



HAL
open science

**Contribution à l'étude des mécanismes
physiopathologiques de type syndrome de l'intestin
irritable au cours de l'infection par *Cryptosporidium
parvum***

Marion Dehais

► **To cite this version:**

Marion Dehais. Contribution à l'étude des mécanismes physiopathologiques de type syndrome de l'intestin irritable au cours de l'infection par *Cryptosporidium parvum*. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03213303

HAL Id: dumas-03213303

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03213303v1>

Submitted on 30 Apr 2021

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

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

UNIVERSITE DE ROUEN NORMANDIE
UFR SANTE – Département PHARMACIE

Année 2020

N°

THESE

**pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le 9 Octobre 2020

par

DEHAIS Marion

Née le 19/10/1990 à Bois-Guillaume

**Contribution à l'étude des mécanismes
physiopathologiques de type syndrome de l'intestin
irritable au cours de l'infection par *Cryptosporidium
parvum***

Président du jury et directeur de thèse :

Pr. FAVENNEC Loïc, PU-PH

Co-directeur de thèse : Dr. RAZAKANDRAINIBE Romy, MCU

Membres du jury : Pr. SAVOYE Guillaume, PU-PH

Dr. GARGALA Gilles, MCU-PH

Dr. COSTA Damien, AHU

“L’université de Rouen et l’UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n’entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs.”

ANNEE UNIVERSITAIRE 2019 - 2020

U.F.R. SANTÉ DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Benoît VEBER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**
Professeur Agnès LIARD
Professeur Guillaume SAVOYE

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle APTER	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Jean-Marc BASTE	HCN	Chirurgie Thoracique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal BENHAMOU	HCN	Médecine interne
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mme Sophie CANDON	HCN	Immunologie
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas CORNU	HCN	Urologie
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mr Stéphane DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric DI FIORE	CHB	Cancérologie

Mr Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard DUBRAY	CHB	Radiothérapie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER (<i>sumombre</i>)	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Dominique GUERROT	HCN	Néphrologie
Mr Olivier GULLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Claude HOUDAYER	HCN	Génétique
Mr Fabrice JARDIN	CHB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine du rgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato – Vénéréologie
Mme Bouchra LAMIA	Havre	Pneumologie
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HCN	Rhumatologie
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HCN	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HCN	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie

Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépto-gastro-entérologie
M. Benoit MISSET (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation Médicale
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophthalmologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan PREVOST	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace ROMAN (<i>disponibilité</i>)	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie – Pathologie
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépto-gastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Lilian SCHWARZ	HCN	Chirurgie Viscérale et Digestive
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Hervé TILLY (<i>sumombre</i>)	CHB	Hématologie et transfusion
M. Gilles TOURNEL	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier TROST	HCN	Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CHB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	Les Herbiers	Médecine Physique et de Réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HC	Rhumatologie
Mme Marie-Laure WELTER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Najate ACHAMRAH	HCN	Nutrition
Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Emmanuel BESNIER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Neurophysiologie
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOCHE	UFR	Biologie cellulaire
M. Florent MARGUET	HCN	Histologie
Mme Chloé MELCHIOR	HCN	Gastroentérologie
Mr Thomas MOUREZ (<i>détachement</i>)	HCN	Virologie
Mr Gaël NICOLAS	UFR	Génétique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia ROLLIN	HCN	Médecine du Travail
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
Mr David WALLON	HCN	Neurologie
Mr Julien WILS	HCN	Pharmacologie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mr Thierry WABLE	UFR	Communication
Mme Mélanie AUVRAY-HAMEL	UFR	Anglais

II - PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mr Jérémy BELLIEN (PU-PH)	Pharmacologie
Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim EL OMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Thomas CASTANHEIRO-MATIAS	Chimie Organique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Camille CHARBONNIER (LE CLEZIO)	Statistiques
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Dominique DUTERTE-BOUCHER	Pharmacologie
Mr Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Nejla EL GHARBI-HAMZA	Chimie analytique
Mme Marie-Laure GROULT	Botanique

Mr Hervé HUE	Biophysique et mathématiques
Mme Hong LU	Biologie
Mme Marine MALLETER	Toxicologie
M. Jérémie MARTINET (MCU-PH)	Immunologie
Mme Tiphaine ROGEZ-FLORENT	Chimie analytique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mme Caroline BERTOUX	Pharmacie

PAU-PH

M. Mikaël **DAOUPHARS**

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde GUERIN	Anglais
----------------------------	---------

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES

Mme Alice MOISAN	Virologie
M. Henri GONDÉ	Pharmacie

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

M. Abdel MOUHAJIR	Parasitologie
M. Maxime GRAND	Bactériologie

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT

Mme Ramla SALHI	Pharmacognosie
------------------------	----------------

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim EL OMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie organique
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Rémi VARIN	Pharmacie clinique
M. Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR MEDECINE GENERALE

Mr Jean-Loup **HERMIL** (PU-MG) UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCE MEDECINE GENERALE

Mr Matthieu **SCHUERS** (MCU-MG) UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mme Laëtitia **BOURDON** UFR Médecine Générale

Mr Emmanuel **HAZARD** UFR Médecine Générale

Mme Lucile **PELLERIN** UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Paul MULDER (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su RUAN (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil ADRIOUCH (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine CLEREN (med)	Neurosciences (Néovasc)
M. Sylvain FRAINEAU (med)	Physiologie (Inserm U 1096)
Mme Pascaline GAILDRAT (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas GUEROUT (med)	Chirurgie Expérimentale
Mme Rachel LETELLIER (med)	Physiologie
Mr Antoine OVRARD-PASCAUD (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric PASQUET	Sciences du langage, orthophonie
Mme Christine RONDANINO (med)	Physiologie de la reproduction
Mr Youssan Var TAN	Immunologie
Mme Isabelle TOURNIER (med)	Biochimie (UMR 1079)

Table des matières :

Liste des abréviations	16
Liste des tableaux :	18
Liste des figures :	19
1. Introduction	21
1.1. <i>Cryptosporidium</i> spp.....	21
1.1.1. Généralités.....	21
1.1.2. Mode de contamination.....	23
1.1.3. Le cycle parasitaire.....	23
1.1.4. Physiopathologie	24
1.1.5. Manifestations cliniques.....	25
1.1.6. Traitement	26
1.1.7. Prévention.....	28
1.2. Le syndrome de l'intestin irritable.....	29
1.2.1. Définitions	29
1.2.2. Critères diagnostiques	29
1.2.3. Epidémiologie	30
1.2.4. Les différentes pistes physiopathologiques.....	31
1.2.4.1. Troubles de la motilité.....	31
1.2.4.2. Hypersensibilité viscérale.....	32
1.2.4.3. Activation immunitaire de la muqueuse intestinale.....	33
1.2.4.4. Inflammation neurogène.....	33
1.2.4.5. Modification de la perméabilité digestive	34
1.2.4.6. Le microbiote intestinal	36
1.2.5. Syndrome de l'intestin irritable post-infectieux (SII-PI)	38
1.3. Contexte et objectifs de l'étude	38
2. Matériels et méthodes.....	39
2.1. Etude <i>in vitro</i> avec des cultures de cellules HCT8 infectées par <i>Cryptosporidium parvum</i>	40
2.1.1. Oocystes de <i>Cryptosporidium parvum</i>	40
2.1.2. Lignée cellulaire.....	40
2.1.3. Evaluation de l'intégrité du modèle de barrière cellulaire (HCT-8) en présence d'oocystes de <i>Cryptosporidium parvum</i>	41
2.1.3.1. Mesure de la résistance transépithéliale (TEER) discontinue.....	41

2.1.3.2. Mesure de la résistance transépithéliale (TEER) continue	42
2.1.4. Etude de l'expression des gènes pour les jonctions serrées des cellules épithéliales	43
2.1.4.1. Extraction des Acides RiboNucléiques (ARN) cellulaires	43
2.1.4.2. Transcription inverse	44
2.1.4.3. PCR quantitative en temps réel	44
2.1.5. Etude des protéines des jonctions serrées des cellules HCT-8 par marquage immuno-fluorescent.	46
2.2. Étude <i>in vivo</i> : modèle d'infection expérimentale du souriceau par <i>Cryptosporidium parvum</i>	47
2.2.1. Oocystes de <i>Cryptosporidium parvum</i>	47
2.2.2. Le modèle animal	47
2.2.3. Schéma de l'étude	48
2.2.4. Prélèvements	49
2.2.5. Caractérisation de l'infection par <i>Cryptosporidium parvum</i>	49
2.2.6. Etude de l'expression des gènes codant pour les jonctions serrées des cellules épithéliales iléales	51
2.2.7. Etude des marqueurs de l'inflammation.....	51
2.2.7.1. Mesure quantitative de la protéine C-fos activée par technique colorimétrique.....	51
2.2.7.2. Etude de l'expression des gènes des 2 marqueurs de l'inflammation (gène c-fos et tyrosine hydroxylase).....	52
2.2.8. Etude du microbiote intestinal.....	52
3. Résultats	55
3.1. Étude <i>in vitro</i> : cultures de cellules HCT8 infectées par <i>Cryptosporidium parvum</i> ..	55
3.1.1. Cinétique de la résistance transépithéliale mesurée en discontinue	55
3.1.2. Cinétique de la résistance transépithéliale mesurée en continue	55
3.1.3. Évolution de l'expression des gènes codant pour les jonctions serrées des cellules épithéliales.....	58
3.1.4. Évolution des jonctions serrées à la surface des cellules épithéliales par immuno-fluorescence en présence de <i>Cryptosporidium parvum</i>	58
3.2. Étude <i>in vivo</i> : modèle d'infection expérimentale du souriceau par <i>Cryptosporidium parvum</i>	60
3.2.1. L'évolution de l'infection des souriceaux	60

3.2.2.	Évolution de l'expression des gènes codant pour les protéines jonctions serrées au niveau de l'intestin	63
3.2.3.	Évolution des marqueurs de l'inflammation au niveau intestinal et cérébral.....	63
3.2.4.	Évolution du microbiote intestinal lors d'une infection à <i>Cryptosporidium parvum</i>	66
4.	Discussion	67
4.1.	Étude de l'augmentation de la perméabilité au cours de l'infection par <i>C. parvum</i> ..	67
4.2.	L'inflammation	69
4.3.	Évaluation de la diversité du microbiote intestinal.....	69
4.4.	Les perspectives	70
5.	Conclusion.....	72
6.	Références bibliographiques	73
	Annexes.....	84
	Annexe 1 : Protocole kit dosage facteur de transcription C-fos par colorimétrie (ELISA)	85
	Annexe 2 : Protocole Q : Extraction d'ADN des échantillons fécaux (technique IHMS)	90
	Serment de Galien	91

Liste des abréviations

5-HT : 5-Hydroxytryptamine

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AGCC : Acide Gras à Chaîne Courte

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

CENOMEXA : Comité NORmandie d'Ethique en Matière d'EXperimentation Animale

C. hominis : *Cryptosporidium hominis*

C. parvum : *Cryptosporidium parvum*

C-SII : Syndrome de l'Intestin Irritable Constipation prédominante

Ct : Cycle threshold (cycle seuil)

DAPI : 4,6-DiAmidino-2-PhenylIndole

D-SII : Syndrome de l'Intestin Irritable Diarrhée prédominante

Escherichia coli : *E. coli*

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

ERS : Electrical Resistance System

F : Forward primer

FDA : Food and Drug Administration

GADPH : GlycerAldéhyde 3 Phosphate DesHydrogénase

GEMS : Global Enterics Multisite Study

GI : Gastro-Intestinaux

HAART : Thérapie AntiRétrovirale Hautement Active

HCT-8 : Human Colon Tumor-8

IF : ImmunoFluorescence

IgA : Immunoglobuline A

IL-10 : InterLeukine-10

IMS : Séparation Immuno-Magnétique

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

JAM-A : Junctional Adhesion Molecule A

MECSIIC : MECanisme du Syndrome de l'Intestin Irritable post infectieux par *Cryptosporidium* spp.

MTX : Méthotrexate

M-SII : Syndrome de l'Intestin Irritable Mixte (avec alternance de diarrhées et de constipation)
NE : NorEpinéphrine
NF-kB : Facteur Nucléaire kB
NIH : National Institute of Health
NTZ : NiTaZoxanide
PCR : Polymerase Chain Reaction
PRIMACEN : Plate-Forme de Recherche en IMagerie Cellulaire de Normandie
R : Reverse primer
RPMI : Roswell Park Memorial Institute
RT: Reverse Transcription
RTCA : Real Time Cell Analyzer
RT qPCR : PCR Quantitative en Temps Réel
SBF : Sérum de Bœuf Foetal
SII : Syndrome de l'Intestin Irritable
SII-PI : SII Post Infectieux
SNC : Système Nerveux Central
SSU rRNA : Sous Unité de l'ARN ribosomique
SVF : Sérum de Veau Foetal
TEER : Resistance Electrique TransEpithélliale
TFI : Troubles Fonctionnels Intestinaux
TH : Tyrosine Hydroxylase
TRE : TPA-Responsive Element
VIH : Virus de l'Immunodéficiency Humaine
VVL : Lectine Vicia Villosa
ZO-1 : Zonula Occludens 1

Liste des tableaux :

TABLEAU 1: ESPECES DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> RENCONTREES EN MEDECINE HUMAINE ET VETERINAIRE	22
TABLEAU 2 : CHIMIOETHERAPIE DE LA CRYPTOSPORIDIOSE ADAPTEE DE CHECKLEY W ET AL. (2015)	26
TABLEAU 3 : MESURES DE PREVENTION EN SITUATION A RISQUE	28
TABLEAU 4 : PREPARATION MELANGE REACTIONNEL DE LA TRANSCRIPTION INVERSE	44
TABLEAU 5 : PROGRAMME D'AMPLIFICATION DE LA TRANSCRIPTION INVERSE	44
TABLEAU 6 : PREPARATION DU MELANGE REACTIONNEL RT QPCR	45
TABLEAU 7 : PROGRAMME D'AMPLIFICATION DE LA RT QPCR	45
TABLEAU 8 : AMORCES SPECIFIQUES DES JONCTIONS SERREES RT QPCR (R : REVERSE PRIMER, F : FORWARD PRIMER)	46
TABLEAU 9 : AMORCES ET SONDAS PCR EN TEMPS REEL UTILISEES (HADFIELD ET AL. 2011) ...	50
TABLEAU 10 : MELANGE REACTIONNEL RT QPCR (PCR DE SPECIATION)	50
TABLEAU 11 : PROGRAMME THERMOCYCLEUR RT QPCR	50
TABLEAU 12 : AMORCES SPECIFIQUES DE <i>C-FOS</i> ET <i>TH</i>	52
TABLEAU 13 : PREPARATION DU MELANGE REACTIONNEL TAQ PHUSION POUR LA PCR 16S	53
TABLEAU 14 : PREPARATION DU MELANGE REACTIONNEL TAQ PHUSION POUR LA PCR 18S	53
TABLEAU 15 : AMORCES POUR LES PCR 18S ET 16S UTILISEES	54
TABLEAU 16 : PROGRAMME THERMOCYCLEUR TAQ PHUSION POUR LA PCR D'AMPLIFICATION 16S.....	54
TABLEAU 17 : PROGRAMME THERMOCYCLEUR TAQ PHUSION POUR LA PCR D'AMPLIFICATION 18S.....	54

Liste des figures :

FIGURE 1 : SCHEMA D'UN ZOITE D'APICOMPLEXE TYPIQUE	21
FIGURE 2 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CYCLE DE <i>CRYPTOSPORIDIUM PARVUM</i>	24
FIGURE 3 : ASPECT ET CONSISTANCE DES SELLES : ECHELLE DE BRISTOL	30
FIGURE 4 : PREVALENCE MONDIALE DU SII PAR PAYS	31
FIGURE 5 : REPRESENTATION DES JONCTIONS INTERCELLULAIRES (A) ET DES JONCTIONS SERREES (B).....	35
FIGURE 6 : COMPOSITION ET DENSITE DU MICROBIOTE INTESTINAL	36
FIGURE 7 : ARBRE PHYLOGENETIQUE BASE SUR L'ENSEMBLE DE DONNEES DE SEQUENCES D'ADNR 16S INTESTINALES HUMAINES.....	37
FIGURE 8 : ORGANIGRAMME DES EXPERIMENTATIONS	39
FIGURE 9 : ILLUSTRATION D'UN PUIT PERMETTANT LA MESURE DE LA VARIATION D'IMPEDANCE D'UNE POPULATION DE CELLULES AVEC L'APPAREIL DE XCELLIGENCE RTCA.....	42
FIGURE 10 : SCHEMA DE L'ETUDE <i>IN VIVO</i>	48
FIGURE 11 : REGIONS CONSERVEES (GRIS) ET HYPERVARIABLES (BLEU) DE L'ADNR 16S BACTERIEN.	53
FIGURE 12 : ÉVOLUTION DE LA RESISTANCE TRANSEPIHELIALE DES CELLULES HCT-8 AU COURS DU TEMPS	55
FIGURE 13 : PHASE DE CROISSANCE DES CELLULES HCT-8 (ADHESION, PROLIFERATION, CONFLUENCE).....	56
FIGURE 14 : OBSERVATION MICROSCOPIQUE DES CELLULES HCT-8 D'UN PUIT DE LA PLAQUE DE L'APPAREIL XCELLIGENCE	56
FIGURE 15 : ÉVOLUTION DE LA TEER APRES INJECTION DU CHITOSANE (CONTROLE POSITIF DE RUPTURE DES JONCTIONS SERREES).....	57
FIGURE 16 : ÉVOLUTION DE LA TEER DES CELLULES HCT-8 AU COURS DU TEMPS APRES INOCULATION DE <i>C. PARVUM</i>	58
FIGURE 17 : MARQUAGE PAR IMMUNOFLOUORESCENCE DES JONCTIONS SERREES DES CELLULES HCT-8 SANS <i>CRYPTOSPORIDIUM PARVUM</i> , OBSERVATION AU MICROSCOPE A FLUORESCENCE (X 400)	59
FIGURE 18 : ÉVOLUTION DE L'ADN PARASITAIRE DANS LES SELLES CHEZ LES SOURICEAUX INFECTES	60
FIGURE 19 : SOURICEAU DIARRHEIQUE (J10) <i>VS</i> SOURICEAU NON DIARRHEIQUE (J21)	60

FIGURE 20 : ASPECT MICROSCOPIQUE DES ETALEMENTS FECAUX DES SOURICEAUX INFECTES APRES INCUBATION AVEC L'ANTICORPS ANTI-CRYPTOSPORIDIEN FLUORESCENT (X400)....	62
FIGURE 21 : CINETIQUE DE L'EXPRESSION RELATIVE DE L'ARNM DE LA PROTEINE C-FOS ET DE LA TYROSINE HYDROXYLASE PAR LES INTESTINS DES SOURIS AU COURS DE L'INFECTION OU NON	63
FIGURE 22 : CINETIQUE DE L'EXPRESSION RELATIVE DE L'ARNM DE LA PROTEINE C-FOS ET TYROSINE HYDROXYLASE PAR LES INTESTINS ET LES CERVEAUX DES SOURIS AU COURS DE L'INFECTION.....	64
FIGURE 23 : CINETIQUE COMPARATIVE ENTRE LA TECHNIQUE DE PCR (EXPRESSION DU GENE C- FOS) ET LA TECHNIQUE ELISA (PROTEINE C-FOS ACTIVEE) AU NIVEAU DE L'INTESTIN DES SOURIS INFECTEES	65
FIGURE 24 : CINETIQUE COMPARATIVE ENTRE LA TECHNIQUE DE PCR (EXPRESSION DU GENE C- FOS) ET LA TECHNIQUE ELISA (PROTEINE C-FOS ACTIVEE) AU NIVEAU DU CERVEAU DES SOURIS INFECTEES	65
FIGURE 25 : REVELATION DES SEQUENCES AMPLIFIEES PAR PCR 16S ET 18S SUR GEL D'AGAROSE A 2%	66
FIGURE 26 : PERFORMANCE DES KITS D'EXTRACTION	67

1. Introduction

1.1. *Cryptosporidium* spp.

