn. J. Vet. Res. *54*, 175–182.

Kapel, C.M. (2000). Host diversity and biological characteristics of the *Trichinella* genotypes and their effect on transmission. Vet. Parasitol. 93, 263–278.

Khan, Z.A. (1966). The Postembryonic Development of *Trichinella spiralis* with Special Reference to Ecdysis. J. Parasitol. *52*, 248–259.

Ko, R.C., and Fan, L. (1996). Heat shock response of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis*. Parasitology *112 (Pt 1)*, 89–95.

Krivokapich, S.J., Prous, C.L.G., Gatti, G.M., Confalonieri, V., Molina, V., Matarasso, H., and Guarnera, E. (2008). Molecular evidence for a novel encapsulated genotype of *Trichinella* from Patagonia, Argentina. Vet. Parasitol. *156*, 234–240.

Krivokapich, S.J., Pozio, E., Gatti, G.M., Prous, C.L.G., Ribicich, M., Marucci, G., La Rosa, G., and Confalonieri, V. (2012). *Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America. Int. J. Parasitol. *42*, 903–910.

La Grange, L.J., Marucci, G., and Pozio, E. (2010). *Trichinella zimbabwensis* in a naturally infected mammal. J. Helminthol. *84*, 35–38.

La Rosa, G., Marucci, G., Zarlenga, D.S., Casulli, A., Zarnke, R.L., and Pozio, E. (2003). Molecular identification of natural hybrids between *Trichinella nativa* and *Trichinella* T6 provides evidence of gene flow and ongoing genetic divergence. Int. J. Parasitol. *33*, 209–216.

Larter, N.C., Forbes, L.B., Elkin, B.T., and Allaire, D.G. (2011). Prevalence of *Trichinella* spp. in black bears, grizzly bears, and wolves in the Dehcho Region, Northwest Territories, Canada, including the first report of T. nativa in a grizzly bear from Canada. J. Wildl. Dis. *47*, 745–749.

Lee, D.L., Ko, R.C., Yi, X.Y., and Yeung, M.H. (1991). *Trichinella spiralis*: antigenic epitopes from the stichocytes detected in the hypertrophic nuclei and cytoplasm of the parasitized muscle fibre (nurse cell) of the host. Parasitology *102 Pt 1*, 117–123.

Liu, Q., and Paroo, Z. (2010). Biochemical Principles of Small RNA Pathways. Annu. Rev. Biochem. 79, 295–319.

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.

Malakauskas, A., and Kapel, C.M.O. (2003). Tolerance to low temperatures of domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in rat muscle tissue. J. Parasitol. *89*, 744–748.

Marti, H.P., Murrell, K.D., and Gamble, H.R. (1987). *Trichinella spiralis*: Immunization of pigs with newborn larval antigens. Exp. Parasitol. *63*, 68–73.

Marucci, G., La Grange, L.J., La Rosa, G., and Pozio, E. (2009). *Trichinella nelsoni* and *Trichinella* T8 mixed infection in a lion (Panthera leo) of the Kruger National Park (South Africa). Vet. Parasitol. *159*, 225–228.

Millet, N.B., Hart, G.D., Reyman, T.A., Zimmerman, M.R., and Lewin, P.K. (1980). Mummification for the common people. In: "Mummies, Disease and Ancient Cultures » (Cockburn, T.A., Cockburn, E., E., Reyman, T.A.).

Moczon, T., and Wranicz, M. (1999). *Trichinella spiralis*: proteinases in the larvae. Parasitol. Res. *85*, 47–58.

Mukaratirwa, S., La Grange, L., and Pfukenyi, D.M. (2013). *Trichinella* infections in animals and humans in sub-Saharan Africa: A review. Acta Trop. *125*, 82–89.

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 gene1. Int. J. Parasitol. *29*, 1113–1120.

Nagano, I., Wu, Z., Nakada, T., Matsuo, A., and Takahashi, Y. (2001). Molecular cloning and characterization of a serine proteinase inhibitor from *Trichinella spiralis*. Parasitology *123*, 77–83.

Nagano, I., Wu, Z., Nakada, T., Boonmars, T., and Takahashi, Y. (2003). Molecular cloning and characterization of a serine proteinase gene of *Trichinella spiralis*. J. Parasitol. *89*, 92–98.

Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. Plant Cell *2*, 279–289.

Ortega-Pierres, M.G., Yepez-Mulia, L., Homan, W., Gamble, H.R., Lim, P.L., Takahashi, Y., Wassom, D.L., and Appleton, J.A. (1996). Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. Parasite Immunol. *18*, 273–284.

Owen, I.L., and Reid, S.A. (2007). Survival of *Trichinella papuae* muscle larvae in a pig carcass maintained under simulated natural conditions in Papua New Guinea. J. Helminthol. *81*, 429–432.

Perteguer, M.J., Rodríguez, E., Romarís, F., Escalante, M., Bonay, P., Ubeira, F.M., and Gárate, M.T. (2004). Minor interspecies variations in the sequence of the gp53 TSL-1 antigen of *Trichinella* define species-specific immunodominant epitopes. Mol. Immunol. *41*, 421–433.

Polvere, R.I., Kabbash, C.A., Capó, V.A., Kadan, I., and Despommier, D.D. (1997). *Trichinella spiralis*:Synthesis of Type IV and Type VI Collagen during Nurse Cell Formation. Exp. Parasitol. *86*, 191–199.

Pozio, E. (2005). The broad spectrum of *Trichinella* hosts: From cold- to warm-blooded animals. Vet. Parasitol. *13*2, 3–11.

Pozio, E. (2014). Searching for *Trichinella:* not all pigs are created equal. Trends Parasitol. 30, 4–11.

Pozio, E. (2015). *Trichinella* spp. imported with live animals and meat. Spec. Issue Spread Parasites Anim. Mov. *213*, 46–55.

Pozio, E. (2016). Trichinella pseudospiralis an elusive nematode. Vet. Parasitol.

Pozio, E., and Darwin Murrell, K. (2006). Systematics and Epidemiology of Trichinella.

Pozio, E., and La Rosa, G. (2000). *Trichinella murrelli* n. sp: etiological agent of sylvatic trichinellosis in temperate areas of North America. J. Parasitol. *86*, 134–139.

Pozio, E., and Zarlenga, D.S. (2013). New pieces of the Trichinella puzzle. Int. J. Parasitol. 43, 983–997.

Pozio, E., La Rosa, G., Murrell, K.D., and Lichtenfels, J.R. (1992). Taxonomic Revision of the Genus *Trichinella*. J. Parasitol. *78*, 654–659.

Pozio, E., De Meneghi, D., Roelke-Parker, M.E., and La Rosa, G. (1997). *Trichinella nelsoni* in carnivores from the Serengeti ecosystem, Tanzania. J. Parasitol. *83*, 1195–1198.

Pozio, E., Owen, I., La Rosa, G., Sacchi, L., Rossi, P., and Corona, S. (1999). *Trichinella papuae* n.sp. (Nematoda), a new non-encapsulated species from domestic and sylvatic swine of Papua New Guinea. Int. J. Parasitol. *29*, 1825–1839.

Pozio, E., Pence, D.B., La Rosa, G., Casulli, A., and Henke, S.E. (2001). *Trichinella* infection in wildlife of the southwestern United States. J. Parasitol. *87*, 1208–1210.

Pozio, E., Foggin, C., Marucci, G., La Rosa, G., Sacchi, L., Corona, S., Rossi, P., and Mukaratirwa, S. (2002). *Trichinella zimbabwensis* n.sp. (Nematoda), a new non-encapsulated species from crocodiles (Crocodylus niloticus) in Zimbabwe also infecting mammals. Int. J. Parasitol. *32*, 1787–1799.

Pozio, E., Gomez Morales, M.A., and Dupouy-Camet, J. (2003). Clinical aspects, diagnosis and treatment of trichinellosis. Expert Rev. Anti Infect. Ther. *1*, 471–482.

Pozio, E., Hoberg, E., La Rosa, G., and Zarlenga, D.S. (2009). Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus. Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis. *9*, 606–616.

Pozio, E., and La Rosa, G. (2003). PCR-derived methods for the identification of *Trichinella* parasites from animal and human samples. 299–309.