1.1.1. Généralités

Cryptosporidium spp. est un parasite cosmopolite unicellulaire doué de mouvement. C'est un parasite intracellulaire qui se multiplie dans les entérocytes. Le phylum Apicomplexa auquel appartient *Cryptosporidium* spp. a pour caractéristique de posséder un complexe apical (organe antérieur composé de : micronèmes, rhoptries, granules denses) mais également un apicoplaste (plastide non photosynthétique homologue des chloroplastes) (Figure 1). Cependant les données microscopiques, moléculaires, génomiques et biochimiques indiquent que *Cryptosporidium* spp. est dépourvu d'apicoplaste et de mitochondrie et diffère ainsi des autres apicomplexes tel que *Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii* ou *Isospora belli*. Jusqu'à récemment, *Cryptosporidium* spp. était classé comme étant une coccidie. Cependant des similitudes entre *Cryptosporidium* spp. et les grégarines ont été retrouvées. *Cryptosporidium* spp. a donc été transféré de la sous-classe Coccidia, classe Coccidiomorpha vers une nouvelle sous-classe, Cryptogregarina, appartenant à la classe Gregarinomorpha.^(1;2)

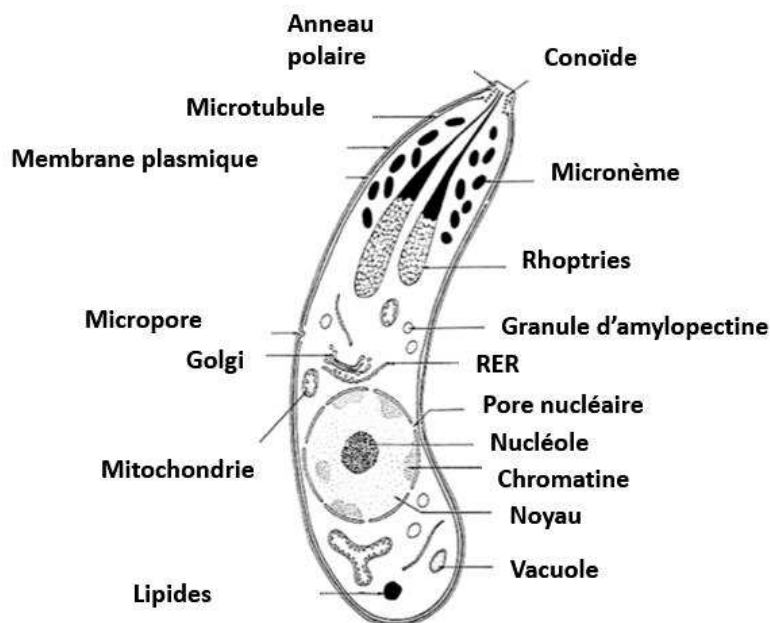


Figure 1 : Schéma d'un zoïte d'Apicomplexe typique ⁽³⁾

Les parasites du genre *Cryptosporidium* infectent le tractus gastro-intestinal d'un grand nombre de vertébrés dont l'Homme. A ce jour, on dénombre au moins 31 espèces de *Cryptosporidium* (Tableau 1). Cinq espèces sont responsables de la plupart des cryptosporidioses humaines : *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*. Parmi ces espèces, *C. hominis* et *C. parvum* sont responsables de la majorité des infections humaines (90%) spécialement dans les pays industrialisés.⁽⁴⁾ A l'heure actuelle, *C. hominis* ne semble pathogène que chez l'Homme tandis que *C. parvum* est responsable de diarrhées aussi bien chez l'Homme que chez d'autres vertébrés et notamment les animaux d'élevages (bovins, ovins). La prévalence de ces 2 espèces diffère selon les zones géographiques : *C. hominis* est l'espèce majoritairement impliquée en pathologie humaine en Amérique, en Australie alors que *C. parvum* domine en Europe. ⁽⁵⁾

Tableau 1: Espèces de *Cryptosporidium* rencontrées en médecine humaine et vétérinaire ^(6;7)

Numéros	Espèces	Hôtes	Référence
1	<i>C. muris</i>	MH	Tyzzler, 1907
2	<i>C. parvum</i>	MH	Tyzzler, 1912
3	<i>C. meleagridis</i>	MOH	Slavin, 1955
4	<i>C. wrairi</i>	M	Vetterling et al. 1971
5	<i>C. bovis</i>	M	Santin et Xiao, 2005
6	<i>C. felis</i>	MH	Iseki, 1979
7	<i>C. serpentis</i>	R	Levine, 1980
8	<i>C. nasonis</i>	P	Hoover et al. 1981
9	<i>C. baileyi</i>	O	Current et al. 1986
10	<i>C. varanii</i>	R	Pavlassek et al. 1995
11	<i>C. cichlidis</i>	P	Paperna et Vilenkin, 1996
12	<i>C. pestis</i>	P	Paperna et Vilenkin, 1996
13	<i>C. andersoni</i>	MH	Lindsay et al. 2000
14	<i>C. canis</i>	MH	Fayer et al. 2001
15	<i>C. hominis</i>	H	Morgan-Ryan et al. 2002
16	<i>C. molnari</i>	P	Alvarez-Pellitero et al 2002
17	<i>C. galli</i>	O	Ryan et al. 2003
18	<i>C. suis</i>	MH	Ryan et al. 2004
19	<i>C. reichenbachklinkei</i>	M	Slapeta, 2006

20	<i>C. fayeri</i>	M	Ryan et al. 2008
21	<i>C. fragile</i>	Am	Jirku et al. 2008
22	<i>C. macropodom</i>	M	Power et Ryan 2008
23	<i>C. xiao</i>	M	Fayer et Santín 2009
24	<i>C. ryanae</i>	M	Fayer et al. 2010
25	<i>C. ubiquitousum</i>	MH	Fayer et al. 2010
26	<i>C. cuniculus</i>	MH	Robinson et al. 2010
27	<i>C. dusci marci</i>	R	Traversa, 2010
28	<i>C. Tyzzeri</i>	M	Zhao et al. 2012
29	<i>C. viatorum</i>	H	Elwin et al. 2012
30	<i>C. scorfarum</i>	M	Kváč et al. 2012
31	<i>C. erinacei</i>	M	Kváč et al. 2014

M: Mammifères, H: homme, O: oiseaux, Am: amphibiens, P: poissons, R: reptiles.

1.1.2. Mode de contamination

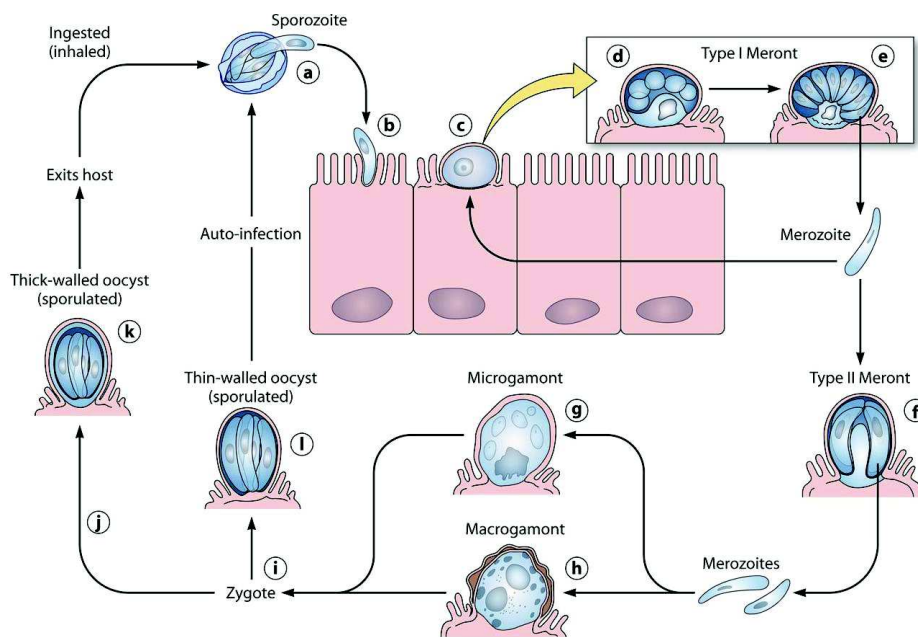
La contamination s'effectue par ingestion d'oocystes, formes parasites directement infectantes dès leur émission dans les selles et très résistantes dans l'environnement et peut être soit : i) directe par voie fécale-orale (contact direct avec des individus contaminés humains ou des animaux tels que les bovins notamment les veaux infectés) soit ii) indirecte par consommation d'eau ou aliments contaminés (ce pathogène est particulièrement résistant aux méthodes de désinfection usuelles notamment à la chloration).

1.1.3. Le cycle parasitaire

Le cycle commence par l'ingestion d'oocystes (Figure 2). Après dékystement des oocystes dans la lumière de l'intestin (a), les sporozoïtes (b) pénètrent dans les cellules hôtes et se développent à leurs pôles apicaux en trophozoïtes (c) dans des vacuoles parasitophores. Les trophozoïtes subissent une division asexuée (mérogonie) (d et e) pour former des mérozoïtes. Après avoir été libérés des mérontes de type I, les mérozoïtes pénètrent dans des cellules hôtes adjacentes pour former des mérontes de type I supplémentaires ou alors pour former des mérontes de types II (f). Les mérontes de type II interviennent dans la formation des stades sexuels, les microgamontes (plusieurs microgamètes) (g) et les macrogamontes (un seul macrogamète) (h). La plupart des zygotes (i) formés après la fertilisation du macrogamète par les microgamètes se transforment en oocystes à paroi épaisse (k), résistants à l'environnement. Les oocystes libérés dans les selles sont les formes de résistance dans l'environnement transmettent l'infection. Un

pourcentage plus faible de zygotes ne forme pas d'oocystes à paroi épaisse mais à paroi mince (l). Ces oocystes, formes d'auto-infection, peuvent maintenir le parasite dans l'hôte sans exposition orale répétée aux oocystes à paroi épaisse présents dans l'environnement. ⁽⁸⁾

Figure 2 : Représentation schématique du cycle de *Cryptosporidium parvum* ⁽⁸⁾



1.1.4. Physiopathologie

La cryptosporidiose se caractérise par une diarrhée aqueuse parfois profuse et prolongée. ^(9 ; 10) La diarrhée et les douleurs abdominales sont généralement les symptômes qui poussent les patients à consulter, conduisant à un diagnostic en laboratoire de la cryptosporidiose. Même si les mécanismes physiopathologiques de l'infection par *Cryptosporidium* spp. ne sont pas entièrement connus, il est établi que la diarrhée observée au cours de la cryptosporidiose est d'origine multifactorielle : i) liée au parasite lui-même, ii) aux réponses inflammatoires et immunitaires de l'hôte. ^(11 ; 12)

La multiplication des parasites dans les entérocytes entraîne des perturbations hydroélectrolytiques et une malabsorption des nutriments. Ces phénomènes peuvent s'expliquer par une atrophie villositaire entraînant une diminution de la surface d'absorption et une hyperplasie des cryptes ayant pour conséquence une hypersécrétion chlorée. *Cryptosporidium* spp. induit des modifications du cytosquelette cellulaire entraînant ainsi une altération de l'expression membranaire des transporteurs des nutriments de l'entérocyte et amplifiant la malabsorption. De plus *Cryptosporidium* spp. est capable de moduler l'apoptose

des cellules de l'hôte. Il active le facteur nucléaire κ B (NF- κ B) afin de prévenir l'apoptose des cellules épithéliales et inhibe l'expression des gènes proapoptotiques en début d'infection pour ensuite avoir l'effet inverse aux stades avancés. Cette induction d'apoptose semble jouer un rôle de protection de l'hôte en limitant le nombre de parasites et / ou en éliminant l'infection. (13 ; 14)

La réponse immunitaire de l'hôte influe sur la gravité de la maladie. La prévalence plus élevée observée chez les très jeunes enfants est certainement influencée par leur système immunitaire immature. Cependant, toutes les formes d'immunodépression ne conduisent pas à une gravité accrue de la cryptosporidiose. Les personnes atteintes de troubles qui affectent les cellules T tel que le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) sont particulièrement touchées. Le rôle des lymphocytes T a été confirmé par l'introduction du traitement antirétroviral. En rétablissant ainsi l'immunité cellulaire, une diminution de la gravité de la cryptosporidiose est observée. En revanche, les déficiences immunitaires affectant la fonction des cellules B n'ont pas été associées à la gravité de la cryptosporidiose. (15)

1.1.5. Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques consécutives à l'infection se produisent après une période d'incubation de 2 à 14 jours. Les infections à *Cryptosporidium* spp. peuvent être asymptomatiques, mais peuvent également engendrer des diarrhées profuses (non sanglantes) ainsi que des crampes abdominales, nausées, vomissements, perte de poids et une fièvre modérée.

Chez l'immunocompétent, la maladie est généralement spontanément résolutive et dure de 1 à 3 semaines. Il faut évoquer la maladie chez les jeunes enfants représentant un groupe à risque important de faire une cryptosporidiose mais également chez l'adulte au retour de voyage, dans un contexte épidémique ou en cas de facteurs favorisants (ex : piscine, contact avec des animaux type ovins, bovins ou un sujet diarrhéique...). Alors qu'elle est généralement prolongée chez les hôtes immunodéprimés (transplantés d'organes solides, patients atteints de SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise, cancer). (16 ; 17)

Cryptosporidium spp. est maintenant reconnu comme l'une des principales causes de diarrhée infantile dans le monde, révélée en grande partie par la vaste étude multicentrique (GEMS : Global Enterics Multisite Study) visant à déterminer les principaux pathogènes entériques des enfants dans les pays en voie de développement. Selon cette étude, *Cryptosporidium* spp.

apparaît comme la deuxième cause (après le rotavirus) de mortalité par diarrhée chez les enfants de moins de 2 ans ^(18 ; 19)

Peu de données sont disponibles concernant les effets à long terme de l'infection à *Cryptosporidium* spp.. Des symptômes non gastro-intestinaux ont été rapportés à la suite d'une infection par *C. parvum* et *C. hominis* tels que des douleurs articulaires, des douleurs oculaires, des maux de tête et de la fatigue au cours des mois suivant l'infection. ^(20 ; 21) De plus, grâce à un modèle d'entéropathie induite après une infection expérimentale chez le rat, nous avons pu montrer une relation de cause à effet entre une infection par certains isolats de *C. parvum* et le développement post-infectieux d'une hypersensibilité viscérale, symptômes proches de ceux du syndrome de l'intestin irritable humain (détaillé dans la partie 1.2). Ceci est associé à une mastocytose et à une augmentation du nombre de terminaisons nerveuses au niveau intestinal. ^(22 ; 23)

1.1.6. Traitement

Les options thérapeutiques contre la cryptosporidiose sont limitées. Des stratégies de traitements spécifiques ont été pratiquées pendant plus de trois décennies avec l'évaluation de près d'un millier de composés mais les médicaments capables d'éliminer complètement *Cryptosporidium* spp. chez l'hôte font encore défaut (Tableau 2). ⁽²⁴⁾ Ce qui est particulièrement préoccupant, compte tenu de l'avantage qu'un traitement curatif aurait pour les groupes à risque tels que les jeunes enfants, les personnes âgées, les personnes atteintes de déficits immunitaires.

Tableau 2 : Chimiothérapie de la cryptosporidiose adaptée de Checkley W et al. (2015)⁽²⁵⁾

Nitazoxanide	Approuvé pour le traitement de la cryptosporidiose de l'immunocompétent mais pas pour la co-infection avec le VIH	<ul style="list-style-type: none"> • Efficacité de 56 à 96% chez les hôtes sains • Pas efficace chez les patients atteints de SIDA avancé • Coût élevé et disponibilité limitant une utilisation répandue
Paramomycine	Autres indications	<ul style="list-style-type: none"> • Efficacité limitée chez les patients atteints du SIDA • Aucune donnée contrôlée dans les autres groupes
Azithromycine	Autres indications	<ul style="list-style-type: none"> • Pas efficace chez les patients ayant un SIDA avancé • Faibles données d'efficacité en

		association chez les patients atteints du SIDA
Rifaximine	Autres indications	<ul style="list-style-type: none"> • Anecdotes de réponses chez les patients atteints du SIDA
Rifabutine	Autres indications	<ul style="list-style-type: none"> • Efficace pour prévention de la cryptosporidiose dans les études sur la prophylaxie à <i>Mycobacterium avium</i>
Inhibiteurs de protéase du VIH	Approuvé pour le traitement du VIH	<ul style="list-style-type: none"> • Associé à la résolution de la cryptosporidiose chez les patients atteints du SIDA • Efficacité partielle contre <i>Cryptosporidium parvum</i> dans les modèles murins

L'introduction de la thérapie antirétrovirale hautement active (HAART) a considérablement réduit l'impact de la cryptosporidiose parmi les personnes infectées par le VIH. ⁽²⁶⁾ Ce qui est dû à une augmentation du nombre de cellules CD4 et à la restauration de l'immunité, mais aussi à un effet direct des inhibiteurs de protéase sur l'invasion des cellules hôtes. ⁽²⁷⁾ Malheureusement, la HAART est coûteuse et souvent inaccessible dans les pays à faible revenu, où le VIH et la cryptosporidiose opportuniste demeurent un problème de santé majeur. Actuellement, le nitazoxanide (NTZ), chef de file de la famille des thiazolides commercialisé sous l'appellation Alinia (Romark Laboratories), un pro-médicament à large spectre d'activité antimicrobienne est le seul médicament approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis et dans certains pays d'Amérique du Sud et d'Afrique contre la cryptosporidiose de l'immunocompétent. En Europe et particulièrement en France, le NZT dispose d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU). Toutefois, il n'existe pas de preuve sur l'efficacité du NTZ chez les immunocompromis et les enfants malnutris. ⁽²⁸⁾ Les bénéfices sur les symptômes, sur la diarrhée notamment, ne sont observés que chez 56% des patients recevant du NTZ contre 23% des patients recevant un placebo. ⁽²⁹⁾ Devant la faible efficacité du traitement antiparasitaire, le traitement symptomatique lors de la cryptosporidiose est donc le traitement de première intention (réhydratation orale ou parentérale).

1.1.7. Prévention

La prévention est à la fois individuelle et collective. Au niveau individuel, il n'existe aucune chimioprophylaxie. La prévention dans ce cas-là consiste à limiter la contamination par les oocystes en respectant des mesures d'hygiène (Tableau 3).

Tableau 3 : mesures de prévention en situation à risque ⁽¹⁷⁾

Mesures de prévention en institutions de soins	<p>Lavage des mains +++++</p> <p>Port de gants (toilette des malades, traitement d'effluents, laboratoire)</p> <p>Séparation des zones de préparation des repas, lavage des mains</p> <p>Change des nourrissons</p> <p>Personnel distinct pour la préparation des repas et le change ou la toilette des patients</p> <p>Crèches/hôpitaux pédiatriques : port de vêtement par-dessus les couches</p> <p>Hygiène défectueuse : isolement en chambre individuelle</p> <p>Restreindre l'accès aux fontaines d'eau ou distributeurs de glace des sujets infectés</p>
Patients immunodéprimés	<p>Consommation d'eau minérale embouteillée ou d'eau bouillie ou filtrée (0.2 µm)</p> <p>Consommation de jus de fruits pasteurisés</p> <p>Hygiène des mains +++</p> <p>Cuire ou éplucher fruits et légumes</p>
Voyageurs en zone à bas niveau d'hygiène	<p>Hygiène des mains</p> <p>Abstention de glaçons et de crèmes glacées</p> <p>Consommation d'eau en bouteille capsulée, thé ou café chaud</p> <p>Boissons gazeuses en emballages</p> <p>Faire bouillir eau et lait avant consommation</p> <p>A défaut, filtration sur filtre 0.2 µm</p>

Le risque pour la collectivité est principalement lié à la transmission hydrique du parasite. La prévention collective consiste à protéger les ressources naturelles d'eau de toute contamination fécale animale et d'assurer l'optimisation de la chaîne de traitement et distribution d'eau.

1.2. Le syndrome de l'intestin irritable

1.2.1. Définitions

Les troubles fonctionnels intestinaux (TFI) désignent un groupe de troubles gastro-intestinaux (GI) caractérisés par des symptômes attribués à la partie médiane et inférieure du tractus GI ne pouvant être expliqués par des anomalies organiques et/ou biochimiques. Les TFI sont subdivisés en plusieurs troubles dont : (i) le syndrome de l'intestin irritable (SII), (ii) la douleur abdominale fonctionnelle, (iii) le ballonnement fonctionnel, (iv) la constipation chronique idiopathique et (v) les diarrhées fonctionnelles. Les critères diagnostiques des TFI sont basés sur la présence de symptômes gastro-intestinaux caractéristiques et sur l'absence de signes d'alarme évoquant une maladie organique. ⁽³⁰⁾ Dans le présent manuscrit, on ne traitera que du SII.

1.2.2. Critères diagnostiques

Le diagnostic clinique du SII est basé sur les critères de Rome IV publiés en 2016. Il repose sur l'existence d'une douleur abdominale présente depuis au moins 6 mois et survenant au moins un jour par semaine. Au moins 2 des 3 critères suivants doivent être associés à la douleur :

- Une relation entre douleur et défécation
- Une modification de la fréquence des selles
- Une modification de la consistance des selles appréciée par l'échelle de Bristol (Figure 3)

La consistance des selles permet de définir 4 sous-groupes :

- SII avec constipation prédominante (C-SII)
- SII avec diarrhée prédominante (D- SII)
- SII mixte avec alternance diarrhée-constipation (M-SII)
- SII non spécifié : absence de critères suffisants pour répondre aux critères du C-SII, DSII ou M-SII.








Type 1		Selles dures et morcelées (en billes) d'évacuation difficile
Type 2		Selles dures, moulées en saucisse et bosselées
Type 3		Selles dures, moulées en saucisse, à surface craquelée
Type 4		Selles molles mais moulées, en saucisse (ou serpentín)
Type 5		Selles molles morcelées, à bords nets et d'évacuation facile
Type 6		Selles molles morcelées, à bords déchiquetés
Type 7		Selles totalement liquides

Figure 3 : Aspect et consistance des selles : Echelle de Bristol

1.2.3. Epidémiologie

Les symptômes associés au SII sont fréquents dans la population et n'aboutissent pas forcément à des soins médicaux. Peu d'études calculent l'incidence du SII. Une étude américaine, Locke et *al.* (2004), a montré que l'incidence d'un diagnostic clinique de SII chez l'adulte serait estimée à 2 pour 1000. ⁽³¹⁾ Mais comme de nombreuses personnes atteintes du SII ne demandent pas de soins, l'incidence réelle du SII est probablement plus élevée.

La plupart des études traitant de la prévalence du SII sont des enquêtes communautaires, la majorité étant réalisée en Europe, en Asie du Sud-Est et en Amérique du Nord. La prévalence du SII se situe entre 10% et 25%. La méta-analyse montre une estimation groupée de la prévalence internationale du SII de 11,2% (intervalle de confiance de 95% [CI] : 9,8-12,8), avec une variation par région géographique (Figure 4); le plus faible a été enregistré en Asie du Sud (7,0%) et le plus élevé en Amérique du Sud (21,0%). ⁽³²⁾

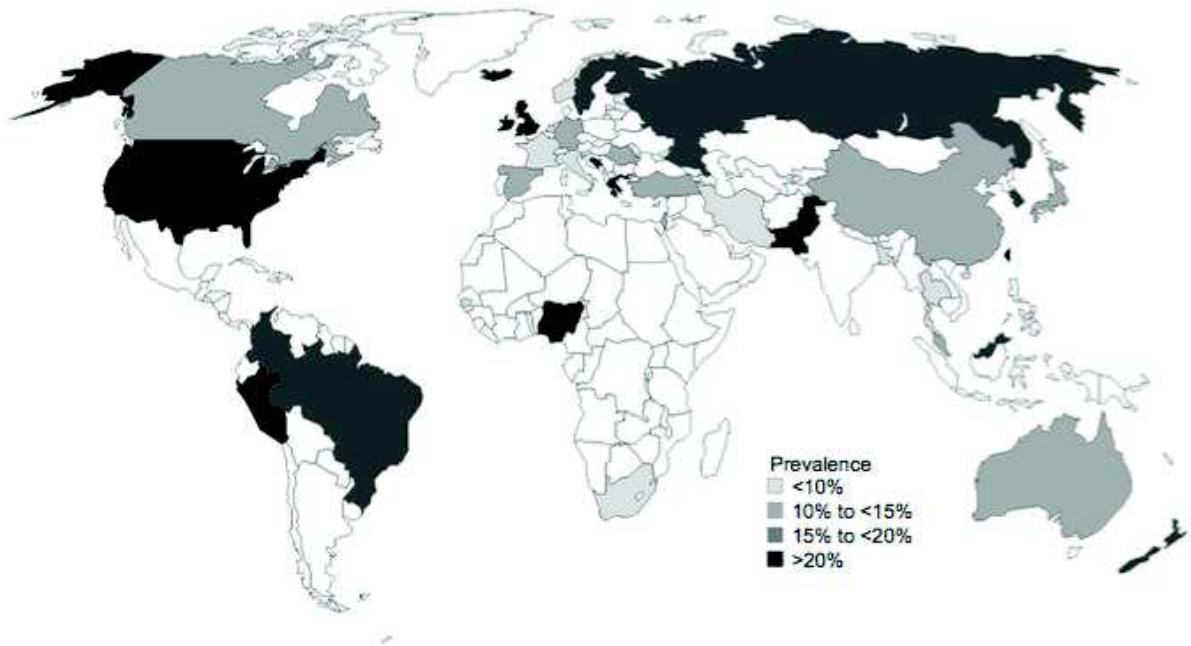


Figure 4 : Prévalence mondiale du SII par pays

Dans la plupart des populations, le SII est plus prévalent chez les femmes que chez les hommes (Nombre de femmes atteintes 1,5 à 3 fois plus élevé que les hommes). Le SII bien que plus fréquent chez les patients de 40 à 50 ans, se retrouve dans tous les groupes d'âge, y compris les enfants et les personnes âgées, sans différence apparente dans la fréquence des sous-types selon l'âge.

1.2.4. Les différentes pistes physiopathologiques

1.2.4.1. Troubles de la motilité

Les troubles de la motilité sont caractérisés par des mouvements anormaux du tractus gastro-intestinal, entraînant un transit anormal du contenu (lent ou rapide) en l'absence de maladie ou d'obstruction de la muqueuse. Les anomalies motrices ont surtout été décrites au niveau de l'intestin grêle et principalement chez les sujets diarrhéiques. L'alimentation ainsi que le stress sont deux facteurs pourvoyeurs de troubles moteurs. Les perturbations de la motricité affectent le transit du bol alimentaire ainsi que les gaz, favorisant une rétention intestinale des gaz à l'origine d'une sensation d'inconfort avec parfois des ballonnements. ⁽³³⁾

Ces perturbations motrices ne suffisent pas à expliquer la physiopathologie du SII car elles sont inconstantes et coïncident plus ou moins avec les symptômes.

1.2.4.2. Hypersensibilité viscérale

Au cours du SII, plus de la moitié des malades souffre d'une hypersensibilité digestive. Cette hypersensibilité est davantage retrouvée chez les patients avec une prédominance de diarrhée. Au niveau digestif, l'hypersensibilité peut être démontrée non seulement au niveau intestinal mais aussi dans l'œsophage ou l'estomac expliquant pourquoi le SII est souvent associé à une dyspepsie douloureuse (trouble de la digestion) ou un pyrosis (brûlure) fonctionnel. L'hypersensibilité peut être également extradigestive et concerner les bronches (à l'origine de manifestations asthmatiformes), la vessie où elle provoque une pollakiurie (trouble urinaire) et des tableaux de cystite sans infection urinaire.

Les stimuli viscéraux sont transmis via les nerfs afférents à la moelle épinière et au cerveau où les sensations de douleur sont intégrées. L'origine de cette hypersensibilité dans le SII peut être périphérique et due à un dysfonctionnement des neurones sensitifs (ou afférents) du système nerveux entérique. La sensibilisation périphérique provoque une hyperalgésie (sensibilisation accrue des stimuli douloureux) et une allodynie (stimuli non douloureux perçus comme douloureux). Dans cette hypersensibilité périphérique, les neurones afférents primaires seraient anormalement stimulés par des médiateurs (sérotonine ou certaines cytokines) libérés notamment par les mastocytes situés au contact des terminaisons sensitives et qui semblent jouer un rôle clé. En effet, chez les patients présentant une hypersensibilité, l'anomalie la plus constamment observée est une augmentation du nombre des mastocytes sur des prélèvements iléaux et coliques. Les biopsies plus profondes révèlent que la densité et surtout le degré de dégranulation des mastocytes (les mastocytes libèrent de la tryptase ainsi que de l'histamine reconnus comme étant des médiateurs de l'hypersensibilité viscérale) sont beaucoup plus élevés près des plexus et au niveau des terminaisons nerveuses et qu'il existe une étroite corrélation entre le nombre de mastocytes, leur degré de dégranulation et la sévérité des symptômes. La libération de sérotonine par les cellules entéro-chromaffines sous l'effet de stimuli notamment alimentaires joue un rôle important dans la physiopathologie du SII. ⁽³⁴⁾ Plusieurs travaux ont décrit une densité accrue des cellules entéro-chromaffines dans les muqueuses colique et rectale, notamment après une gastroentérite aiguë chez les malades qui développent un SII post-infectieux (SII-PI). ^(35 ; 36)

Elle peut aussi être centrale, le désordre sensitif étant lié à un dysfonctionnement de l'intégration des messages sensitifs digestifs au niveau de la moelle, du tronc cérébral ou du cerveau. ⁽³⁷⁾

1.2.4.3. Activation immunitaire de la muqueuse intestinale

L'une des hypothèses actuellement avancée pour expliquer l'hypersensibilité, est un afflux dans la muqueuse de cellules immunocompétentes, mastocytes et lymphocytes notamment, ou une activation accrue de ces cellules.

Chez les patients atteints du SII quel que soit le type, il a été observé une augmentation du nombre des mastocytes au niveau du colon et de l'iléum mais non au niveau du duodénum et du jéjunum. ⁽³⁸⁾ Barbara *et al.* ont montré une corrélation entre l'augmentation de mastocytes se trouvant à proximité des nerfs et la sévérité et la fréquence des douleurs abdominales. ⁽³⁹⁾ L'activation de ces cellules, se traduisant par le relargage des granules (histamine et tryptase), entraîne une réaction inflammatoire.

Le nombre de cellules entéro-chromaffines augmente considérablement dans les échantillons de côlon des patients atteints de SII post infectieux (SII-PI). ^(35 ; 40) Ces cellules endocrines les plus abondantes du tractus gastro-intestinal sont responsables de la synthèse, du stockage ainsi que de la libération de la 5-hydroxytryptamine (5-HT) dans l'intestin ainsi que d'autres molécules telles que la chromogranine A ou la mélatonine. Ces molécules jouent un rôle régulateur dans l'activation immunitaire et l'inflammation intestinale. ⁽⁴¹⁾

En plus du recrutement cellulaire au niveau intestinal, une modification des médiateurs cytokiniques est observée. L'interleukine-10 (IL-10) est une cytokine anti-inflammatoire produite principalement par les macrophages. Elle permet l'inhibition de la synthèse de cytokine pro-inflammatoire tel que l'interféron γ et l'interleukine-2 et 3. Cette cytokine régule la prolifération et la différenciation des cellules immunitaires. Une étude réalisée par Yang *et al.* montre que des souris atteintes d'un SII-PI produisent moins IL-10 au niveau du jéjunum, de iléum et du colon que des souris contrôles. ⁽⁴²⁾ Cette diminution est due à une diminution du nombre de macrophages au niveau de la muqueuse. Ce déficit en cytokine anti-inflammatoire engendre au long cours une inflammation de bas grade de la muqueuse digestive. ^(43 ;44 ;45)

1.2.4.4. Inflammation neurogène

L'inflammation neurogène résulte de la libération locale par des neurones afférents de médiateurs inflammatoires tels que la substance P ou le peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP). Une fois libérés, ces neuropeptides induisent une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire et la libération d'histamine par les mastocytes. Wang *et al.*, ont rapporté que l'expression de la substance P dans le système nerveux entérique dans un modèle de SII de rat est anormale, suggérant que des changements locaux de la substance P peuvent

être impliqués dans la pathogenèse du SII et peut jouer un rôle important dans la régulation de la fonction gastro-intestinale. ⁽⁴⁶⁾ La norépinéphrine (NE) ou noradrénaline est l'un des plus importants neurotransmetteurs dans le tractus gastro-intestinal. Certains auteurs ont émis l'hypothèse que la NE pourrait être impliquée dans l'hypersensibilité viscérale dans le SII car une élévation de la NE a été décrite chez des patients ayant un SII par rapport à une population contrôle, traduisant ainsi l'exacerbation de la sollicitation des voies du stress. ^(47 ; 48 ; 49) La fabrication de NE est limitée par la tyrosine hydroxylase qui est la première enzyme limitant la vitesse dans le processus de synthèse de NE.

L'expression de *c-fos* (une protéine agissant comme facteur de transcription) est un marqueur bien établi d'activation neuronale. L'expression de *c-fos* dans le SNC est un élément essentiel à l'induction d'une hypersensibilité viscérale dans le SII et l'augmentation de cette expression est associée à la motilité colique et l'hypersensibilité. Dans un modèle de rat atteint de SII, une augmentation de la protéine C-fos au niveau du SNC (lobe frontal, hippocampe et cornu dorsale) a été observée, mais le C-fos reste normal dans le côlon. ⁽⁵⁰⁾ Le stress psychologique peut induire une hyperexcitabilité du côlon indirectement par l'activation du SNC.

Les inflammations retrouvées dans la muqueuse intestinale vont donc participer à la survenue d'autres éléments de physiopathologie comme l'augmentation des neuromédiateurs de la douleur (substance P, sérotonine), l'apparition d'anomalies motrices, et de la perméabilité intestinale ainsi que l'implication du microbiote intestinal.

1.2.4.5. Modification de la perméabilité digestive

La barrière épithéliale digestive assure une fonction de protection de l'organisme. Cette barrière est à la fois chimique et physique. La composante chimique est principalement due à la libération par les cellules épithéliales de molécules antimicrobiennes (ex : les défensines). Ces molécules inhibent la croissance des bactéries et des levures. ⁽⁵¹⁾ La composante physique est constituée de deux éléments principaux : la couche de mucus (fabriquée par les cellules caliciformes) et les jonctions serrées qui sont des jonctions étanches entre les cellules épithéliales empêchant la diffusion de molécules et de pathogènes. Les jonctions serrées sont composées de protéines transmembranaires (occludine, claudine et JAM-A: Junctional Adhesion Molecule A) auxquelles se fixent les protéines intracellulaires (ZO-1: Zonula Occludens 1), ces dernières assurant la liaison avec les protéines du cytosquelette (les filaments d'actine). Les jonctions serrées sont localisées au niveau du pôle apical de la cellule. ^(52 ; 53) (Figure 5). L'ouverture de ces jonctions serrées faisant suite à la contraction du cytosquelette

favorise le passage de toxines, allergènes, fragments membranaires et bactéries de la lumière intestinale ou colique vers l'espace sous-muqueux.

Le passage des solutés pour traverser l'épithélium intestinal peut se faire par deux voies : le passage transcellulaire (à travers la cellule) et le passage paracellulaire (passage entre les cellules). Le contrôle de la perméabilité paracellulaire passive est indispensable pour que les fonctions de transport actif transcellulaire de l'épithélium intestinal s'exercent correctement.

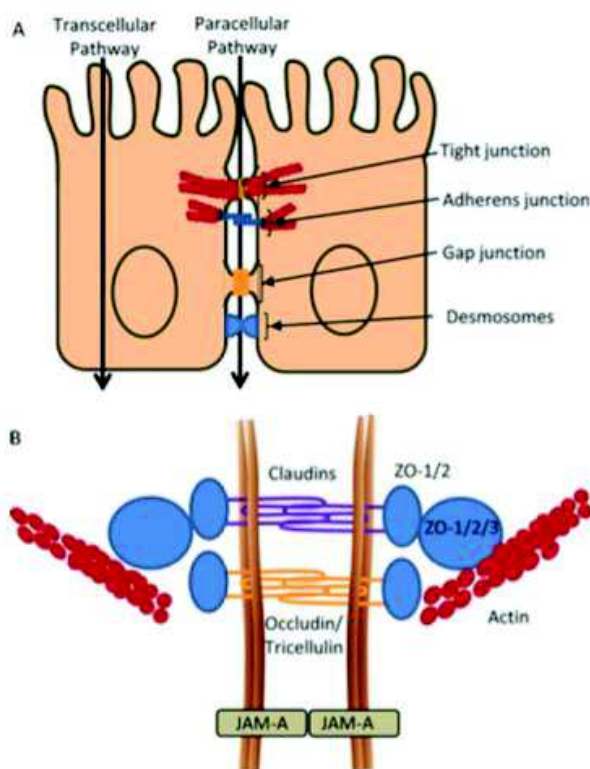


Figure 5 : Représentation des jonctions intercellulaires (A) et des jonctions serrées (B) ⁽⁵⁴⁾

La barrière intestinale est finement régulée, le déséquilibre d'une de ses composantes peut affecter son étanchéité et donc sa perméabilité. Une augmentation de la perméabilité intestinale et colique ont été observées au cours du SII, aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant, et plus particulièrement chez les patients présentant un SII post-infectieux ou un D-SII.^(55 ; 56) L'augmentation de la perméabilité paracellulaire s'accompagne généralement d'altérations structurales des jonctions serrées avec une phosphorylation accrue des chaînes courtes de la myosine ainsi qu'une réduction de l'expression des protéines des jonctions. Des médiateurs solubles libérés au niveau de la muqueuse colique pourraient être à l'origine des troubles de la perméabilité. Plusieurs candidats ont été identifiés tels que les sérines protéases, les acides biliaires ou encore certains acides organiques qui se trouvent augmentés au niveau fécal chez les patients avec un SII. Enfin, des altérations du protéasome (complexes enzymatiques capables de dégrader les protéines mal repliées, dénaturées) mises en évidence au niveau de la

muqueuse colique des patients avec SII pourraient également contribuer à la physiopathologie du SII en augmentant la dégradation de l'occludine.

1.2.4.6. Le microbiote intestinal

La flore ou microbiote intestinal est l'ensemble des micro-organismes (bactéries, virus, archées, protozoaires, champignons) qui colonisent le tube digestif. La flore microbienne digestive se caractérise par sa complexité et sa diversité. Des variations dans le temps et l'espace caractérisent la composition du microbiote d'un individu. Les flores digestives du nouveau-né, du nourrisson puis de l'adulte, sont différentes et la composition varie selon les segments du tube digestif avec un gradient dans le sens oral-anal (Figure 6).

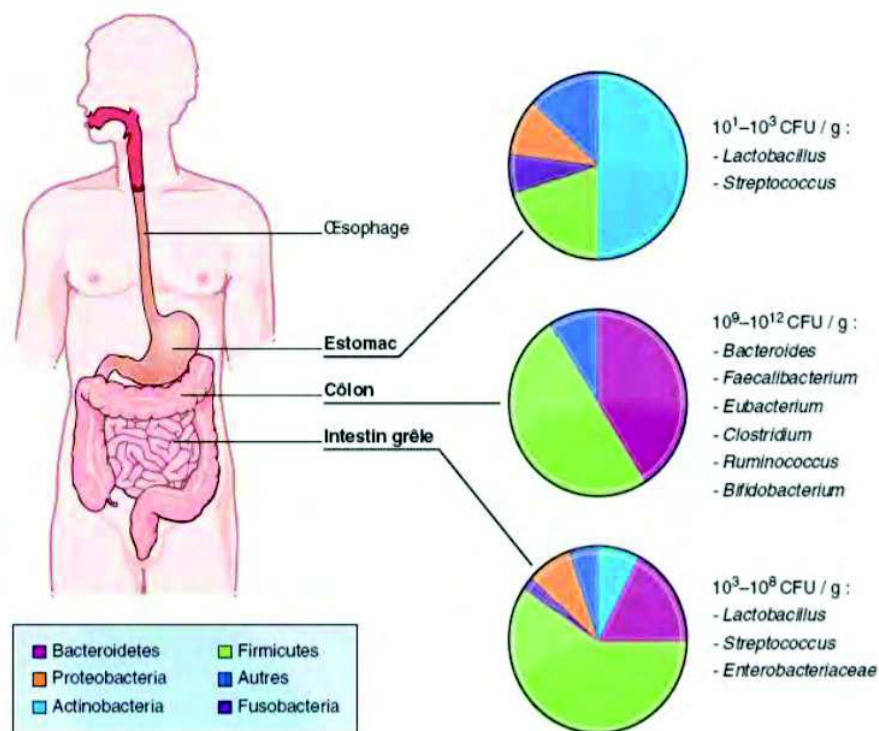


Figure 6 : Composition et densité du microbiote intestinal ⁽⁵⁷⁾

Chez l'homme, trois grands phyla ont pu être mis en évidence : les Firmicutes (bactéries à Gram positif de genre *Eubacterium*, *Clostridium*, *Rhuminococcus* et *Butyrivibrio*), les Bacteroidetes (bactéries à Gram négatif du groupe *Bacteroides*-*Porphyromonas*-*Prevotella*) et les Actinobacteries (bactéries à Gram positif du genre *Bifidobacterium* et du groupe *Atopobium*-*Collinsella*). (Figure 7)

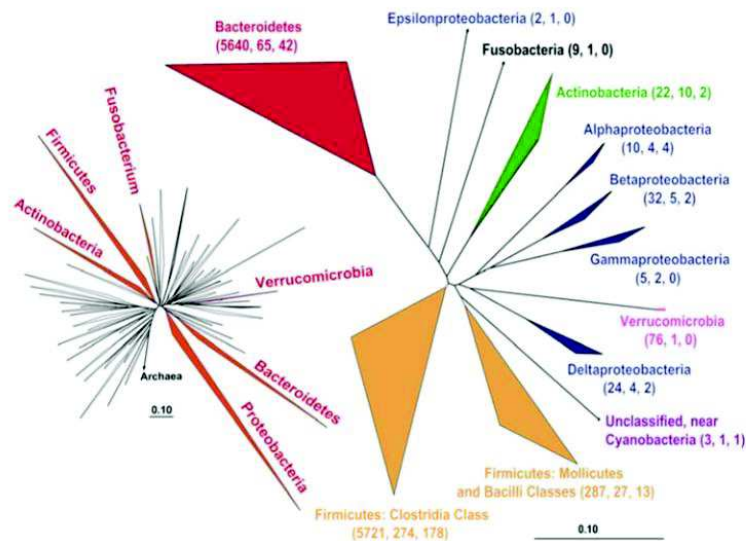


Figure 7 : Arbre phylogénétique basé sur l'ensemble de données de séquences d'ADNr 16S intestinales humaines ⁽⁵⁸⁾

Chez la souris, la composition phylogénétique des communautés bactériennes semble similaire au niveau du phylum à celle de l'homme. Les 2 principaux phyla bactériens du tractus intestinal murin sont les Bacteroidetes et les Firmicutes. Mais dans l'ensemble, les observations montrent de nettes différences au niveau de l'abondance spécifique du genre/espèce entre le microbiote murin et humain. Ainsi, bien que des comparaisons absolues soient impossibles, les modèles murins sont pertinents pour l'étude des processus responsables de la variation du microbiote et de ses modifications en cas de perturbation. ⁽⁵⁹⁾

Au cours du SII, l'écosystème intestinal peut être quantitativement et/ou qualitativement différent de celui de sujets témoins. Les anomalies qualitatives décrites sont d'abord une moindre diversité du microbiote avec un excès de Firmicutes seul ou associé à une réduction des Bacteroidetes. Une augmentation du rapport Firmicutes/Bacteroidetes a notamment été décrite chez les malades souffrant d'un SII avec constipation (la composition du microbiote des patients avec un SII varie selon le sous-type diagnostiqué). En ce qui concerne les anomalies quantitatives, le débat n'est pas clos mais on peut arriver cependant à la conclusion que la pullulation microbienne endoluminale est probable chez certains malades, notamment chez

ceux souffrant de troubles de la motricité du grêle, et qu'elle peut contribuer au ballonnement abdominal dont se plaignent les patients atteints de SII. ^(60 ; 61)

1.2.5. Syndrome de l'intestin irritable post-infectieux (SII-PI)

L'existence de SII-PI est désormais admise. Les SII-PI représenteraient 15 à 20% des SII et peuvent succéder à une infection bactérienne ou parasitaire. Le risque relatif de développer un SII est multiplié par 5 après une infection intestinale. Plusieurs facteurs influencent ce risque. Le plus important d'entre eux est la durée de l'infection. Les autres facteurs de risque de SII-PI sont liés au terrain : un âge jeune lors de l'infection, un terrain anxieux et/ou dépressif sous-jacent. Le SII-PI résulterait avant tout de la persistance d'un état « inflammatoire » local après l'infection aiguë. ⁽⁶²⁾

Après un épisode aigu de cryptosporidiose, un sous-groupe important de patients décrit l'apparition de symptômes gastro-intestinaux malgré le rétablissement avec clairance du parasite. Les symptômes consécutifs à l'infection à *C. parvum* sont similaires à ceux décrits par les patients atteints du SII ce qui suggère que *C. parvum* pourrait être un agent potentiel du SII-PI. ^(21 ; 63)

1.3. Contexte et objectifs de l'étude

Ce travail s'intègre dans le programme de l'étude MECSIIC : **ME**Canismes du **S**yndrome de l'**I**ntestin **I**rritable post infectieux par *Cryptosporidium* spp.. Les objectifs de ce programme sont la mise en évidence des mécanismes physiopathologiques des symptômes du type SII-PI, dont le rôle des translocations bactériennes et des altérations du microbiote intestinal, ainsi que l'identification des géotypes de *Cryptosporidium* spp. à risque de pathogénicité à long terme. Au cours de ce travail de thèse, du fait du faible nombre de données sur l'étude des mécanismes physiopathologiques de type Syndrome de l'intestin irritable au cours de l'infection par *Cryptosporidium parvum*, il nous est donc apparu intéressant de :

- Investiguer les mécanismes par lesquels l'infection par *Cryptosporidium* spp. provoque la dégradation des protéines de jonctions serrées (occludine, claudine-4, ZO-1).
- Décrire les modifications physiopathologiques post infectieuses intestinales (motilité, digestion/absorption des nutriments et d'électrolytes ; expression de *c-fos* ; dégradation des protéines des jonctions serrées) dans un modèle d'infection expérimentale *in vivo*.

- Caractériser, par analyse métagénomique, les modifications du microbiote intestinal au cours de l'infection par *Cryptosporidium* spp. et leur rôle dans la survenue d'une hypersensibilité viscérale.