Reichard, M.V., Torretti, L., Snider, T.A., Garvon, J.M., Marucci, G., and Pozio, E. (2008). *Trichinella* T6 and *Trichinella nativa* in Wolverines (Gulo gulo) from Nunavut, Canada. Parasitol. Res. *103*, 657–661.

Reichard, M.V., Tiernan, K.E., Paras, K.L., Interisano, M., Reiskind, M.H., Panciera, R.J., and Pozio, E. (2011). Detection of *Trichinella murrelli* in coyotes (Canis latrans) from Oklahoma and North Texas. Vet. Parasitol. *182*, 368–371.

Ruetsch, C., Delaunay, P., Armengaud, A., Peloux-Petiot, F., Dupouy-Camet, J., Vallée, I., Polack, B., Boireau, P., and Marty, P. (2016). Inadequate labeling of pork sausages prepared in Corsica causing a trichinellosis outbreak in France. Parasite 23.

Sanmartín, M.L., Iglesias, R., Santamarina, M.T., Leiro, J., and Ubeira, F.M. (1991). Anatomical location of phosphorylcholine and other antigens on encysted *Trichinella* using immunohistochemistry followed by Wheatley's trichrome stain. Parasitol. Res. *77*, 301–306.

Skírnisson, K., Marucci, G., and Pozio, E. (2010). Trichinella nativa in Iceland: an example of Trichinella dispersion in a frigid zone. J. Helminthol. *84*, 182–185.

Soulé, C., Dupouy-Camet, J., Ancelle, T., Bourée, P., and Touratier, L (1991a). Etude du parasite. In La trichinellose : une zoonose en évolution, pp. 7–42.

Soulé, C., Dupouy-Camet, J., Ancelle, T., Bourée, P., and Touratier, L (1991b). La trichinellose : une zoonose en évolution (Office International des Epizooties).

Stewart, G.L., Despommier, D.D., Burnham, J., and Raines, K.M. (1987). *Trichinella spiralis*: Behavior, structure, and biochemistry of larvae following exposure to components of the host enteric environment. Exp. Parasitol. *63*, 195–204.

Su, X.Z., Prestwood, A.K., and McGraw, R.A. (1991). Cloning and expression of complementary DNA encoding an antigen of Trichinella spiralis. Mol. Biochem. Parasitol. *45*, 331–336.

Takahashi, Y. (1997). Antigens of *Trichinella spiralis*. Parasitol. Today Pers. Ed 13, 104–106.

Takahashi, Y., Homan, W., and Lim, P.L. (1993). Ultrastructural localization of the phosphorylcholine-associated antigen in *Trichinella spiralis*. J. Parasitol. *79*, 604–609.

Todorova, V.K., and Stoyanov, D.I. (2000). Partial characterization of serine proteinases secreted by adult *Trichinella spiralis*. Parasitol. Res. *86*, 684–687.

Touratier, L. (2001). A challenge of veterinary public health in the European Union: human trichinellosis due to horse meat consumption. Parasite Paris Fr. *8*, S252-256.

Vallée, I., Macé, P., Forbes, L., Scandrett, B., Durand, B., Gajadhar, A., and Boireau, P. (2007). Use of Proficiency Samples To Assess Diagnostic Laboratories in France Performing a *Trichinella* Digestion Assay. Int. Assoc. Food Prot. 1556–1769.

Vallée I, Lainé-Prade V, Versillé N, Deville S, Yang Y, Liu MY, and Boireau P (2012). High protection of pigs against *Trichinella spiralis* induced by a vaccine based on a combination of recombinant proteins (Shanghai, China).

Vallée I, Zanella G, and Boireau P (2016). Surveillance nationnale des trichinelloses animales: un dispositif efficace de protection des consommateurs. Bull. Epidémiologique Anses-DGAL.

Vassilatis, D.K., Despommier, D., Misek, D.E., Polvere, R.I., Gold, A.M., and Ploeg, L.H.V. der (1992). Analysis of a 43-kDa glycoprotein from the intracellular parasitic nematode *Trichinella spiralis*. J. Biol. Chem. 267, 18459–18465.