2. Matériels et méthodes

Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons adopté une approche d'étude *in vitro* avec des cultures de cellules HCT8 infectées par *Cryptosporidium parvum* et l'utilisation d'un modèle d'infection expérimentale du souriceau par *Cryptosporidium parvum*. Le schéma expérimental est décrit dans la figure ci-dessous.

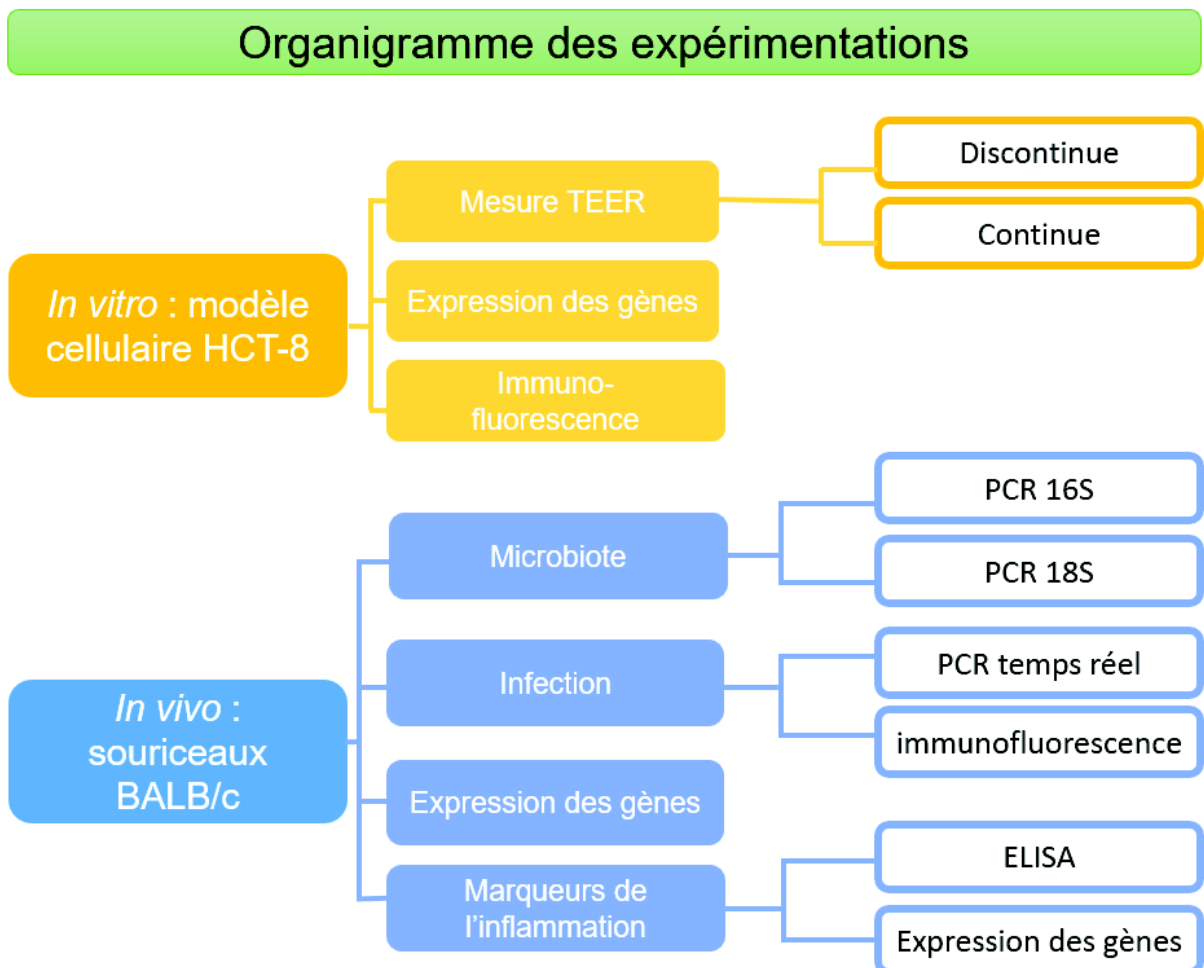


Figure 8 : Organigramme des expérimentations

2.1. Etude *in vitro* avec des cultures de cellules HCT8 infectées par *Cryptosporidium parvum*

2.1.1. Oocystes de *Cryptosporidium parvum*

La souche de *C. parvum* IIaA17G2R1 dite « Nouzilly » a été utilisée pour toutes les manipulations de culture cellulaire. Cette souche a été initialement isolée chez un enfant infecté et maintenue en laboratoire par passages en série sur des veaux mâles à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, UMR 1282) de Nouzilly en France. Dans une étude préliminaire, il a été démontré que la souche "Nouzilly" est plus infectieuse que les autres souches testées.

Les oocystes de *Cryptosporidium parvum* ont été purifiés par séparation immunomagnétique (IMS) selon le protocole préconisé par le fabricant (TCS Biosciences, Botolph, Claydon, Buckingham, Royaume-Unis). Les oocystes présents dans les fèces sont capturés par des anticorps monoclonaux spécifiques à la paroi des oocystes de *Cryptosporidium* spp. conjugués à des billes magnétiques. Les oocystes sont séparés des débris à l'aide d'un aimant, les réactifs utilisés pendant le processus de purification visent à réduire l'interférence des débris inorganiques et organiques ainsi qu'à réduire la liaison des débris et les autres organismes aux billes magnétiques. Les oocystes sont libérés des billes par dissociation acide (HCl 0,1N). La suspension d'oocystes purifiés est ensuite neutralisée avec du NaOH, lavée avec de l'eau purifiée par osmose inverse. Les oocystes ont été remis en suspension dans du PBS stérile et sont conservés à +4°C jusqu'à utilisation.

2.1.2. Lignée cellulaire

La lignée cellulaire HCT-8 (Human Colon Tumor-8) issue d'un adénocarcinome iléocœcal humain, est particulièrement permissive au développement du parasite *C. parvum*.⁽⁶⁴⁾

Ces cellules épithéliales intestinales sont cultivées en milieu RPMI 1640 (milieu Roswell Park Memorial Institute) avec de la glutamine (PAN Biotech, Aidenbach, Bavière, Allemagne), supplémentée avec 5% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté et des antibiotiques. Les cellules sont maintenues dans des flasques de culture cellulaire de 75cm² et incubées dans une étuve à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO₂ saturée en eau. Les cellules sont repiquées lorsqu'elles atteignent 80% de confluence. Ces cellules adhérentes sont détachées de leur support sous l'action d'un mélange trypsine/EDTA (0,05%) (Gibco, Thermofisher scientific, Illkirch, France) pendant 15 min. La trypsine est ensuite rapidement diluée par ajout de milieu RPMI. Après centrifugation à 800g pendant 10 min à 4°C, les cellules du culot sont resuspendues dans du milieu de culture pour être remises en culture.

2.1.3. Evaluation de l'intégrité du modèle de barrière cellulaire (HCT-8) en présence d'oocystes de *Cryptosporidium parvum*

La capacité de *Cryptosporidium parvum* à perturber les jonctions cellulaires a été étudiée par une méthode basée sur la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER). La TEER fournit une mesure physique de la résistance au passage des ions entre les cellules épithéliales cultivées en monocouche. Elle est largement utilisée comme indicateur de changement de perméabilité *in vitro*.^(65 ; 66)

2.1.3.1. Mesure de la résistance transépithéliale (TEER) discontinue

Dans des plaques de 12 puits (BD Biosciences, Bedford, Etats-Unis) des inserts de culture avec une porosité de 0,4 µm (BD Biosciences, Bedford, Etats-Unis) ont été utilisés. Les inserts ont été remplis avec 1mL de suspension cellulaire à la concentration de 0,1x10⁶ cellules HCT-8/mL. La viabilité des cellules inoculées a été évaluée par bleu trypan en cellule de KOVA (Greiner Bio-One SAS, Courtaboeuf, France). Le bleu trypan est un colorant vital qui pénètre que dans les cellules mortes permettant ainsi de les mettre en évidence. Les cellules mortes sont donc colorées en bleu. À confluence les cellules sont infectées par 10⁵ oocystes de *C. parvum* non dékystés. En effet, dans une étude préliminaire menée au laboratoire visant à étudier les effets de dékystement sur l'infectiosité des oocystes de *Cryptosporidium* spp., il a été établi que les oocystes non traités sont aussi infectants que les oocystes dékystés.

La mesure est réalisée grâce à l'appareil Millicell-ERS (Electrical Resistance System) (Millipore MILLICELL-ERS MERS 00001) qui estime quantitativement la confluence des cellules. L'appareil est couplé à une paire d'électrodes (pastilles d'argent/ chlorure d'argent (Ag/ AgCl)). Un voltage (U) étant appliqué, l'intensité du courant mesurée (I) permet de calculer la résistance (R) selon la loi d'Ohm ($R=U/I$). La TEER correspond à cette valeur de résistance mesurée à travers l'épithélium (R_e) après soustraction de la résistance de la membrane de l'insert en l'absence de cellules (R_m), et est exprimée en fonction de la surface (S) de l'épithélium selon la formule suivante :

$$TEER (\Omega.cm^2) = (R_e - R_m) \times S$$

La résistance des cultures a été mesurée à différents temps post infection (t=2h, t=18h, t=24h, t=48h, t=72h) afin d'évaluer l'évolution de la perméabilité au cours du temps par comparaison avec des cellules non infectées. Pour chaque temps, les mesures sont réalisées en duplicats. En parallèle, les échantillons sont congelés à -80°C aux différents temps afin de pouvoir étudier l'expression des gènes codant pour les protéines des jonctions serrées.

2.1.3.2. Mesure de la résistance transépithéliale (TEER) continue

Afin d'affiner et d'affirmer les premiers résultats obtenus lors de la mesure de la résistance transépithéliale discontinue, une seconde expérience est réalisée sur l'appareil xCELLigence RTCA (Real Time Cell Analyzer) (ACEA biosciences, San Diego, USA). Au niveau de chaque puits des plaques 96 puits se trouve un ensemble de microélectrodes en or fusionnées à la surface inférieure d'un puits de plaque de microtitration. (Figure 9) Lorsque cette électrode est immergée dans une solution électriquement conductrice (comme un tampon ou un milieu de culture tissulaire standard), l'application d'un potentiel électrique à travers ces électrodes fait sortir les électrons de la borne négative, traverse la solution en vrac, puis se dépose sur la borne positive pour terminer le circuit. La présence de cellules adhérentes à l'interface électrode-solution empêche le flux d'électrons. L'amplitude de cette impédance dépend du nombre de cellules, de la taille et de la forme des cellules et de la qualité de fixation cellule-substrat. Il est important de noter que ni les surfaces des microélectrodes en or ni le potentiel électrique appliqué (22 mV) n'ont d'effet sur la santé ou le comportement des cellules.

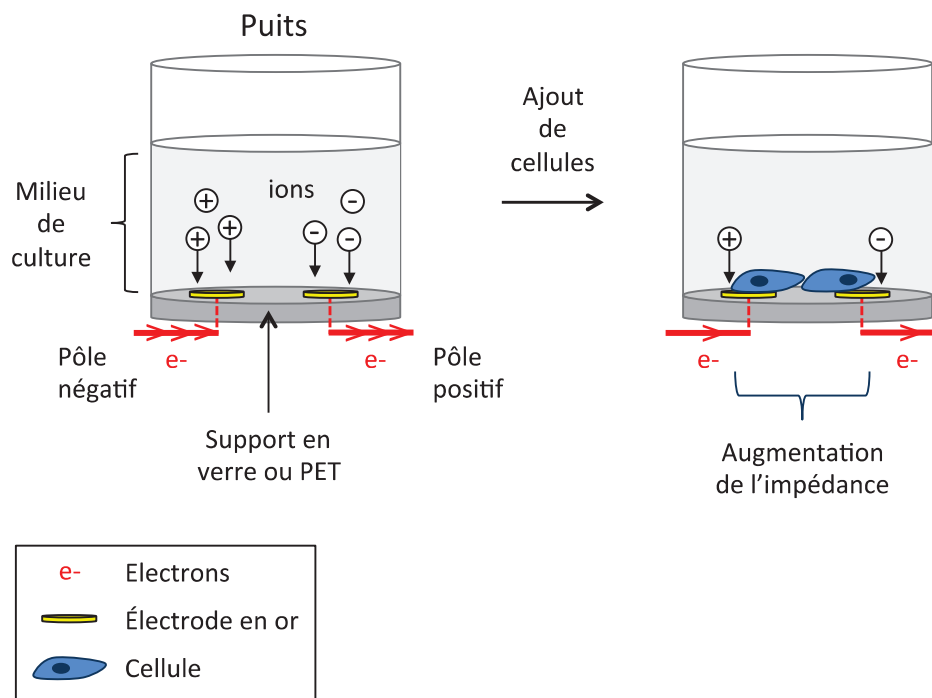


Figure 9 : Illustration d'un puits permettant la mesure de la variation d'impédance d'une population de cellules avec l'appareil de xCELLigence RTCA

L'appareil va mesurer un indice cellulaire (CI) en fonction du temps en continue :

$$\text{CI} = (\text{impédance au point temporel } n - \text{impédance en l'absence de cellules}) / \text{valeur d'impédance nominale.}$$

Grâce aux données relevées, un graphique en temps réel est réalisé, afin d'évaluer la résistance transépithéliale en fonction du temps.

Dans les puits de la plaque, 0.1×10^6 cellules HCT-8 dans 200 μL sont déposées avec 10 % de SVF. À confluence les cellules sont infectées par 10^5 oocystes de *C. parvum* non dékystés. En parallèle, des puits témoins sont réalisés : (i) des puits avec du milieu sans cellule afin de pouvoir faire le calcul (impédance en l'absence de cellules), (ii) des puits avec un témoin positif, (iii) et des puits avec des cellules sans *Cryptosporidium parvum*. Le témoin positif est le chitosane hydrochloride 1.5%. ⁽⁶⁷⁾ Le chitosane, lorsqu'il est protoné ($\text{pH} < 6,5$), est capable d'augmenter la perméabilité paracellulaire des épithéliums muqueux. Le chitosane ne provoque pas de dommages à la membrane cellulaire et ne modifie pas la viabilité des cellules épithéliales intestinales.

2.1.4. Etude de l'expression des gènes pour les jonctions serrées des cellules épithéliales

La PCR en temps réel est réalisée sur l'ADN complémentaire (ADNc) issu de la transcription inverse des ARN messagers afin d'apprécier le niveau d'expression du gène cible. Deux gènes codant pour des protéines transmembranaires : l'occludine, la claudine-4 et le gène codant pour la zonula occludens-1 (ZO-1), protéine intramembranaire, ont été ciblés au cours de cette étude.

2.1.4.1. Extraction des Acides RiboNucléiques (ARN) cellulaires

L'extraction des ARN est réalisée sur les échantillons congelés à -80°C aux différents temps ($t=2\text{h}$, $t=18\text{h}$, $t=24\text{h}$, $t=48\text{h}$, $t=72\text{h}$). La technique d'extraction utilisée pour obtenir l'ARN purifié est une extraction par le trizol (TRIzol Reagent, thermofischer scientific, Illkirch, France). Le trizol est un mélange de solvant organique contenant du phénol, du chloroforme et de l'isothiocyanate de guanidine. Après l'homogénéisation de l'échantillon (ici les cellules présentes sur les inserts), l'extraction des ARN se fait par ajout de chloroforme. Les ARN se concentrent dans la phase aqueuse (la phase supérieure). Après récupération de la phase aqueuse, une précipitation des ARN est obtenue à l'aide d'isopropanol. Ils sont ensuite lavés

par ajout d'éthanol à 75% v/v puis, après séchage, resuspendus dans un tampon phosphate salin (PBS), et solubilisés par chauffage entre 55-60°C avant d'être congelés à -80°C.

2.1.4.2. Transcription inverse

L'ADNc est généré par transcription inverse en utilisant la trousse Hight-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermofischer scientific, Illkirch, France) à partir de l'ARN. Le mélange réactionnel réalisé selon les recommandations du fournisseur est décrit dans le tableau 4.

Tableau 4 : Préparation mélange réactionnel de la transcription inverse

Réactifs	Volume de réactif par échantillon
10x RT Buffer	2,0 µL
25x dNTP Mix	0,8 µL
10x RT Random Primers	2 µL
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µL
Nuclease-free H₂O	4,2 µL
Total par réaction	10,0 µL

Le cycle d'amplification est réalisé sur l'automate Bio rad T100 (Bio-rad Laboratoires, Marnes la Coquette, France) selon le programme du tableau 5 :

Tableau 5 : Programme d'amplification de la transcription inverse

Étape du cycle	Température	Temps (minutes)
Activation de l'enzyme	25°C	10
Reverse transcription	37°C	120
Inactivation de l'enzyme	85°C	5
Refroidissement	4°C	infini

2.1.4.3. PCR quantitative en temps réel

La PCR (polymerase chain reaction) quantitative en temps réel (RT qPCR) a été réalisée avec la trousse SsoFast EvaGreen Supermix sur l'automate PCR en temps réel Bio-rad CFX96 (Bio-rad Laboratoires, Marnes la Coquette, France). Chaque temps est passé en duplicat. Le mélange réactionnel (Tableau 6) est réalisé selon les recommandations du fournisseur auquel est additionné 2,5µL d'échantillon d'ADN complémentaire dilué au 1/10 v/v dans de l'eau sans ADNase et ARNase afin de pallier à la présence d'inhibiteur.

Tableau 6 : Préparation du mélange réactionnel RT qPCR

Réactifs	Volume par réaction
SsoFast EvaGreen supermix	10 µL
Forward primer	2,5 µL
Reverse primer	2,5 µL
Eau PCR	2,5 µL
Volume total	17,5 µL

Le profil d'amplification utilisé est décrit dans le tableau 7 :

Tableau 7 : Programme d'amplification de la RT qPCR

Étape du cycle	Température	Temps (secondes)	Nombre de cycles
Activation enzyme	95°C	30	1
Dénaturation	95°C	10	40
Hybridation/ élongation	55°C	10	40
Refroidissement	4°C	Infini	/

Le gène de la Glyceraldéhyde 3-phosphate deshydrogénase (GADPH) a été choisi comme gène de référence endogène (« de ménage ») ne variant pas dans les échantillons testés. Les autres gènes quantifiés sont ceux qui codent pour les protéines suivantes : l'occludine, la claudine-4 et la ZO-1. La quantification relative de l'expression des gènes est évaluée en fonction du Cycle seuil (Ct), nombre de cycles d'amplification à partir duquel un signal est quantifiable. Cette valeur est inversement proportionnelle à la quantité d'ARNm (Acide ribonucléique messenger) présente dans l'échantillon. Les amorces spécifiques utilisées sont décrites dans le tableau 8 sur la page suivante.

Tableau 8 : Amorces spécifiques des jonctions serrées RT qPCR (R : Reverse primer, F : Forward primer)

Amorces	Séquences (5'-3')	Référence
claudine-4 (R)	AGGTCTGGCGACATTAGTGG	Bertiaux-Vandaële et <i>al.</i> (2011) ⁽⁶⁸⁾
claudine-4 (F)	TGGTGTGGGTAAGAGGTTG	
Occludine (R)	CACGTTCGACCAATGC	
Occludine (F)	CCCGTTCCATAGGCTC	
zona-occludens-1 (R)	GTATCCGATTGTTGTGTTCC	
zona-occludens-1 (F)	TCACTTGTAGCACCATCCGC	
GAPDH (R)	CATCACTGCCACTCAGAAGA	
GAPDH (F)	AAGTCACAGGAGACAACCG	

2.1.5. Etude des protéines des jonctions serrées des cellules HCT-8 par marquage immuno-fluorescent.

Les lamelles de culture traitées pendant 1h avec du collagène type I, 100 µg. mL⁻¹ (Collagen I, rat tail 100mg, Corning) ont été utilisées pour cultiver, fixer, colorer et ensuite analyser au microscope les cellules adhérentes HCT-8 obtenues comme vu précédemment (2.1.2). À confluence les cellules sont infectées par 10⁵ oocystes de *C. parvum* non dékystés puis incubées pendant des temps différents à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO₂ saturée en eau.

Les cellules sont ensuite fixées sur leur support à l'aide de méthanol glacé. Cette technique de fixation permet de réaliser un immunomarquage ainsi que l'accessibilité aux protéines intracellulaires. La saturation des sites non spécifiques est réalisée à l'aide de sérum de bœuf fœtal (SBF) à 1% (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Après ce pré-traitement des cellules, le marquage par fluorescence des protéines d'intérêt est réalisé. Les anticorps utilisés sont les suivants :

- 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) : marqueur se fixant à l'ADN du noyau et donne une fluorescence bleue quand il est excité par un laser violet (405nm) (Waterborne, New Orleans USA)
- anticorps monoclonale spécifique d'occludine (OC-3F10, Thermofischer scientific, Illkirch, France) couplé au FITC (isothiocyanate de fluorescéine). Cet anticorps lors de l'excitation émet une coloration verte et permet de visualiser la protéine de la jonction serrée portant le même nom.

- anticorps monoclonale spécifique de claudine-4 (3E2C1, Thermofischer scientifique, Illkirch, France) couplé à l'alexa fluor 488. Cet anticorps lors de l'excitation émet une coloration verte et permet de visualiser la protéine de la jonction serrée portant le même nom.
- anticorps polyclonale spécifique de ZO-1 (Thermofischer scientifique, Illkirch, France) non couplé à un fluorochrome auquel on rajoute un fluorochrome alexa fluor 594. Ce fluorochrome lors de son excitation émet une coloration rouge et permet de visualiser la protéine de la jonction serrée ZO-1, la seule qui est intracellulaire au niveau des jonctions serrées.
- anticorps monoclonal couplé au FITC se liant spécifiquement aux oocystes de *Cryptosporidium* spp.. Afin de pouvoir visualiser les cellules infectées par le parasite des cellules non infectées et de déterminer les conséquences de cette infection sur les jonctions serrées. Cet anticorps monoclonal se trouve dans le kit Crypto CEL (TCS Biosciences, Botolph, Claydon, Buckingham, Royaume-Unis). Les *Cryptosporidium* spp. émettent une couleur verte.
- La lectine *Vicia villosa* Fluorescente (VVL) a été utilisée précédemment pour marquer la croissance du *C. parvum* par microscopie à fluorescence. ^(69; 70) Le marquage avec la VVL offre une grande spécificité avec les sporozoïtes et la paroi interne des oocystes mais pas la paroi externe des oocystes. ⁽⁷¹⁾

2.2. Étude *in vivo* : modèle d'infection expérimentale du souriceau par *Cryptosporidium parvum*

2.2.1. Oocystes de *Cryptosporidium parvum*

Les oocytes de *C. parvum* purifiés et concentrés comme décrits dans 2.1.1. ont été traités avec deux lavages à l'hypochlorite de sodium (15%) (10 min de congélation et 30 min de centrifugation) afin d'éliminer les bactéries et d'initier le dékystement des oocystes.

2.2.2. Le modèle animal

La souche utilisée est la souche BALB/cAnNRJ provenant de la génération F184 de la souche initiale du NIH (Société Janvier, France). Ce choix est fondé sur une infectiosité des oocystes de *C. parvum* proche de 100% précédemment obtenue chez les souris BALB/c, et une étude récente qui montre que cette souche murine est plus sensible à l'infection par *C. parvum* que les souches C57BL/6 et C3H/HeN (donnée INRA). L'ensemble du protocole d'expérimentation

animale a été soumis et approuvé par le comité Normandie d'éthique en matière d'expérimentation animale (CENOMEXA) sous la référence 2018062216436109. Ce projet nécessite en tout 72 souris (60 souriceaux non-sevrés et 12 mères) (Figure 10). Dans chaque cage, sont réparties deux mères avec leur portée de 5 souriceaux. Les souriceaux devant être infectés à 5 jours et ne pouvant pour des raisons éthiques être transportés à cet âge, il a été nécessaire de commander des souris gestantes. Douze souris supposées gestantes ont été divisées à raison de deux souris par cage en 2 groupes (6 portées infectées avec *C. parvum* et 6 autres portées contrôles non infectées). Tous les individus ont été alimentés de la même manière (eau et nourriture à disposition dans la cage).

2.2.3. Schéma de l'étude

Le protocole expérimental a été établi en fonction des résultats de travaux antérieurs effectués au laboratoire montrant que les animaux immunocompétents se guérissent spontanément lors du sevrage quelque soit l'âge d'infection (Delaunay et al., 2000).⁽⁷²⁾ L'infestation des souriceaux à 5 jours apparaît comme optimal pour évaluer l'infectiosité de *C. parvum*.

Les souriceaux âgés de 5 jours ont été gavés avec 100 µL d'une suspension d'oocystes de *C. parvum* isolat Nouzilly (10^6 /ml) (ou d'une suspension contrôle (PBS) sans oocyste pour les contrôles). Comme il a été montré qu'après ingestion d'oocystes de *C. parvum* par les souriceaux le pic de l'infection est atteint au bout de 7 jours et la guérison est obtenue au 14^{ème} jour post infection, la variation de plusieurs paramètres a été suivie lors d'une cinétique après infection ou non par *C. parvum* sur 6 dates distinctes de sacrifice des animaux (J2, J4, J7, J10, J14 et J21 post infection) (Figure 10).

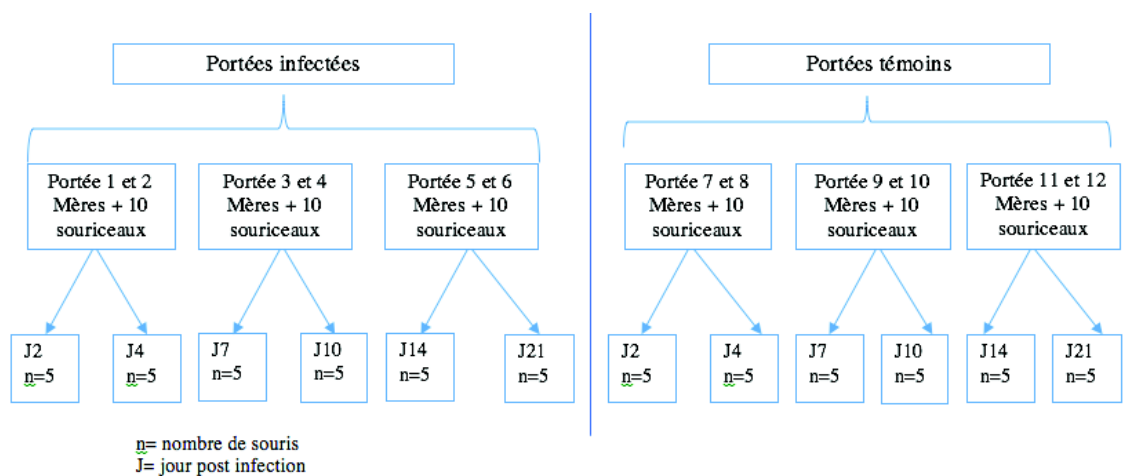


Figure 10 : Schéma de l'étude *in vivo*

2.2.4. Prélèvements

Après sacrifice des animaux par élongation cervicale, plusieurs prélèvements sont réalisés : prélèvements sanguins par ponction intracardiaque, prélèvement de l'intestin grêle avec son contenu, prélèvement du colon avec son contenu, prélèvement du cerveau. Une partie de l'intestin grêle et la totalité du prélèvement du cerveau sont conservées dans une solution aqueuse de formol 3% p/v pour analyse anatomopathologique.

Ces prélèvements permettront :

- La vérification de l'infection des souriceaux et de l'évolution du nombre d'oocystes dans les fèces ;
- L'évaluation de la perméabilité membranaire iléale *in vivo* par mesure de l'expression de l'ARNm des protéines des jonctions serrées et analyse anatomopathologique ;
- L'étude de l'évolution du microbiote présent au niveau duodénal, iléal et colique par comparaison avec les souris non infectées ;
- Le suivi de marqueurs inflammatoires intestinaux et cérébraux détectés par PCR et méthodes anatomopathologiques ;
- L'étude des translocations bactériennes dans le sang.

2.2.5. Caractérisation de l'infection par *Cryptosporidium parvum*

Le contenu colique prélevé aux différents temps de la cinétique ont été utilisés pour vérifier l'absence d'oocystes de *C. parvum* chez les souriceaux témoins et la présence d'oocystes chez les animaux infectés, et d'étudier la cinétique de la charge parasitaire.

L'extraction de l'ADN de *Cryptosporidium* spp. est réalisée à l'aide de la trousse QIAamp PowerFecal DNA Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fournisseur.

Une PCR temps réel est réalisée selon la technique décrite par Hadfield *et al.* (2011).⁽⁷³⁾ Il s'agit d'une PCR triplex spécifique du genre *Cryptosporidium* spp. amplifiant environ 300 paires de bases (pb) du gène de la sous unité 18S de l'ARN ribosomique (SSU rRNA), couplée à une PCR spécifique de *C. parvum* amplifiant un fragment de 166 pb du locus LIB13 et à une PCR spécifique de *C. hominis* amplifiant un fragment de 169 pb du même locus.

Les amorces et sondes utilisées sont résumées dans le tableau 9 (page suivante).

Tableau 9 : Amorces et sondes PCR en temps réel utilisées (Hadfield et al. 2011)

Locus cible	Amorces / sondes	Positions (nucléotides)	Séquences (5'-3')
<i>Cryptosporidium</i> species <i>SSU rRNA</i>	CRU18SF	440-468	GAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGG
	CRU18SR	710-738	CTGCTTTAAGCACTCTAATTTTCTCAAAG
	CRU18STM	587-609	FAM-TACGAGCTTTTTAACTGCAACAA MGB-NFQ
<i>C. parvum</i> <i>LIB13</i>	CRULib13F	228-253	TCCTTGAAATGAATATTTGTGACTCG
	CRULib13RCp	370-393	TTAATGTGGTAGTTGCGGTTGAAC
	CRULib13TMCp	339-358	VIC-TATCTCTTCGTAGCGGCGTA MGB-NFQ
<i>C. hominis</i> <i>LIB13</i>	CRULib13F	228-253	TCCTTGAAATGAATATTTGTGACTCG
	CRULib13RCh	374-396	AAATGTGGTAGTTGCGGTTGAAA
	CRULib13TMCh	340-357	VIC-CTTACTTCGTGGCGGCGT MGB-NFQ

Le mélange réactionnel (tableau 10) est additionné de 5 µL de solution d'ADN précédemment extrait :

Tableau 10 : Mélange réactionnel RT qPCR (PCR de spéciation)

	Super mix	CRU 18 SF	CRU1 8 SR	CRU1 8 STM	CRULib 13 F	CRULib 13 RCp	CRULib 13 TMCp	CRULib 13 F	CRULib 13 RCh	CRULib 13 TMCh
Quantité (µL)	10	1,5	1,5	0,33	1,5	1,5	0,33	1,5	1,5	0,33

Le programme (Tableau 11) est réalisé sur thermocycleur Bio-rad CFX96 (Bio-rad Laboratoires, Marnes la Coquette, France) :

Tableau 11 : Programme thermocycleur RT qPCR

	Température	Temps	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	95°C	10 min	1
Hybridation	95°C	15 s	55
Elongation	60°C	1 min	

Les résultats de la cinétique de l'infection obtenue par PCR temps réel ont été confrontés à une analyse microscopique par technique d'immunofluorescence (IF) directe (*Cryptosporidium* IF Test, Crypto cel, Cellabs Pty Ltd., Brookvale, Australia). La présence d'oocystes dans les selles des souris est détectée à l'aide d'un anticorps monoclonal (spécifique de la paroi des oocystes de *Cryptosporidium* spp.) de souris couplé à la fluorescéine. Lorsque l'échantillon est positif, on observe des oocystes qui font entre 2-6 µm, de forme ronde ou ovale apparaissant de couleur vert brillant.

2.2.6. Etude de l'expression des gènes codant pour les jonctions serrées des cellules épithéliales iléales

La technique utilisée pour mesurer l'expression des gènes codant pour les jonctions serrées des cellules épithéliales est la même que celle utilisée lors des études *in vitro*. Le trizol est utilisé pour extraire l'ARN des cellules épithéliales intestinales, et après l'extraction de l'ARN, une transcription inverse puis une RT qPCR sont réalisées comme *supra*.

2.2.7. Etude des marqueurs de l'inflammation

2.2.7.1. Mesure quantitative de la protéine C-fos activée par technique colorimétrique

Pour être active, la protéine C-fos doit former un dimère avec une autre protéine de la famille Jun comme C-jun. La dimérisation entre ces 2 protéines (fos et jun) forme un complexe transcriptionnel AP-1 (protéine activatrice-1). Ce complexe est la forme active de C-fos et peut se lier sur une séquence cible appelée TRE (TPA-Responsive Element). L'hétérodimère devient plus stable et entraîne la transcription d'ARN messager.

Les protéines contenues dans les tissus (intestinaux et cérébraux) ont été extraites à l'aide du kit ab113474- Nuclear Extraction Kit, abcam.

Le dosage quantitatif de la protéine C-fos activé a été effectué avec le kit ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) ab207194 (C-fos Transcription Factor Assay Kit, abcam). Selon la recommandation du fournisseur (Annexe 1), chaque extrait a été dilué afin d'obtenir une concentration finale 0,75µg/µL.

L'absorbance des différents puits de la plaque a été mesurée à 450 nm.

2.2.7.2. Etude de l'expression des gènes des 2 marqueurs de l'inflammation (gène *c-fos* et *tyrosine hydroxylase*)

L'extraction des ARN est réalisée sur les échantillons des intestins et des cerveaux congelés à -80°C aux différents temps (t=2h, t=18h, t=24h, t=48h, t=72h). L'ARN est extrait à l'aide du trizol (TRIZOL Reagent, thermofischer scientifique, Illkirch, France) comme décrits dans 2.1.4.1.

Après synthèse de l'ADN complémentaire par transcription inverse, l'expression des gènes des 2 marqueurs de l'inflammation (gène *c-fos* et *tyrosine hydroxylase*) est évaluée par PCR.

L'amplification génique a été réalisée avec la trousse SsoFast EvaGreen Supermix sur l'automate PCR en temps réel Bio-rad CFX96 (Bio-rad Laboratoires, Marnes la Coquette, France) avec les mêmes quantités et le même programme d'amplification que lors de l'étude de l'expression des gènes des jonctions serrées. Les amorces utilisées pour l'amplification sont les suivantes :

Tableau 12 : Amorces spécifiques de *c-fos* et *TH*

Amorces	Séquences (5'-3')	Références
c-fos (F)	AACCATCCCCGAAATCCTAC	Halliez et al.(2016) ⁽⁷⁴⁾
c-fos (R)	AGCGGAACAGAGAAACTGGA	
TH (F)	ATGTTGGCTGACCGCACATT	Zhang et al. (2011) ⁽⁵⁰⁾
TH (R)	CCGAATTCCACAGTGAACCAGT	

(R : Reverse primer, F : Forward primer)

2.2.8. Etude du microbiote intestinal

L'étude de l'évolution et de la diversité du microbiote présent est effectuée sur les prélèvements intestinaux aux différents temps et congelé au -80°C. Pour évaluer une modification du microbiote (fongioïme et bactériome), des comparaisons temporelles entre les souris infectées par *Cryptosporidium parvum* et les souris saines (témoins) sera effectuée.

Deux protocoles d'extraction de l'ADN génomique ont été évalués afin de déterminer celui permettant d'obtenir le meilleur rendement : (i) Extraction réalisée à l'aide de la trousse QIAamp PowerFecal DNA Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), cette méthode couple une lyse mécanique et une lyse chimique ; (ii) le protocole Q pour les échantillons fécaux (décrit en annexe 2) rédigé par l'organisme « International Humain Microbiome Standards » (IHMS) dont l'objectif est de coordonner le développement de procédure pour optimiser la qualité et la comparabilité des données dans le domaine du microbiome. Le protocole de l'IHMS couple l'usage d'une trousse QIAamp Fast DNA Stool Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) à d'autres réactifs afin d'améliorer la purification et le rendement d'extraction. L'étape

d'amplification avant séquençage va permettre de cibler le locus génomique d'intérêt et d'en synthétiser une quantité suffisante pour le séquençage.

L'amplification a été réalisée avec la TaqPhusion, (Phusion high-fidelity master mix, Thermofisher scientific, Illkirch, France) (Tableau 13 et 14) qui offre une fidélité extrême par rapport à la polymérase thermostable conventionnelle et un haut rendement de produit d'amplification.

Tableau 13 : Préparation du mélange réactionnel Taq Phusion pour la PCR 16S

Composant	Volume par réaction
H2O	12,5 µL
2x Phusion Master Mix	25 µL
Forward primer	2,5 µL
Reverse primer	2,5 µL
Échantillon	6 µL
DMSO	1,5 µL

Tableau 14 : Préparation du mélange réactionnel Taq Phusion pour la PCR 18S

Composant	Volume par réaction
H2O	8,5 µL
2x Phusion Master Mix	25 µL
Forward primer	2,5 µL
Reverse primer	2,5 µL
Blocked (4)	2,5 µL (x4 soit 10 µL)
Échantillon	6 µL
DMSO	1,5 µL

Différents loci se sont imposés comme des marqueurs de référence pour différents règnes, souvent présents dans l'opéron ribosomique (ADNr 16S pour les bactéries, ITS pour les champignons, ADNr 18S pour les eucaryotes, ...). Au cours de cette étude, deux couples d'amorces (V3-V4 et V4-V5) ont été utilisés pour l'analyse du bactériome. Ces amorces ciblent des régions hypervariables de l'ADNr 16s bactérien (Figure 11).

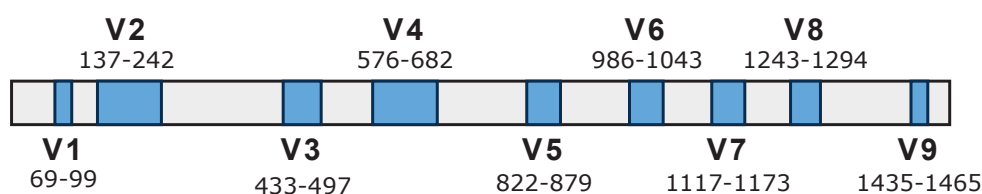


Figure 11 : Régions conservées (gris) et hypervariables (bleu) de l'ADNr 16S bactérien. Ces dernières sont numérotées de V1 à V9, et leurs positions sont tirées de Baker et *al.* (2003).⁽⁷⁵⁾

Pour le fongioïme, un seul couple d'amorce est utilisé amplifiant la zone hypervariable V7-V8, Ce jeu d'amorces est situé à la fin du gène de l'ARNr 18S, près de la région ITS1 (Banos 2018). (Tableau 15)

Les programmes d'amplification sont résumés dans les tableaux 16 et 17.

Tableau 15 : Amorces pour les PCR 18S et 16S utilisées

Amorces	Séquences 5'-3'	Références
18S (R)	CGATAACGAACGAGACCT	Banos et al. (2018) ⁽⁷⁶⁾
18S (F)	ANCCATTCAATCGGTANT	
16S (V3-V4 ; R)	GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT	Mach et al. (2017) ⁽⁷⁷⁾
16S (V3-V4 ; F)	CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG	
16S (V4-V5 ; R)	GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCGYCAATTCMTTTRAGT	
16S (V4-V5 ; F)	CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTGYCAGCMGCCGCGGTA	

Tableau 16 : Programme thermocycleur Taq Phusion pour la PCR d'amplification 16S

	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	98°C	30s	1
Hybridation	98°C	10 s	30
	43-53°C	30s	
	72°C	30s	
Elongation	72°C	1 min	1

Tableau 17 : Programme thermocycleur Taq Phusion pour la PCR d'amplification 18S

	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	94°C	4 min	1
Hybridation	94°C	30 s	30
	46-53°C	1 min	
	72°C	1min30s	
Elongation	72°C	10 min	1

Avant séquençage et analyse de la diversité du microbiote (GENOTOUL-Genopole Toulouse), les produits d'amplification ont été visualisés sur gel d'agarose 2%.

3. Résultats

3.1. Étude *in vitro* : cultures de cellules HCT8 infectées par *Cryptosporidium parvum*

3.1.1. Cinétique de la résistance transépithéliale mesurée en discontinue

Les monocouches de cellules HCT-8 non infectées développent régulièrement des résistances moyennes de 425 ± 10 ohms.cm². Les monocouches cellulaires HCT-8 infectées par le *Cryptosporidium parvum* montrent une diminution de la résistance au cours du temps (Figure 12, expérience représentative). Cette diminution de la résistance est observée dès les premières heures de l'infection et est significativement forte (diminution de 162 ohms.cm², correspondant à une augmentation de la perméabilité de 30%) au bout de 24h d'inoculation par rapport aux cellules non-infectées (test de Student, $p=0.016$).

Après 24h, on observe un rétablissement des jonctions serrées, se traduisant par l'augmentation de la résistance électrique transépithéliale à travers la monocouche cellulaire.

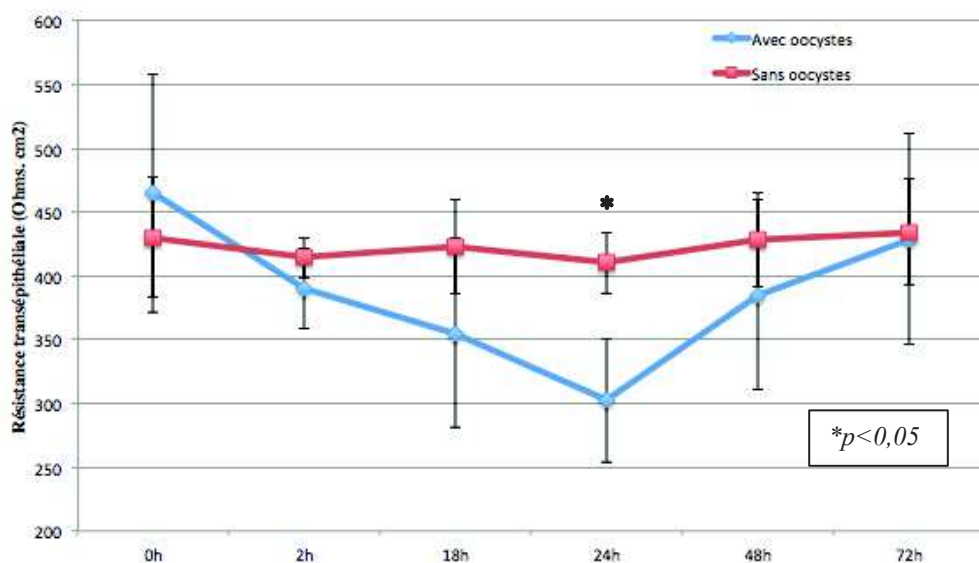


Figure 12 : Évolution de la résistance transépithéliale des cellules HCT-8 au cours du temps

3.1.2. Cinétique de la résistance transépithéliale mesurée en continue

L'adhérence cellulaire est représentée par le logiciel xCELLigence sous le nom d'indice cellulaire (mesure sans unité). A mesure que les cellules adhèrent aux plaques, la valeur de l'indice cellulaire augmente à partir de zéro (Figure 13). L'augmentation initiale est associée à

l'attachement des cellules. Ces cellules sont fortement adhérentes et aussi prolifératives (indice cellulaire passant de 0.5 à 8.5) jusqu'à ce qu'elles forment une monocouche se traduisant par une phase de plateau (indice cellulaire moyen : 8.5)

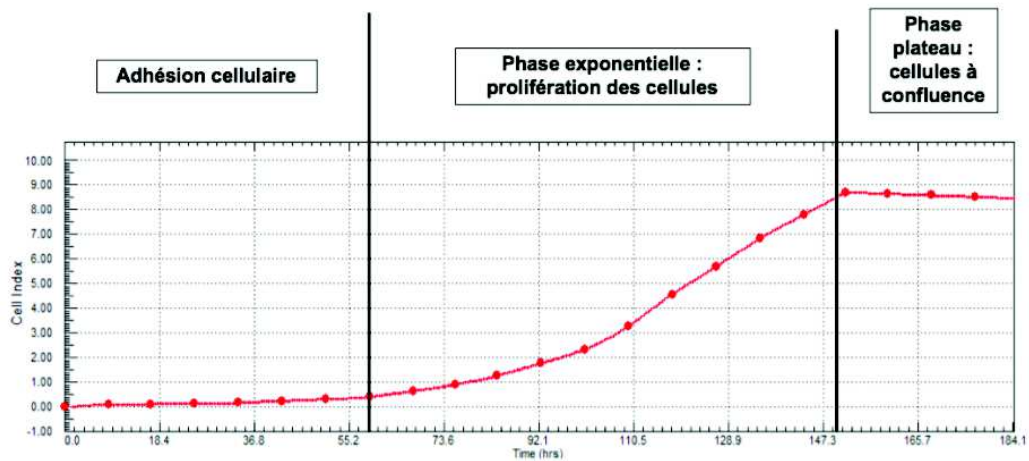


Figure 13 : Phase de croissance des cellules HCT-8 (adhésion, prolifération, confluence)

La région centrale des puits des microplaques « E-plate view » ne contient pas d'électrodes afin de faciliter le suivi et l'observation des expérimentations par microscopie (Figure14).