Vayssier, M., Le Guerhier, F., Fabien, J.F., Philippe, H., Vallet, C., Ortega-Pierres, G., Soule, C., Perret, C., Liu, M., Vega-Lopez, M., et al. (1999). Cloning and analysis of a *Trichinella britovi* gene encoding a cytoplasmic heat shock protein of 72 kDa. Parasitology *119 (Pt 1)*, 81–93.

Villella, J.B (1970). Trichinosis in Man and Animals. In Trichinosis in Man and Animals (S.E. Gould, Ed.), (Charles C. Thomas), pp. 19–60.

Wang, C.H., and Bell, R.G. (1986). *Trichinella spiralis*: Newborn larval migration route in rats reexamined. Exp. Parasitol. *61*, 76–85.

Wang, R., Wang, Z., and Cui, J. (2009). [Immunodiagnostic value and immune protection of the recombinant Ts21 antigen of *Trichinella spiralis*]. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi 27, 17–21.

Wang, Z.Q., Zhang, S.B., Jiang, P., Liu, R.D., Long, S.R., Zhang, X., Ren, H.J., and Cui, J. (2015). The siRNA-mediated silencing of *Trichinella spiralis* nudix hydrolase results in reduction of larval infectivity. Parasitol. Res.

Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L., and Sänger, H.L. (1994). RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. Cell *76*, 567–576.

Wright, K.A. (1979). *Trichinella spiralis:* An intracellular parasite in the intestinal phase. J. Parasitol. 65, 441–445.

Yang, J., Gu, Y., Yang, Y., Wei, J., Wang, S., Cui, S., Pan, J., Li, Q., and Zhu, X. (2010). *Trichinella spiralis*: Immune response and protective immunity elicited by recombinant paramyosin formulated with different adjuvants. Exp. Parasitol. *124*, 403–408.

Yang, J., Zhu, W., Huang, J., Wang, X., Sun, X., Zhan, B., and Zhu, X. (2016a). Partially protective immunity induced by the 14-3-3 protein from *Trichinella spiralis*. Vet. Parasitol.

Yang, Y., Yang, X., Gu, Y., Wang, Y., Zhao, X., and Zhu, X. (2013). Protective immune response induced by co-immunization with the *Trichinella spiralis* recombinant Ts87 protein and a Ts87 DNA vaccine. Vet. Parasitol. *194*, 207–210.

Yang, Y., Lacour, S.A., Lainé-Prade, V., Versillé, N., Grasset-Chevillot, A., Feng, S., Liu, M.Y., Boireau, P., and Vallée, I. (2015). *Trichinella spiralis* newborn larvae: characterization of a stage specific serine proteinase expression, NBL1, using monoclonal antibodies. Parasitology *142*, 783–790.

Yang, Y., Vallée, I., Lacour, S. a., Boireau, P., Cheng, S. p., and Liu, M. y. (2016b). Identification and characterization of immunodominant linear epitopes on the antigenic region of a serine protease in newborn *Trichinella* larvae. J. Helminthol. *90*, 232–237.

Yao, C., and Jasmer, D.P. (1998). Nuclear antigens in *Trichinella spiralis* infected muscle cells: nuclear extraction, compartmentalization and complex formation. Mol. Biochem. Parasitol. *92*, 207–218.

Yera, H., Andiva, S., Perret, C., Limonne, D., Boireau, P., and Dupouy-Camet, J. (2003). Development and Evaluation of a Western Blot Kit for Diagnosis of Human Trichinellosis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. *10*, 793–796.

Zarlenga, D.S., and Gamble, H.R. (1990). Molecular cloning and expression of an immunodominant 53kDa excretory-secretory antigen from *Trichinella spiralis* muscle larvae. Mol. Biochem. Parasitol. *4*2, 165– 174.

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*. Int. J. Parasitol. *29*, 1859–1867.

Zarlenga, D.S., Chute, M.B., Martin, A., and Kapel, C.M. (2001). A single, multiplex PCR for differentiating all species of *Trichinella*. Parasite Paris Fr. *8*, S24-26.

Zenker, F.A. (1860). Ueber die Trichinen-Krankheit des Menschen. (Pathol), p. pp.561-572.