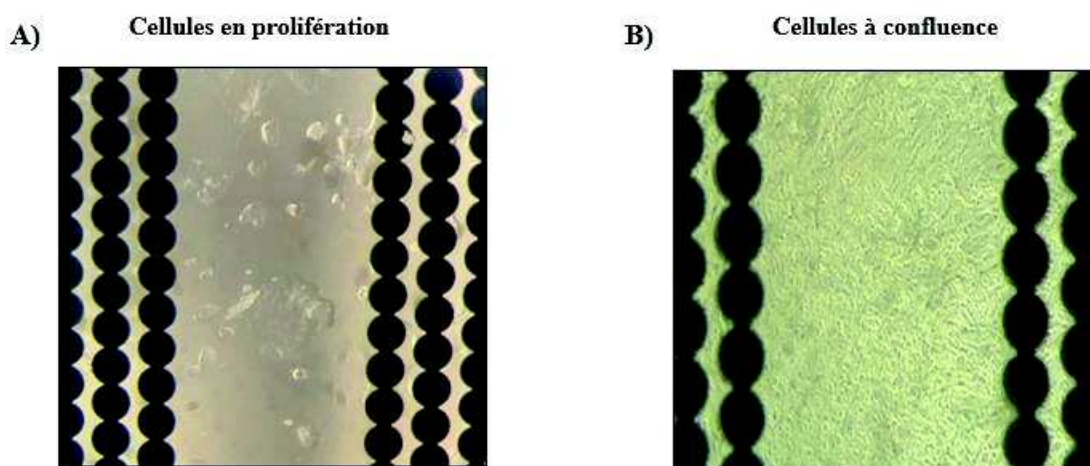


Figure 14 : Observation microscopique des cellules HCT-8 d'un puit de la plaque de l'appareil xCELLigence . Image en microscopie optique (x20) de cellules recouvrant le fond d'un puits. (A) phase de prolifération ; (B) cellules à confluence. Les lignes de ronds noirs correspondent aux électrodes.

L'incubation des monocouches avec du chitosane hydrochloride (1.5%) comme témoin positif de l'altération de la perméabilité cellulaire a entraîné une réduction prononcée et immédiate des valeurs de l'indice cellulaire passant de 8 à 1 environ 15 minutes après l'ajout du réactif (Figure 15). L'incubation prolongée des cellules, après la forte diminution due au chitosane, n'entraîne qu'une légère diminution de l'indice cellulaire, comparée à la réduction initiale. Ces résultats démontrent clairement que le chitosane hydrochloride est capable d'altérer l'intégrité des jonctions serrées, se traduisant par la réduction de l'indice cellulaire des monocouches HCT-8.

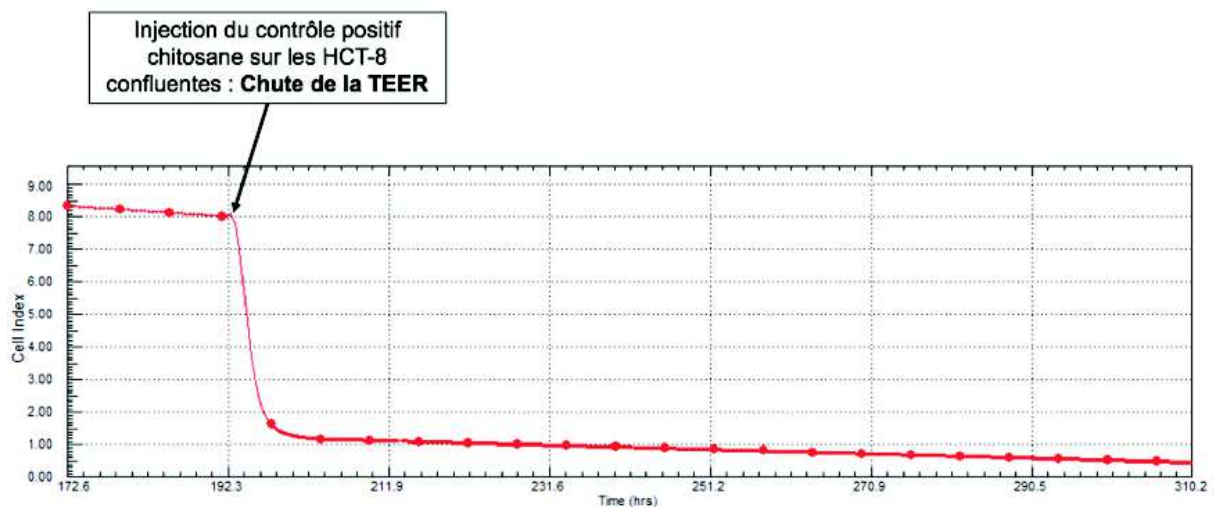


Figure 15 : Evolution de la TEER après injection du chitosane (contrôle positif de rupture des jonctions serrées)

L'inoculation des oocystes de *C. parvum* sur la monocouche cellulaire HCT-8 entraîne une augmentation de la perméabilité se traduisant par la diminution de l'indice cellulaire (Figure 16). Comparé aux puits non infectés dont l'IC se stabilise autour de 8, dans les puits infectés, l'IC passe de 8 à 6,5 au bout de 48h (soit une augmentation de 22% de la perméabilité). Ensuite comme dans la lecture de la perméabilité en discontinue, on observe également un rétablissement des jonctions sans atteindre la valeur initiale avant inoculation. Ces résultats démontrent que la surface cellulaire est endommagée et que l'étanchéité de la monocouche cellulaire est altérée suite à l'infection par *C. parvum*.

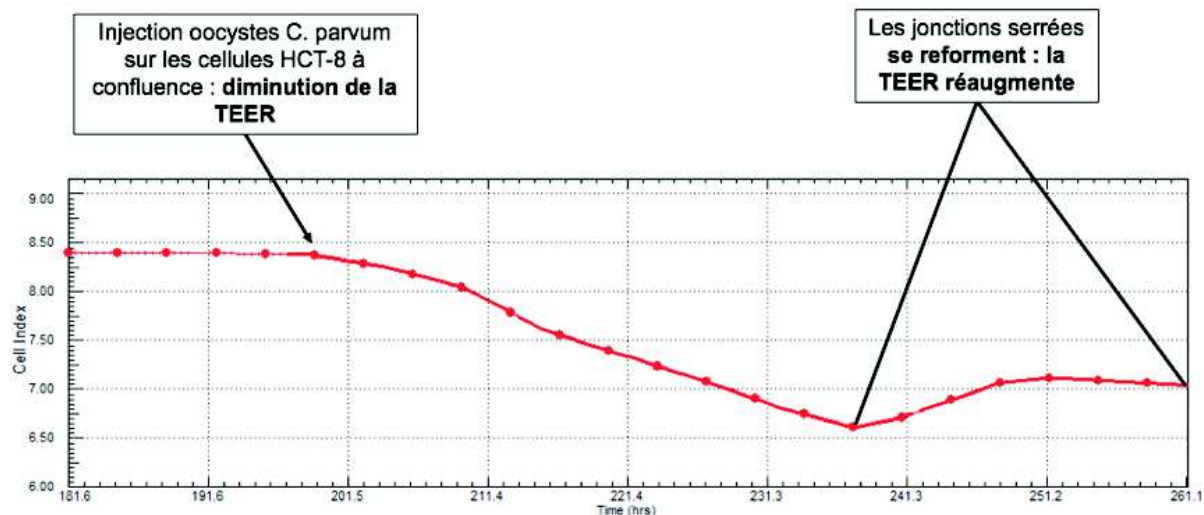


Figure 16 : Evolution de la TEER des cellules HCT-8 au cours du temps après inoculation de *C. parvum*

3.1.3. Évolution de l'expression des gènes codant pour les jonctions serrées des cellules épithéliales

Dans toutes les expériences réalisées, l'expression des gènes codant pour les jonctions serrées de la monocouche cellulaire n'a pas été affectée par l'inoculation des oocystes de *Cryptosporidium parvum* (Test de Student à 72h : claudine-4 : $p=0.66$, occludine : $p=0.42$, ZO-1 : $p=0.23$).

3.1.4. Évolution des jonctions serrées à la surface des cellules épithéliales par immuno-fluorescence en présence de *Cryptosporidium parvum*

La localisation des protéines de jonctions serrées a été étudiée par immunofluorescence. Sur la monocouche non infectée, les protéines des jonctions serrées sont étroitement associées à l'interface cellule-cellule (Figure 17). Afin d'étudier l'effet de l'infection à *C. parvum* sur la monocouche épithéliales et d'identifier le mécanisme impliqué dans la perte de la fonction de la barrière *in vitro*, la visualisation de la localisation de ces protéines est actuellement en cours avec la collaboration de la Plate-Forme de Recherche en Imagerie Cellulaire de Normandie (PRIMACEN).

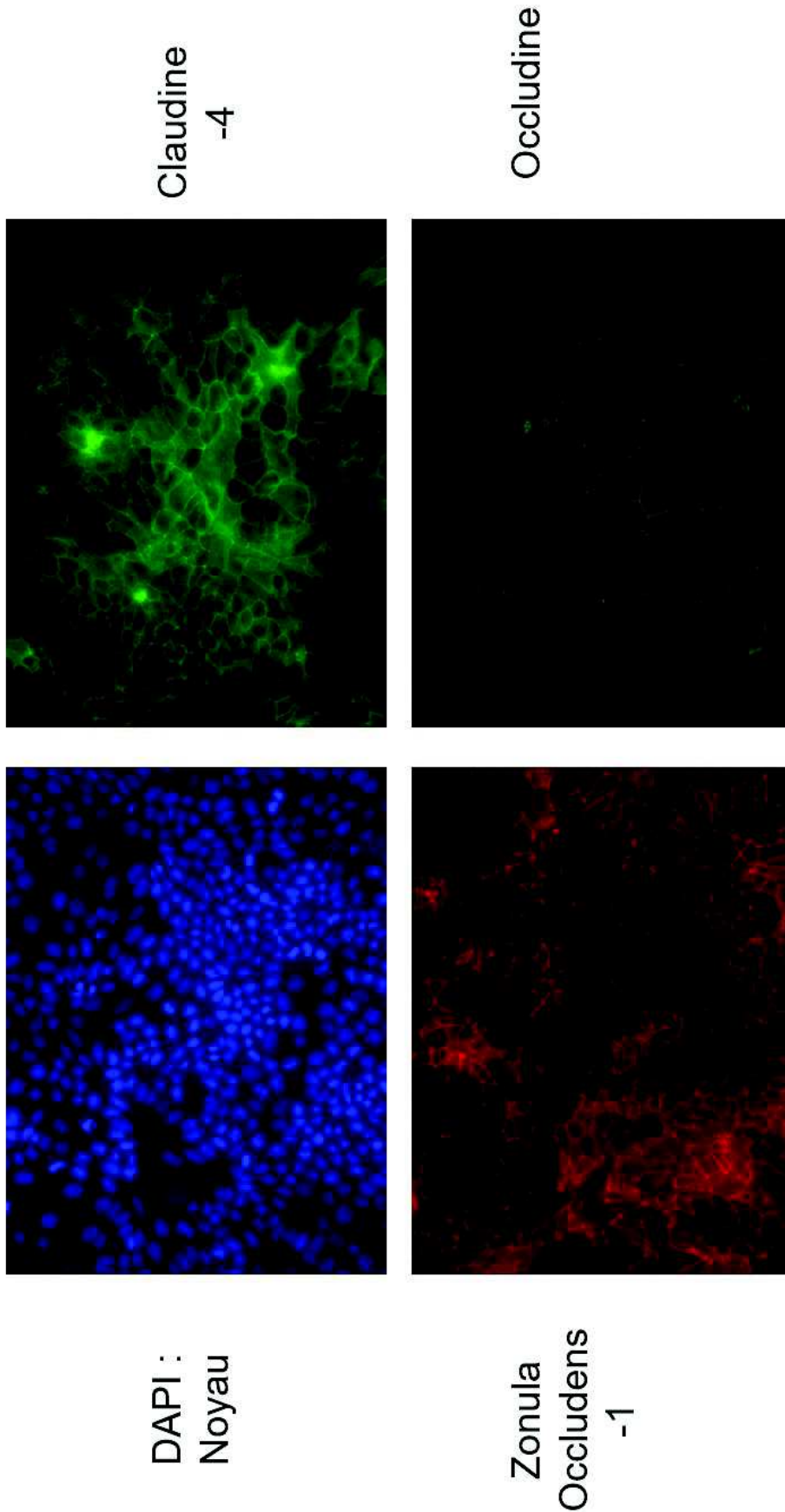


Figure 17 : Marquage par immunofluorescence des jonctions serrées des cellules HCT-8 sans *Cryptosporidium parvum*, observation au microscope à fluorescence (X 400)

3.2. Étude *in vivo* : modèle d'infection expérimentale du souriceau par *Cryptosporidium parvum*

3.2.1. L'évolution de l'infection des souriceaux

Le schéma de l'excrétion d'oocystes des souriceaux expérimentalement infectés avec *C. parvum* est illustré par la figure 18. La quantification relative de l'ADN parasite montre un pic d'infection au 10^{ème} jour post-inoculation. Au-delà de ce jour, une guérison progressive des souris avec une diminution de l'excrétion parasitaire est observée. L'apparition des diarrhées observée lors des différents prélèvements coïncide avec l'augmentation d'oocystes excrétés (Figure 19).

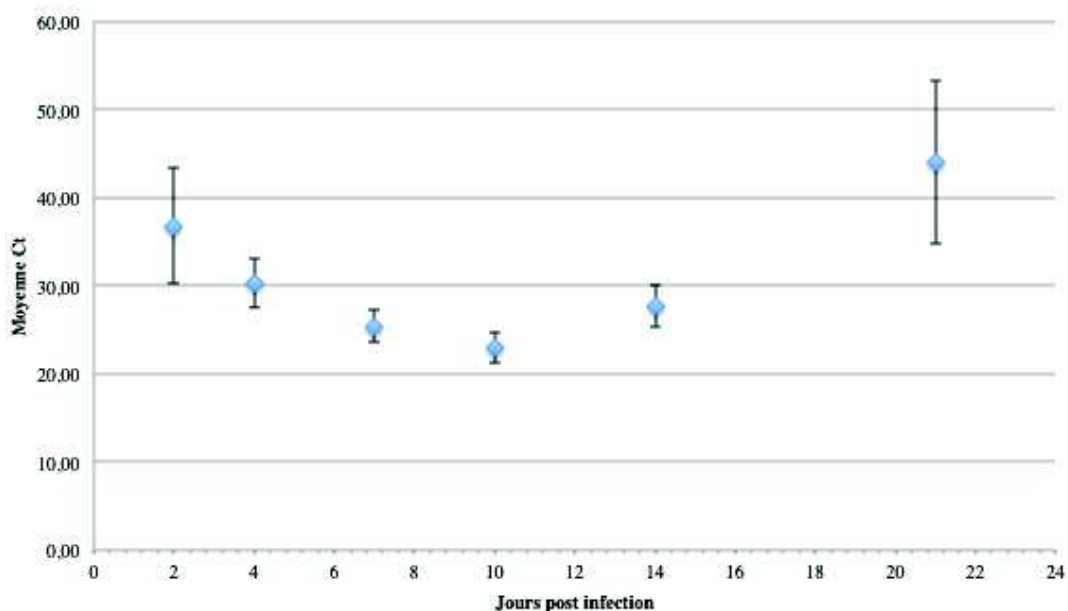


Figure 18 : Evolution de l'ADN parasite dans les selles chez les souriceaux infectés



Figure 19 : Souriceau diarrhéique (J10) vs souriceau non diarrhéique (J21)

Chez les souriceaux infectés, aucun oocyste n'est détecté ni à J2, ni à J4 post-infection lors de la recherche de parasites dans les fèces par microscopie en utilisant l'anticorps monoclonal anti-*Cryptosporidium* spp. A J7 et encore plus à J10 post-infection, on observe un nombre très important d'oocystes ne permettant pas leur dénombrement (>100/ champs) Après ce pic, la diminution de l'excrétion des oocystes a été observée à J14 post infection (4 oocystes / champs) pour devenir indétectable à J21. (Figure 20)

Ces résultats indiquent que les souriceaux témoins n'ont pas été contaminés accidentellement, et que tous les souriceaux gavés par des oocystes développent l'infection avec un pic à J10 post-infection et une guérison à J21.

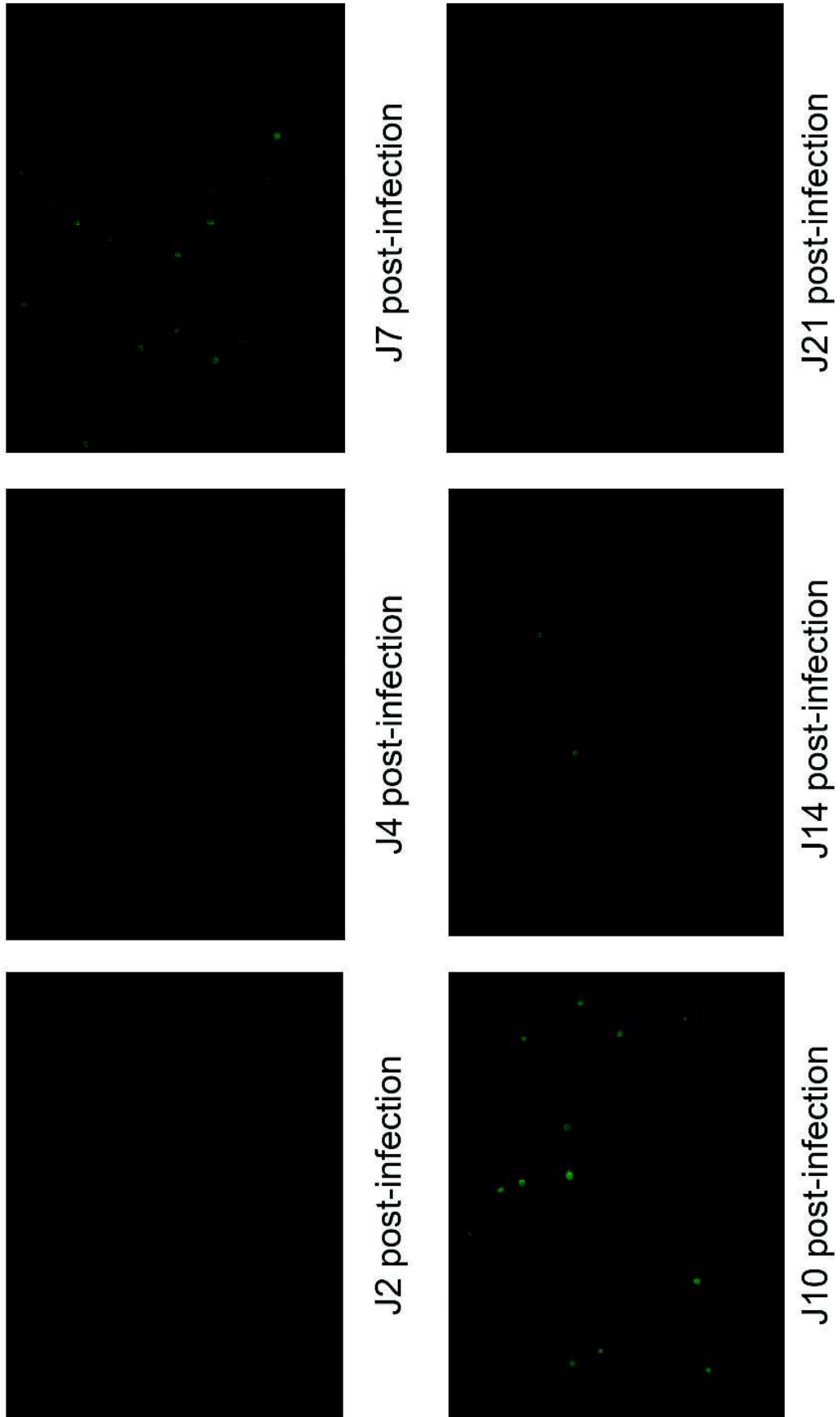


Figure 20 : Aspect microscopique des étalements fécaux des souriceaux infectés après incubation avec l'anticorps anti-cryptosporidien fluorescent (x400)

3.2.2. Évolution de l'expression des gènes codant pour les protéines jonctions serrées au niveau de l'intestin

La comparaison de l'expression des gènes codant pour les protéines des jonctions entre souris infectées et non infectées n'a pas montré de différence significative (Test de Student, $p > 0.05$).

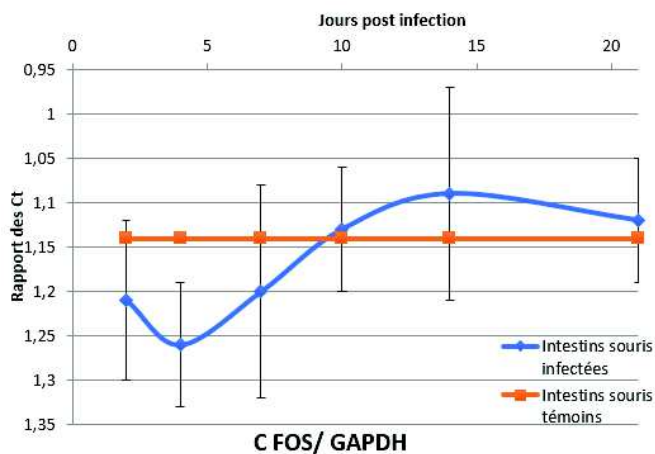
3.2.3. Évolution des marqueurs de l'inflammation au niveau intestinal et cérébral

(i) Expression du gène *c-fos* et de la *tyrosine hydroxylase (TH)* au niveau intestinal

Au niveau intestinal, à J4 post infection, une diminution significative de l'expression de gène codant pour la protéine C-fos est observée chez les souris infectées (Test de Student, $p = 0.039$). Au-delà, pas de différence significative de l'expression de gène est observée entre les souris infectées et les souris témoins non infectées (Figure 21 A).

Au niveau intestinal, on observe la même allure de courbe que celle du gène *c-fos* pour l'expression du gène de la *TH* avec une différence significative à J4 post infection (Figure 21 B) entre les souris infectées et les souris témoins (Test de Student, J4 : $p = 0.024$).

A



B

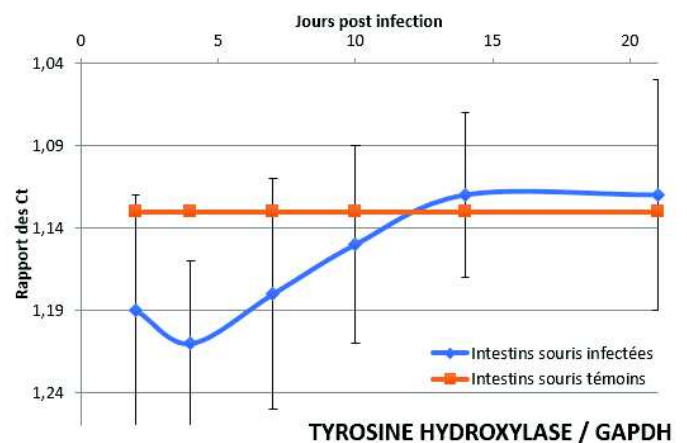


Figure 21 : Cinétique de l'expression relative de l'ARNm de la protéine C-fos et de la tyrosine hydroxylase par les intestins des souris au cours de l'infection ou non

(ii) Expression du gène *c-fos* et de la *TH* au niveau du cerveau

Au niveau du cerveau, dans le temps, pas de différence significative d'expression de gène *c-fos* n'est observée chez les souris infectées (Test de Student, $p=0.1652$).

Il est intéressant de noter que l'expression du gène *c-fos* est plus importante au niveau du cerveau qu'au niveau de l'intestin entre J4 et J10 post infection (Test de Student, J4 : $p=0.004$, J7 : $p=0.024$, J10 : $p=0.025$). (Figure 22 A)

Les observations réalisées pour l'expression du gène *c-fos* au niveau cérébral sont également applicables pour celui de la *tyrosine hydroxylase*. L'augmentation au niveau du cerveau est non significative (Test de student, $p>0.05$).

Cependant la comparaison de l'expression du gène de la *tyrosine hydroxylase* au niveau de l'intestin et du cerveau montre une augmentation significative dans le cerveau à partir de J7 post infection et qui se maintient jusqu'à la guérison des souris (Test de Student, J7 : $p=0.00051$, J10 : $p=0.0033$, J14 : $p=0.0006$ et J21 : $p=0.03$) (Figure 22 B).

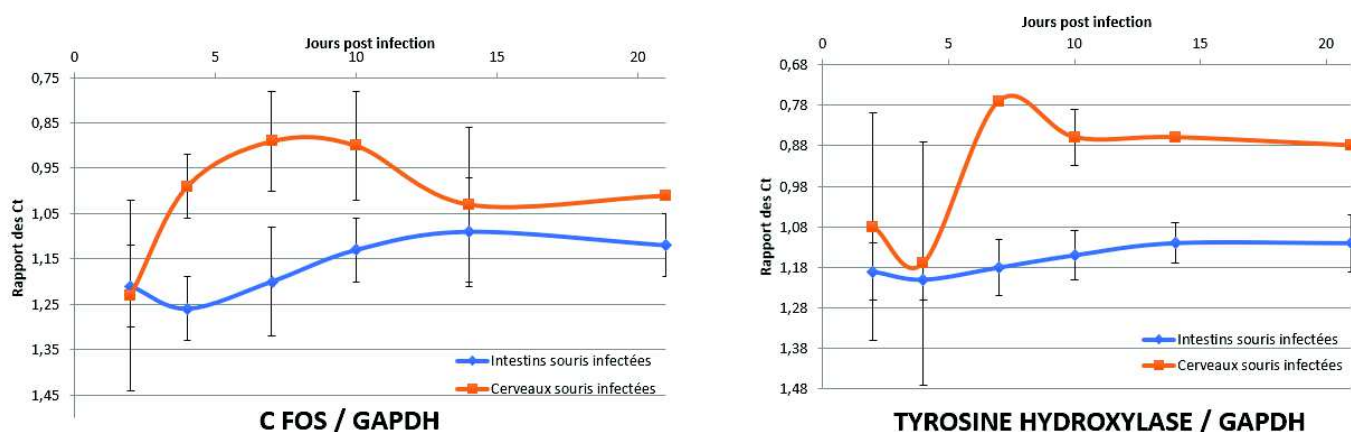


Figure 22 : Cinétique de l'expression relative de l'ARNm de la protéine C-fos et tyrosine hydroxylase par les intestins et les cerveaux des souris au cours de l'infection

(iii) Évaluation de l'inflammation par ELISA

Au niveau de l'intestin, l'analyse de la densité optique montre une diminution significative de la présence de la forme active du C-fos entre J7 et J10 correspondant au moment où il y a une forte multiplication du parasite (Test de Student, $p=0.015$). Parallèlement, on assiste à une

augmentation de l'expression du gène *c-fos* et qui se maintient jusqu'à la guérison de la souris. (Figure 23)

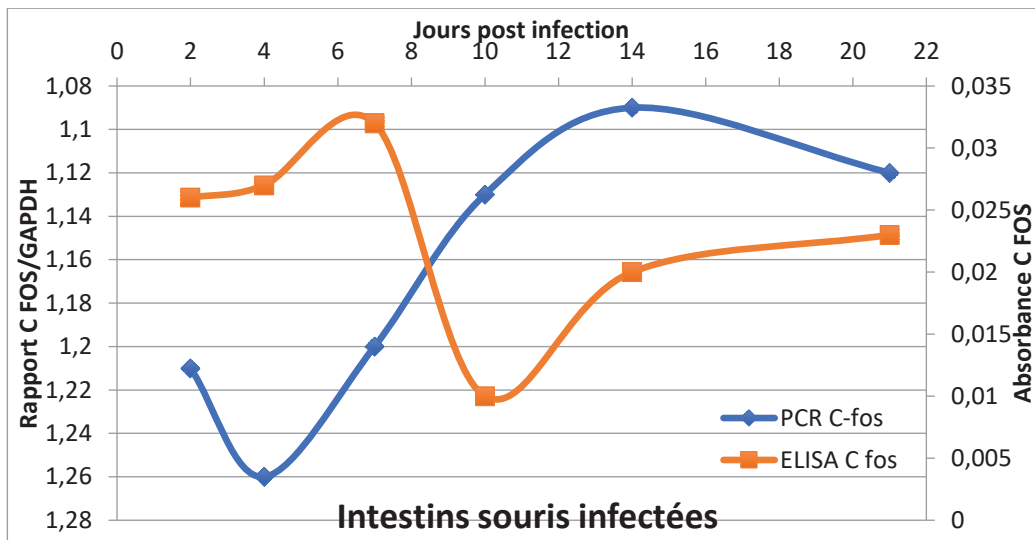


Figure 23 : Cinétique comparative entre la technique de PCR (expression du gène *c-fos*) et la technique ELISA (protéine C-fos activée) au niveau de l'intestin des souris infectées

Au niveau du cerveau, à partir de J10 post-inoculation (pic d'excrétion des oocystes dans les fèces), la quantité de protéine active est significativement supérieure à celle au début de l'infection (Test de Student, $p=0.0019$) (Figure 24). Quant à l'expression du gène, pas de différence significative n'est observée au cours du temps.

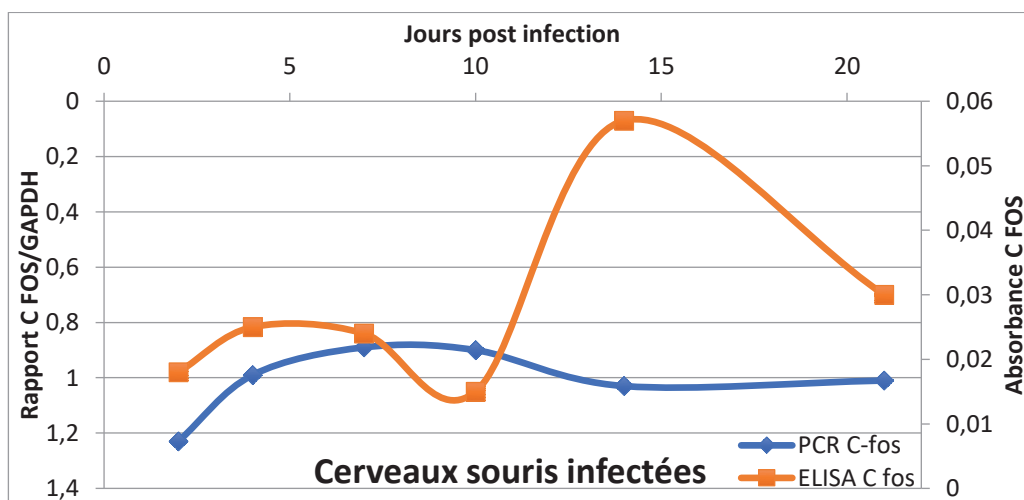


Figure 24 : Cinétique comparative entre la technique de PCR (expression du gène *c-fos*) et la technique ELISA (protéine C-fos activée) au niveau du cerveau des souris infectées

3.2.4. Évolution du microbiote intestinal lors d'une infection à *Cryptosporidium parvum*

Les résultats présentés ici sont partiels et ne représentent que le microbiote des souris non infectées à J21 (quantité de prélèvement plus important). Après vérification des produits d'amplification (Figure 25), le séquençage et l'analyse Métagénomique ont été effectués au sein du Genopole de Toulouse.

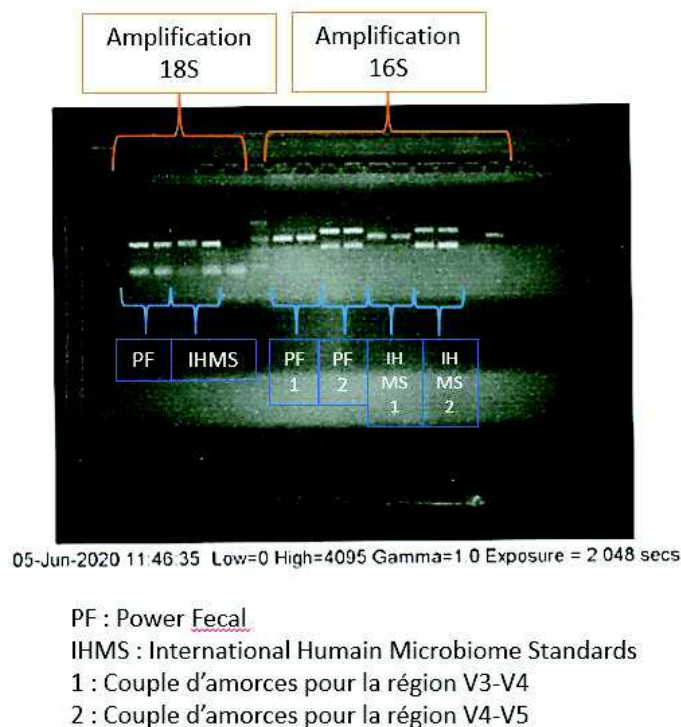


Figure 25 : Révélation des séquences amplifiées par PCR 16S et 18S sur gel d'agarose à 2%

En moyenne, 48 965 séquences ont été obtenues avec les amorces ciblant l'ADNr 16S et 33 961 séquences pour l'ADNr 18S. L'analyse des données est configurée pour assembler des séquences avec un seuil d'identités de 97%, correspondant au seuil arbitraire classique de distinction des espèces bactériennes. En pratique, si deux espèces proches sont présentes dans l'échantillon, et que les séquences de leurs ARNr 16S divergent de moins de 3% de différence, on n'obtiendra qu'une seule séquence représentative.

Tandis que la technique d'extraction Power Fecal offre plus de séquences pouvant être utilisées pour établir le profil bactérien des populations ainsi que l'étude de leur diversité, la technique de IHMS est mieux adaptée pour l'étude du fongioïme.

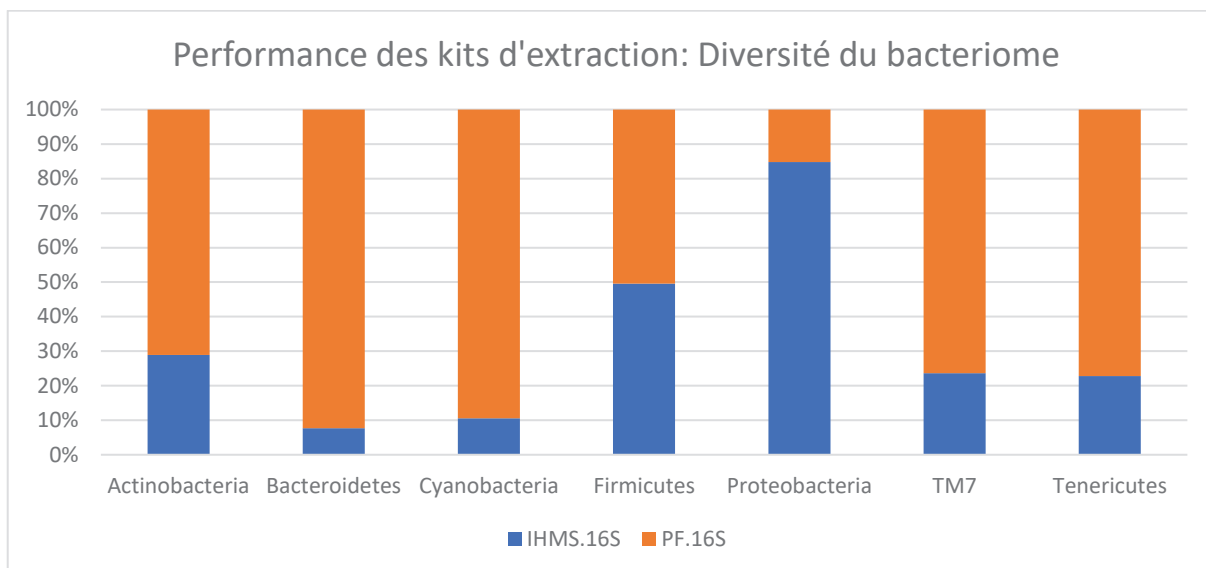


Figure 26 : Performance des kits d'extraction

4. Discussion

4.1. Étude de l'augmentation de la perméabilité au cours de l'infection par *C. parvum*

Au cours de cette étude, nous avons observé une augmentation de la perméabilité durant les 24 premières heures par mesure discontinue ou durant les 48h premières heures par mesure continue. Ces derniers résultats sont en concordance avec d'autres observations. En effet, McCole et *al.* (2000) ont montré que le pourcentage de cellules présentant une morphologie apoptotique augmente significativement dans les cellules HCT-8 infectées par *C. parvum* au cours des 24 premières heures après infection par rapport aux cultures témoins non infectées. ⁽⁷⁸⁾ Bien que l'infection cellulaire est directement requise pour induire l'apoptose des cellules épithéliales, il est important de noter que la possible libération de médiateurs par les cellules infectées pourrait induire l'apoptose dans les cellules non infectées adjacentes. Cela a déjà été démontré dans des cultures de cellules infectées par *Salmonella*. ⁽⁷⁹⁾

Bien que nous observions une diminution significative de la résistance transépithéliale après inoculation des oocystes de *C. parvum* (30% en lecture discontinue ; 22% en lecture continue), nos résultats diffèrent de ceux de Sablet et *al.* (2016). ⁽⁸⁰⁾ En effet, ils ont observé une diminution de plus de 50% de la résistance à 24h après infection. L'explication la plus probable de nos résultats est que *C. parvum* empêche l'induction de niveaux élevés d'apoptose épithéliales tôt après infection, lorsque le parasite dépend de la cellule hôte pour sa croissance et son

développement. Notre faible mais significative diminution de la résistance pourrait être le résultat d'une induction modérée de l'apoptose cellulaire tôt après infection et également la possibilité du parasite de limiter la réponse inflammatoire de l'hôte, ce qui pourrait nuire à sa survie.

Durant leur phase d'invasion, de nombreux agents infectieux (virus, bactéries, protozoaires) altèrent la perméabilité paracellulaire pour promouvoir leur pénétration dans la couche de cellules (Bonazzi *et al.*, 2011).⁽⁸¹⁾ *Giardia duodenalis* (protozoaire entérique) perturbe ainsi les jonctions intercellulaires. Pour *Giardia*, l'altération de la perméabilité est associée à l'attachement des trophozoïtes sur les cellules.

Pour *Cryptosporidium parvum*, dans notre étude *in vitro* de l'expression de gène codant pour 3 protéines intervenant dans la formation des jonctions serrées (Claudine-4, occludine et ZO-1), nous n'avons constaté aucune modification de la quantité d'ARNm exprimée, un résultat conforté par ceux de l'étude de Sablet *et al.* (2016).⁽⁸⁰⁾ En effet, par microscopie, ils n'ont également observé aucun changement dans la localisation cellulaire des protéines des jonctions serrées (Claudin-1, Occludine et ZO-1). En revanche, la localisation des protéines E-cadherine et β -catenine se trouve altérée dans les cellules infectées par *C. parvum*.

Kumar *et al.* (2018) ont montré qu'*in vivo* l'infection entraîne une diminution de l'expression des ARNm et de la quantité des protéines des jonctions serrées.⁽⁸²⁾ Ils expliquent cette différence entre les résultats *in vitro* et *in vivo* par des différences entre les mécanismes de régulation dans les différentes espèces de mammifères ou par la mise en jeu *in vivo* de plusieurs facteurs liés à la composition complexe de l'environnement intestinal. Dans notre étude, nous ne retrouvons pas de différence d'expression aussi marquée chez les souriceaux. Pour expliquer ce phénomène, on peut exclure un défaut d'infection de certains souriceaux, puisque tous étaient bien infectés avec *C. parvum* Nouzilly (utilisé tout au long de cette étude). De plus, il est établi comme particulièrement infectieux chez les souris BALB/c.

La pathogénicité entre les différentes espèces de *Cryptosporidium* spp. pour leurs différents hôtes est variable ce qui suggère que la virulence d'une espèce peut varier selon l'isolat.⁽⁸³⁾ Ainsi, la dégradation des jonctions pourrait dépendre de l'isolat de *Cryptosporidium* spp. et de son génotype : (i) d'autres isolats de *C. parvum* devront être testés sur la même lignée afin de confirmer ou infirmer cette hypothèse. (ii) Les souris BALB/c d'après les études étaient les plus sensibles à l'infection par *C. parvum*. Un des facteurs de l'environnement intestinal décrits par Kumar *et al.*, comme perturbateurs des jonctions serrées *in vivo* pourrait agir différemment chez

les souris BALB/c immunocompétentes que nous avons utilisées et chez les C57BL/6 adultes immunosupprimées utilisées par Kumar et al..

4.2. L'inflammation

Un des mécanismes physiopathologiques du SII est la présence d'une inflammation chronique. Aucune étude des marqueurs inflammatoires n'a été réalisée en présence de *Cryptosporidium* spp. et encore moins au cours d'une cinétique. Selon nos résultats *in vivo*, que ce soit pour le gène de la *tyrosine hydroxylase* ou le gène de *c-fos*, on a une diminution significative à J4 post infection au niveau intestinal. Au niveau cérébral, les variations sont non significatives pour les 2 gènes, par contre l'expression du gène est significativement plus élevée au niveau du cerveau qu'au niveau intestinal. En accord avec nos résultats (expression du gène du *c-fos* plus élevée au niveau cérébral qu'au niveau intestinal), Zhang et al. (2011) ont également montré, chez des rats atteints de SII, que la concentration de C-fos était corrélée aux signes cliniques. ⁽⁵⁰⁾ Pour la *TH* ils ont montré que l'expression de l'ARNm dans la muqueuse colique humaine des patients atteints de SII était légèrement plus élevée que les sujets sains mais non significatif. Ils n'ont pas réalisé de dosage au niveau cérébral de la *TH*.

Avec les résultats de cette étude, nous documentons pour la première fois les conséquences de l'infection par *Cryptosporidium parvum* sur l'expression des protéines de l'inflammation. Chez *Giardia duodenalis*, un autre parasite qui a été reconnu comme responsable de SII-PI, Hanevik et al. (2009) ; Halliez et al. (2016) ont montré une augmentation significative de l'expression du gène *c-fos* au niveau de la moelle épinière dès la phase aiguë de l'infection jusqu'à 50 jours post infection. ^(84 ; 74)

4.3. Évaluation de la diversité du microbiote intestinal

Dans ce manuscrit, nous n'avons travaillé qu'avec un seul marqueur phylogénétique, l'ARNr SSU. Ce marqueur est un des gènes conservés les plus étudiés et a servi à l'évaluation de la majorité des autres outils d'analyse taxonomique aujourd'hui disponibles. Dans une démarche prospective, une optimisation de la méthodologie d'extraction de l'ADN génomique a été entreprise. En effet, l'ADN doit être extrait en quantité suffisante pour la préparation de la librairie de séquençage, et dans des proportions respectant celles des organismes dans le milieu. La méthode d'extraction doit être adaptée à la nature des cellules de ces derniers. Leur hétérogénéité implique des propriétés variables (telles que leur taille ou la structure de leur

paroi), qui les rendent par exemple plus ou moins sensibles à différentes méthodes de lyse. Une approche enzymatique douce n'extraira pas l'ADN des cellules plus résistantes (archées et Gram+ par exemple), mais une approche mécanique brutale risque de fragmenter l'ADN qui ne pourra pas être amplifié. Ainsi pour l'étude d'investigation de la cinétique de la modification du microbiote intestinal au cours de l'infection par *C. parvum*, la trousse d'extraction Power Fecal (QIAamp PowerFecal DNA Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France)) sera utilisée pour l'étude du bactériome et la technique IHMS pour le fongioïme.