Zhang, S.B., Jiang, P., Wang, Z.Q., Long, S.R., Liu, R.D., Zhang, X., Yang, W., Ren, H.J., and Cui, J. (2016). DsRNA-mediated silencing of Nudix hydrolase in *Trichinella spiralis* inhibits the larval invasion and survival in mice. Exp. Parasitol. *162*, 35–42.

Zhang, Y., Chen, D., Smith, M.A., Zhang, B., and Pan, X. (2012). Selection of Reliable Reference Genes in *Caenorhabditis elegans* for Analysis of Nanotoxicity. PLoS ONE *7*, e31849.

Zhu, D.Z., and Bell, R.G. (1990). *Trichinella spiralis*: murine strain variation in response to monoclonally defined, protective, nonstage-specific antigens. Exp. Parasitol. *70*, 330–343.

Zhu, X., Yang, J., Yang, Y., Boireau, P., Zhan, B., Feng, J., and Hotez, P. (2003). [Prokaryotic expression and characterization of an antigenic gene of adult Trichinella spiralis]. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi *21*, 16–19.

Zocevic, A., Lacour, S.A., Mace, P., Giovani, B., Grasset-Chevillot, A., Vallee, I., and Boireau, P. (2014). Primary characterization and assessment of a *T. spiralis* antigen for the detection of *Trichinella* infection in pigs. Vet. Parasitol. *205*, 558–567.

(2015). Reglement d'execution (UE) 2015/1375 de la commission du 10 aout 2015 fixant les règles applicables aux controles officiels concernant la présence de *Trichinella* dans les viandes. J. Off. Union Eur.

ANNEXES

<u>Annexe 1</u> : Alignement nucléotidique par espèce de *Trichinella* spp., réalisé par CLC Genomics, des différents fragments d'ADN génomique amplifiés par les couples d'oligonucléotides GP1/GP10 et GP1int/GP10int

A Amorce GP1 - Tspiralis+GP1 Amorce GP1int Tspiralis+GP1int Amorce GP10int Tspiralis+GP10 Tspiralis+GP10 Tsp_consensus_GP Consensus_	^{مو}	1000 T	1 500 	2000	17 739 24 914 23 1041 - 18 899 2264
Conservation 🚕 🚃					
B Amorce GP1 - Tnativa+GP1 Amorce GP1int Tnativa+GP1int Amorce GP10int Tnativa+GP10 Tnativa+GP10 Tnativa+GP10 Tna_consensus_GP Consensus_GP Conservation Conservation	500 1 	1 000 1	1 500 1 		17 493 24 948 23 1146 - 18 509 2149
C Amorce GP1 - Tbritovi+GP1 Amorce GP10int Tbritovi+GP10int Tbritovi+GP10 Tbr_consensus_GP Consensus Conservation Conservation	500 1 —	1 000 - -	1 500 1 	2000 	17 709 24 924 23 971 - 18 665 2241
D Amorce GP1 - Amorce GP1int Tpseudo+GP1int Amorce GP10int Amorce GP10 Tps_consensus_GP Consensus_ Conservation	500 I 		1 500 	2000	17 24 907 23 1110 - 18 1133

Dose (L1NN)	IV	nombre de L1M récupérées	Moyenne des L1M récupérées	% des L1M récupérées	% moyen des L1M récupérées		
	+	17		23%			
	+	39		53%			
74	+	39	25,8	53%	34,9%		
	+	26		35%			
	+	8		11%			
	+	131		18%			
	+	207		28%	24,9%		
740	+	311	184,4	42%			
	+	144		19%			
	+	129		17%			
	+/-	83	/	1%	SO		
	+	46	/	1%	SO		
7400	+	2010		27%	_		
	+	770	2610	10%	35,3%		
	+	5050		68%	1		

Annexe 2 : Résultats bruts du protocole d'infestation des souris par voie intraveineuse avec des L1NN

IV : Injection intraveineuse ; + : injection intraveineuse réussie (retour de sang) ; +/- : injection intraveineuse non réussie (pas de retour de sang) ; SO : sans objet (donnée non prise en compte lors de l'analyse)

Annexe 3: Résultats bruts du protocole pour l'étude de la mortalité in vitro

	Nombre total de L1NN (mortes et vivantes)						
Contrôle (absence de siRNA)	42	50	66	53	54		
Présence de siRNA NBL1	45	50	37	31	27		

	N	Nombre de L1NN mortes à H +1								
Contrôle (absence de siRNA	6	5	3	4	4					
(% de mortalité)	(14,3%)	(10,0%)	(4,5%)	(7,5%)	(7,4%)	8,8%				
Présence de siRNA NBL1	2	4	3	4	2					
(% de mortalité)	(4,4%)	(8,0%)	(8,1%)	(12,9%)	(7,4%)	8,2%				

	No	% moyen de mortalité				
Contrôle (absence de siRNA	6	5	3	4	4	
(% de mortalité)	(14,3%)	(10,0%)	(4,5%)	(7,5%)	(7,4%)	8,8%
Présence de siRNA NBL1	3	4	3	4	3	
(% de mortalité)	(6,7%)	(8,0%)	(8,1%)	(12,9%)	(11,1%)	9,4%

	Ν	% moyen de mortalité				
Contrôle (absence de siRNA	6	5	3	4	4	
(% de mortalité)	(14,3%)	(10,0%)	(4,5%)	(7,5%)	(7,4%)	8,8%
Présence de siRNA NBL1	3	4	3	4	3	
(% de mortalité)	(6,7%)	(8,0%)	(8,1%)	(12,9%)	(11,1%)	9,4%

	N	Nombre de L1NN mortes à J +5								
Contrôle (absence de siRNA	7	6	5	7	7					
(% de mortalité)	(16,7%)	(12,0%)	(7,6%)	(13,2%)	(13,0%)	12,5%				
Présence de siRNA NBL1	4	5	3	6	4					
(% de mortalité)	(8,9%)	(10,0%)	(8,1%)	(19,4%)	(14,8%)	12,2%				

=>Ajout de Glutamine à 2% de 100mM à J+5

	I	Nombre de L1NN mortes à J +6								
Contrôle (absence de siRNA	12	8	7	9	10					
(% de mortalité)	(28,6%)	(16,0%)	(10,6%)	(17,0%)	(18,5%)	18,1%				
Présence de siRNA NBL1	9	5	4	6	9					
(% de mortalité)	(20,0%)	(10,0%)	(10,8%)	(19,4%)	(33,3%)	18,7%				

	I	Nombre de L1NN mortes à J +8								
Contrôle (absence de siRNA	36	39	57	46	49					
(% de mortalité)	(85,7%)	(78,0%)	(86,4%)	(86,8%)	(90,7%)	85,5%				
Présence de siRNA NBL1	43	42	25	24	23					
% de mortalité	(95,6%)	(84,0%)	(67,6%)	(77,4%)	(85,2%)	81,9%				

	N	Nombre de L1NN mortes à J +11								
Contrôle (absence de siRNA	42	50	66	53	54	/				
% de mortalité	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	100,0%				
Présence de siRNA NBL1	45	50	37	31	27	/				
% de mortalité	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	100,0%				

	Dose inoculée (L1NN)	Puce n°	IV	nombre de L1M récupérées	Moyenne de L1M	% de L1M récupérées	% moyen de L1M
	797	258	-	8	SO	1,0%	SO
	776	254	+/-	66	SO	8,5%	SO
Contrôle J+4	779	315	+	98		12,6%	
	779	251	+	82	96	10,5%	12,3%
	787	313	+	108		13,7%	
	774	260	-	16	SO	2,1%	SO
	781	319	+	160		20,5%	
siRNA n°1	782	252	+	55		7,0%	10.000
J+ 4	776	318	+	84	108	10,8%	13,8%
	782	316	+	132		16,9%	
	786	317	+/-	30	SO	3,8%	SO/
	776	257	+	63		8,1%	
siRNA n°2	770	311	+	91		11,8%	11,5%
514	789	314	+	145	90	18,4%	
	789	259	+	60		7,6%	
	794	255	+	93		11,7%	
	794	253	+	104		13,1%	
siRNA n°3	786	312	+	82	81	10,4%	10,2%
574	798	320	+	42		5,3%	-
	785	256	+	84		10,7%	
	770	088	+	10		1,3%	
	795	090	+	4		0,5%	
Contrôle J+6	780	089	+	15	9	1,9%	1,1%
	792	087	+	5		0,6%	
	790	302	+	10		1,3%	
	794	307	+	4		0,5%	
	797	310	+	3		0,4%	
siRNA n°1	776	084	+	11	8	1,4%	1,0%
5+0	792	304	+	15		1,9%	
	790	083	+	8		1,0%	
	777	301	+/-	2	SO	0,3%	SO
	788	086	+/-	3	SO	0,4%	SO
siRNA n°2	773	308	+	1		0,1%	
J+0	786	085	+	7	5	0,9%	0,7%
	776	306	+	8		1,0%	

Annexe 4: Résultats bruts du protocole pour l'étude de l'infectiosité in vivo

	Dose inoculée (L1NN)	Puce n°	IV	nombre de L1M récupérées	Moyenne de L1M	% de L1M récupérées	% moyen de L1M
	792	082	+	11		1,4%	
	791	303	+	4		0,5%	
siRNA n°3	778	309	+	6	7	0,8%	0,9%
3+0	782	305	+	9		1,2%	
	786	081	+	6		0,8%	

IV : Injection intraveineuse ; + : injection intraveineuse réussie (retour de sang) ; +/- : injection intraveineuse non réussie (pas de retour de sang) ; ; SO : sans objet (donnée non prise en compte lors de l'analyse)

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

ETUDE DE NBL1, UNE PROTÉINE DE *TRICHINELLA SPIRALIS* PRESENTANT UN INTÉRÊT POUR LE DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX OUTILS DE LUTTE CONTRE CE PARASITE ZOONOTIQUE

HECKMANN Aurélie

Le 15 décembre 2016

RÉSUMÉ

La trichinellose est une zoonose provoquée par la consommation de viande crue ou insuffisamment cuite d'animaux infestés par des larves du nématode *Trichinella* spp. Cette parasitose est une maladie réglementée régulièrement émergente ou ré-émergente dans différentes parties du monde. *Trichinella* spp. est ainsi un parasite qui nécessite une pression de contrôle permanente puisqu'il est impossible de l'éradiquer compte tenu de la grande diversité d'hôtes et de sa circulation dans la faune sauvage à l'échelle mondiale. La viande porcine est la principale source de contamination de l'Homme. Les outils sérologiques disponibles ne permettent pas de détecter le parasite suffisamment tôt chez le porc, d'autant plus si la charge parasitaire est faible. Le développement de nouvelles cibles pour le dépistage est donc un enjeu majeur dans la surveillance des élevages de porcs hors-sol mais aussi dans la perspective à long terme de remplacer le test réglementaire actuel (digestion artificielle de muscles).

La protéine NBL1 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 immunocriblage d'une banque soustractive du stade L1NN et a montré un potentiel antigénique intéressant pour le développement d'outils de détection précoce des infestations à *Trichinella* ou pour le développement de vaccins contre ce parasite.

Les études génomique et protéogénomique de cette protéine chez *T. spiralis, T. nativa, T. britovi,* et *T. pseudospiralis* ont mis en évidence une forte homologie entre ces espèces et tout particulièrement au niveau de la partie C-terminale qui a été identifiée comme fortement antigénique chez *T. spiralis.* L'analyse transcriptomique des stades L1M, Adultes 5 jours et L1NN confirme bien le fait que cette protéine est principalement présente au stade L1NN. Des tentatives d'inhibition transitoire par siRNA ciblant cette protéine au stade L1NN ont été initiées dans le cadre de ce travail mais n'ont pas permis d'identifier sa fonction *in vivo*.

Cette étude apporte de nouvelles connaissances sur la séquence conservée de la protéine NBL1 chez les différentes espèces de *Trichinella* et la transcription des ARN par le stade L1NN majoritairement.

MOTS-CLÉS : Trichinella spp., stades invasifs, protéase à sérine, génomique, transcriptomique, siRNA.