Une modification du microbiote a été décrite chez les souris atteintes de cryptosporidiose par Ras et *al.* en 2015.⁽⁸⁵⁾ Dans un modèle souriceau (CD-1), les principales modifications observées sont une augmentation des bactéries appartenant au Phylum Bacteroidetes et une diminution du Phylum Firmicutes chez les souris infectées par le parasite. Le Phylum Firmicutes contient des bactéries telles que *Streptococcus* et *Lactobacillus*. Or *Lactobacillus* est connu pour être une bactérie bénéfique pour l'organisme et protégeant des infections (Mammeri et *al.* 2019).⁽⁸⁶⁾

Parmi ces études aucune ne s'est intéressée ni à l'évolution dans le temps du bactériome des souriceaux expérimentalement infectés avec *C. parvum*, ni à l'évolution du fongioïme lors d'une cinétique du microbiote intestinal. Certaines de ces études présentent également des limites comme l'utilisation de dexaméthasone, un glucocorticoïde, pour pouvoir infecter les souris adultes. L'utilisation de dexaméthasone chez des souris, en plus de diminuer le poids, le nombre de neutrophiles et de lymphocytes, entraîne une modification de la composition du microbiote.⁽⁸⁷⁾

4.4. Les perspectives

Les perspectives envisageables en prolongement direct de cette thèse concernent 5 objectifs importants : (i) avec des études *in vitro*, de documenter la translocation bactérienne, d'améliorer le modèle cellulaire, et de tester d'autres génotypes de *C. parvum* mais également d'autres espèces de *Cryptosporidium* spp.. (ii) Avec des études *in vivo*, d'évaluer l'impact d'un traitement tel que le nitazoxanide sur le microbiote intestinal mais également de mesurer la production des acides gras à chaîne courte (AGCC) suite au traitement.

(i) Chez les patients atteints du SII, de nombreuses études ont démontré que l'altération de la barrière épithéliale entraîne un déséquilibre dans le microbiome intestinal par

rapport aux témoins sains ^(88 ; 89 ; 90), Halliez et al. (2016) ont démontré que l'infection par *Giardia duodenalis* induit une augmentation de la translocation des bactéries commensales, aussi bien pendant la phase d'acutisation qu'en phase post infectieuse. En revanche pour *Cryptosporidium* spp. peu d'études se sont intéressées à ce paramètre.

Les données recueillies au cours de cette thèse proviennent du modèle cellulaire HCT-8. Il serait intéressant de comparer et valider ces résultats en utilisant d'autres modèles de barrière épithéliale intestinale comme le Caco-2 (adénocarcinome colique humain) ou un modèle mixte Caco-2/HT29-MTX. La lignée HT29-MTX, provient d'un adénocarcinome du côlon humain, pluripotente, se différencie en cellules caliciformes (capable de produire du mucus) formant une couche protectrice comme dans l'intestin. Avec l'utilisation du modèle Caco-2/HT29-MTX on se rapprochera donc de la physiologie gastro-intestinale.

In vivo, la quantité d'oocystes de *C. parvum* nécessaire pour infecter 50% des personnes exposées est comprise entre 10 à 1 000 oocystes. ⁽⁹¹⁾ Au cours de cette étude, nous avons utilisé une concentration de 10⁵ oocystes/puits, il est donc prévu de tester un gradient de concentration en oocystes avec le modèle *in vitro* pour documenter la concentration minimale nécessaire induisant une modification de la perméabilité de la barrière intestinale.

Dans cette thèse, une seule espèce de *Cryptosporidium* spp. est utilisée ainsi qu'un seul génotype. La pathogénicité entre les différentes espèces de *Cryptosporidium* spp. pour leurs différents hôtes est variable ce qui suggère que la virulence d'une espèce peut varier selon l'isolat. Les méthodes réalisées sur *C. parvum* Nouzilly que ce soit pour la perméabilité mais également pour tous les autres paramètres étudiés dans cette thèse pourront être réitérées avec d'autres génotypes ou espèces. Ces nouvelles données permettront l'identification des génotypes de *Cryptosporidium* spp. à risque de pathogénicité à long terme.

(ii) Un déséquilibre du microbiote a été décrit chez des souris infectées par *Cryptosporidium parvum* sous traitement antibiotique ⁽⁹²⁾. La cloxacilline montre une activité sur *Cryptosporidium parvum in vitro* ; or *in vivo*, le traitement par cet antibiotique ne diminue pas l'infection à *C. parvum*. Le traitement entraîne une prolifération des enterobactéries et une déplétion des bactéries Gram-positives. A l'heure actuelle, aucune étude ne s'est intéressée à l'action du nitazoxanide, seule molécule approuvée pour le traitement de la cryptosporidiose, sur le microbiote intestinal. Les bactéries Gram-positives génèrent les AGCC qui peuvent réguler la réponse immunitaire et permettent la production d'interféron γ jouant un rôle dans le contrôle de la cryptosporidiose. Les modifications du microbiote induites par la prise de

cloxacilline, entraînent une diminution significative de ces acides gras et la multiplication du parasite. En collaboration avec le service de coprologie fonctionnelle (Pr. Nathalie Kapel, Hôpital Pitié-Salpêtrière), la mesure de la production d'AGCC sera également effectuée à partir des contenus coliques lors du traitement des souriceaux par nitazoxanide. ^(92 ; 93)

5. Conclusion

Le lien entre *Cryptosporidium* spp. et le syndrome de l'intestin irritable est encore mal compris et le mécanisme d'action de ce parasite fait l'objet de nombreuses recherches à l'heure actuelle. Les infections à *Cryptosporidium* spp. peuvent être asymptomatiques, mais peuvent également engendrer des diarrhées profuses (non sanglantes) aussi bien chez les patients immunocompétents que les patients immunodéprimés. En revanche il y a encore peu de données sur les complications à long terme de la cryptosporidiose.

Les premiers résultats ont montré une augmentation *in vitro* de la perméabilité en présence de *Cryptosporidium parvum* que ce soit en mesure discontinue ou continue sans modification de l'expression des gènes des jonctions serrées. Ainsi qu'une augmentation de la réponse inflammatoire chez les souris infectées par le parasite et ce, principalement au niveau cérébral. L'expression élevée de *c-fos* dans le système nerveux central (SNC) pourrait être l'un des mécanismes clés de l'étiologie du SII. Par conséquent, la régulation de l'activation du SNC pourrait être une cible majeure dans le traitement des patients souffrant du SII.

De nombreux résultats restent encore à obtenir (dont le microbiote et la translocation bactérienne) afin de documenter (i) une corrélation entre l'infection à *Cryptosporidium* spp. et le développement du SII-PI, (ii) de contribuer à mettre en évidence de nouveaux mécanismes physiopathologiques de ce parasite, et (iii) d'identifier des génotypes pouvant être responsables de ce type de pathologie. Les résultats obtenus permettront de développer des procédures de prévention des complications à long terme de la cryptosporidiose en médecine humaine et animale.

6. Références bibliographiques

1. Cavalier-Smith T. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *European Journal of Protistology*. 2014 Oct;50(5):472–95.
2. Ryan U, Papparini A, Monis P, Hijjawi N. It's official – *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? *Water Research*. 2016 Nov;105:305–13.
3. Mehlhorn H, editor. *Encyclopedia of Parasitology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016
4. Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Experimental Parasitology*. 2010 Jan;124(1):80–9.
5. Cacciò SM. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parasitologia*. 2005 Jun;47(2):185–92.
6. Kváč M, Kestřánová M, Pinková M, Květoňová D, Kalinová J, Wagnerová P, Kotková M, Vítovec J, Ditrich O, McEvoy J, Stenger B, Sak B. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Vet Parasitol*. 2013 Jan 31; 191(3-4):218-27. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.09.005. Epub 2012 Sep 12.
7. Slapeta J. The name *Cryptosporidium tyzzeri* Ren, Zhao, Zhang, Ning, Jian, Wang, Lv, Wang, Arrowood and Xiao, 2012 is permanently invalid. *Exp Parasitol*. 2012 Mar; 130(3):306-7. doi: 10.1016/j.exppara.2011.12.013. Epub 2012 Jan 2.
8. Bouzid M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM. *Cryptosporidium* Pathogenicity and Virulence. *Clin Microbiol Rev*. 2013 Jan;26(1):115–34.
9. Current WL, Garcia LS. Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev*. 1991 Jul;4(3):325–58.

10. Meinhardt P, Casemore DP, Miller KB. 1996. Epidemiologic aspects of human cryptosporidiosis and the role of waterborne transmission. *Epidemiol. Rev.* 18:118 – 136.
11. Petry F, Jakobi V, Tessema TS. Host immune response to *Cryptosporidium parvum* infection. *Experimental Parasitology.* 2010 Nov;126(3):304–9.
12. Pantenburg B, Dann SM, Wang H-C, Robinson P, Castellanos-Gonzalez A, Lewis DE, et al. Intestinal Immune Response to Human *Cryptosporidium* sp. *Infection. IAI.* 2008 Jan;76(1):23–9.
13. Liu J, Deng M, Lancto CA, Abrahamsen MS, Rutherford MS, Enomoto S. Biphasic Modulation of Apoptotic Pathways in *Cryptosporidium parvum*-Infected Human Intestinal Epithelial Cells. *IAI.* 2009 Feb;77(2):837–49.
14. Kirkpatrick BD, Daniels MM, Jean SS, Pape JW, Karp C, Littenberg B, et al. Cryptosporidiosis Stimulates an Inflammatory Intestinal Response in Malnourished Haitian Children. *J INFECT DIS.* 2002 Jul;186(1):94–101.
15. Certad G, Viscogliosi E, Chabé M, Cacciò SM. Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends in Parasitology.* 2017 Jul;33(7):561–76.
16. Chalmers RM, Davies AP. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology.* 2010 Jan;124(1):138–46.
17. Bonnin A, Kapel N, Favennec L, Gargala G, L'Ollivier C, Dalle F. *Cryptosporidium* spp. et cryptosporidiose. *EMC - Biologie Médicale.* 2012 Sep;7(3):1–9.
18. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *The Lancet.* 2013 Jul;382(9888):209–22.

19. Striepen B. Parasitic infections: Time to tackle cryptosporidiosis. *Nature*. 2013 Nov;503(7475):189–91.
20. Hunter PR, Hughes S, Woodhouse S, Nicholas R, Syed Q, Chalmers RM, et al. Health Sequelae of Human Cryptosporidiosis in Immunocompetent Patients. *Clinical Infectious Diseases*. 2004 Aug 15;39(4):504–10.
21. Stiff RE, Davies AP, Mason BW, Hutchings HA, Chalmers RM. Long-term health effects after resolution of acute *Cryptosporidium parvum* infection: a 1-year follow-up of outbreak-associated cases. *Journal of Medical Microbiology*. 2017 Nov 1;66(11):1607–11.
22. Marion R, Baishanbo A, Gargala G, François A, Ducrotté P, Duclos C, et al. Transient Neonatal *Cryptosporidium parvum* Infection Triggers Long-Term Jejunal Hypersensitivity to Distension in Immunocompetent Rats. *IAI*. 2006 Jul;74(7):4387–9.
23. Khaldi S, Gargala G, Le Goff L, Parey S, Francois A, Fioramonti J, et al. *Cryptosporidium parvum* Isolate-Dependent Postinfectious Jejunal Hypersensitivity and Mast Cell Accumulation in an Immunocompetent Rat Model. *IAI*. 2009 Nov;77(11):5163–9.
24. Mead JR, Arrowood MJ. Treatment of Cryptosporidiosis. In: Cacciò SM, Widmer G, editors. *Cryptosporidium: parasite and disease*. Vienna: Springer; 2014. p. 455–86.
25. Checkley W, White AC, Jaganath D, Arrowood MJ, Chalmers RM, Chen X-M, et al. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for cryptosporidium. *The Lancet Infectious Diseases*. 2015 Jan;15(1):85–94.
26. Abubakar I, Aliyu SH, Arumugam C, Usman NK, Hunter PR. Treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised individuals: systematic review and meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol*. 2007 Apr;63(4):387–93.
27. Hommer V. Effect of antiretroviral protease inhibitors alone, and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and in vitro development of

- Cryptosporidium parvum. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003 Aug 13;52(3):359–64.
28. Abubakar II, Aliyu SH, Arumugam C, Hunter PR, Usman N. Prevention and treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised patients. Cochrane HIV/AIDS Group, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*
 29. Amadi B, Mwiya M, Musuku J, Watuka A, Sianongo S, Ayoub A, et al. Effect of nitazoxanide on morbidity and mortality in Zambian children with cryptosporidiosis: a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2002 Nov;360(9343):1375–80.
 30. Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional Bowel Disorders. *Gastroenterology*. 2006 Apr;130(5):1480–91.
 31. Locke GR, Yawn BP, Wollan PC, Melton LJ, Lydick E, Talley NJ. Incidence of a clinical diagnosis of the irritable bowel syndrome in a United States population. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004 May;19(9):1025–31.
 32. Canavan C, West J, Card T. The epidemiology of irritable bowel syndrome. *Clin Epidemiol*. 2014;6:71–80.
 33. Ducrotté P, Melchior C. Nouvelles orientations physiopathologiques : Irritable bowel syndrome: pathophysiology, what is new? *Lettre de l'hépatogastro-entérologue*. 2015 May ;18(3) :102-6.
 34. Azpiroz F, Bouin M, Camilleri M, Mayer EA, Poitras P, Serra J, et al. Mechanisms of hypersensitivity in IBS and functional disorders. *Neurogastroenterol Motil*. 2007 Jan;19(s1):62–88.
 35. Dunlop SP, Jenkins D, Neal KR, Spiller RC. Relative importance of enterochromaffin cell hyperplasia, anxiety, and depression in postinfectious IBS. *Gastroenterology*. 2003 Dec;125(6):1651–9.

36. Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. Principles and clinical implications of the brain–gut–enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009 May;6(5):306–14.
37. Ducrotté P, Melchior C. Syndrome de l'intestin irritable: conception physiopathologique actuelle . *HepatoGastro*. 2013; 20 : 740-51.
38. Robles A, Perez Ingles D, Myneedu K, Deoker A, Sarosiek I, Zuckerman MJ, et al. Mast cells are increased in the small intestinal mucosa of patients with irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Neurogastroenterology & Motility*. 2019 Dec; 31(12).
39. Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, Cremon C, Cottrell GS, Santini D, et al. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2004 Mar;126(3):693–702.
40. Spiller RC. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut*. 2000 Dec 1;47(6):804–11.
41. Cremon C, Carini G, Wang B, Vasina V, Cogliandro RF, De Giorgio R, et al. Intestinal Serotonin Release, Sensory Neuron Activation, and Abdominal Pain in Irritable Bowel Syndrome: *American Journal of Gastroenterology*. 2011 Jul;106(7):1290–8.
42. Yang B, Zhou X, Lan C. Changes of cytokine levels in a mouse model of post-infectious irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterol*. 2015 Dec;15(1):43.
43. Akiho H. Low-grade inflammation plays a pivotal role in gastrointestinal dysfunction in irritable bowel syndrome. *WJGP*. 2010;1(3):97.
44. El-Salhy M, Gundersen D, Hatlebakk JG, Hausken T. Low-grade inflammation in the rectum of patients with sporadic irritable bowel syndrome. *Molecular Medicine Reports*. 2013 Apr;7(4):1081–5.

45. Kumar S, Shukla R, Ranjan P, Kumar A. Interleukin-10: A Compelling Therapeutic Target in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Clinical Therapeutics*. 2017 Mar;39(3):632–43.
46. Wang WF, Yang YS, Peng LH, Sun G. Alternation of substance P-containing neural pathways in a rat model of irritable bowel syndrome with rectal distension. *Chin Dig Dis*. 2006 Nov;7(4):211–8.
47. Posserud I, Agerforz P, Ekman R, Björnsson ES, Abrahamsson H, Simrén M. Altered visceral perceptual and neuroendocrine response in patients with irritable bowel syndrome during mental stress. *Gut*. 2004 Aug;53(8):1102–8.
48. Elsenbruch S, Holtmann G, Oezcan D, Lysson A, Janssen O, Goebel MU, et al. Are There Alterations of Neuroendocrine and Cellular Immune Responses to Nutrients in Women with Irritable Bowel Syndrome? *Am J Gastroenterol*. 2004 Apr;99(4):703–10.
49. Gourcerol G. Stress et syndrome de l'intestin irritable. 2015. Lettre de l'hépatogastroentérologue. 2015 May ;18(3) :119-20.
50. Zhang R, Zou N, Li J, Lv H, Wei J, Fang X-C, et al. Elevated expression of c-fos in central nervous system correlates with visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome (IBS): a new target for IBS treatment. *Int J Colorectal Dis*. 2011 Aug;26(8):1035–44.
51. Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L, Hooper LV. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008 Dec 30;105(52):20858–63.
52. Zahraoui A. Les junctions serrées : Plate-forme de régulation de la prolifération et de la polarité cellulaires. *Med Sci (Paris)*. 2004 May;20(5):580–5.

53. Zouiten-Mekki L, Serghini M, Fekih M, Kallel L, Matri S, Ben Mustapha N, et al. Rôle de la cellule épithéliale dans l'homéostasie intestinale et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Med Sci (Paris)*. 2013 Dec;29(12):1145–50.
54. Salim SY, Söderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases: *Inflammatory Bowel Diseases*. 2011 Jan;17(1):362–81.
55. Dunlop SP, Hebden J, Campbell E, Naesdal J, Olbe L, Perkins AC, et al. Abnormal Intestinal Permeability in Subgroups of Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndromes. *Am J Gastroenterol*. 2006 Jun;101(6):1288–94.
56. Zhou Q, Zhang B, Verne NG. Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable bowel syndrome: *Pain*. 2009 Nov;146(1):41–6.
57. Collège des universitaires en hépato-gastro-entérologie ed. *Les fondamentaux de la pathologie digestive : enseignement intégré, appareil digestif*. Elsevier Masson; 2014.
58. Eckburg PB. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*. 2005 Jun 10;308(5728):1635–8.
59. Hugenholtz F, de Vos WM. Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. *Cell Mol Life Sci*. 2018 Jan;75(1):149–60.
60. Jeffery IB, O'Toole PW, Öhman L, Claesson MJ, Deane J, Quigley EMM, et al. An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut*. 2012 Jul;61(7):997–1006.
61. Ducrotté P. *Physiopathologie et traitement des troubles fonctionnels intestinaux*. EMC - Gastro-entérologie. 2006 Jan;1(1):1–9.
62. Spiller R, Garsed K. Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2009 May;136(6):1979–88.

63. Program of the 7th International Giardia and Cryptosporidium Conference. <https://en.rouentourisme.com/wp-content/uploads//2019/06/Programme-définitif-modifié-200619.pdf> and <https://hal-normandie-univ.archives-ouvertes.fr/hal-02495405>.
64. Upton SJ, Tilley M, Brillhart DB. Comparative development of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa) in 11 continuous host cell lines. FEMS Microbiology Letters. 1994 May;118(3):233–6.
65. Hasan S, Kulkarni NN, Asbjarnarson A, Linhartova I, Osicka R, Sebo P, et al. *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin Disrupts Functional Integrity of Bronchial Epithelial Layers. Bäumler AJ, editor. Infect Immun. 2017 Dec 4;86(3):e00445-17, /iai/86/3/e00445-17.atom.
66. Yeo N-K, Jang YJ. Rhinovirus infection-induced alteration of tight junction and adherens junction components in human nasal epithelial cells: TJs and AJs in Nasal Epithelial Cells. The Laryngoscope. 2010 Feb;120(2):346–52.
67. Smith J, Wood E, Dornish M. Effect of Chitosan on Epithelial Cell Tight Junctions. Pharm Res. 2004 Jan;21(1):43–9.
68. Bertiaux-Vandaële N, Youmba SB, Belmonte L, Lecleire S, Antonietti M, Gourcerol G, et al. The Expression and the Cellular Distribution of the Tight Junction Proteins Are Altered in Irritable Bowel Syndrome Patients With Differences According to the Disease Subtype: American Journal of Gastroenterology. 2011 Dec;106(12):2165–73.
69. Moriarty EM, Duffy G, McEvoy JM, Caccio S, Sheridan JJ, et al. The effect of thermal treatments on the viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* on beef surfaces. J Appl Microbiol. 2005;98:618–623.
70. Hashim A, Mulcahy G, Bourke B, Clyne M. Interaction of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* with primary human and bovine intestinal cells. Infect Immun. 2006;74:99–107.

71. Winter G, Gooley AA, Williams KL, Slade MB. Characterization of a major sporozoite surface glycoprotein of *Cryptosporidium parvum*. *Funct Integr Genomics*. 2000;1:207–217.
72. Delaunay A, Gargala G, Li X, Favennec L, Ballet JJ. Quantitative Flow Cytometric Evaluation of Maximal *Cryptosporidium parvum* Oocyst Infectivity in a Neonate Mouse Model. *Appl Environ Microbiol*. 2000 Oct 1;66(10):4315–7.
73. Hadfield SJ, Robinson G, Elwin K, Chalmers RM. Detection and Differentiation of *Cryptosporidium* spp. in Human Clinical Samples by Use of Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011 Mar 1;49(3):918–24.
74. Halliez MCM, Motta J-P, Feener TD, Guérin G, LeGoff L, François A, et al. *Giardia duodenalis* induces paracellular bacterial translocation and causes postinfectious visceral hypersensitivity. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2016 Apr 15;310(8):G574–85.
75. Baker, G. C., Smith, J. J. & Cowan, D. A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* 55, 541-555 (2003).
76. Banos S, Lentendu G, Kopf A, Wubet T, Glöckner FO, Reich M. A comprehensive fungi-specific 18S rRNA gene sequence primer toolkit suited for diverse research issues and sequencing platforms. *BMC Microbiol*. 2018 Dec;18(1):190.
77. Mach N, Foury A, Kittelmann S, Reigner F, Moroldo M, Ballester M, et al. The Effects of Weaning Methods on Gut Microbiota Composition and Horse Physiology. *Front Physiol*. 2017 Jul 25;8:535.
78. McCole DF, Eckmann L, Laurent F, Kagnoff MF. Intestinal Epithelial Cell Apoptosis following *Cryptosporidium parvum* Infection. Mansfield JM, editor. *Infect Immun*. 2000 Mar 1;68(3):1710–3.
79. Kim JM, Eckmann L, Savidge TC, Lowe DC, Withöft T, Kagnoff MF. Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial invasion. *J Clin Invest*. 1998 Nov 15;102(10):1815–23.

80. Sablet T, Potiron L, Marquis M, Bussière FI, Lacroix-Lamandé S, Laurent F. *Cryptosporidium parvum* increases intestinal permeability through interaction with epithelial cells and IL-1 β and TNF α released by inflammatory monocytes: *C. parvum* and intestinal permeability. *Cellular Microbiology*. 2016 Dec;18(12):1871–80.
81. Bonazzi M, Cossart P. Impenetrable barriers or entry portals? The role of cell–cell adhesion during infection. *Journal of Cell Biology*. 2011 Oct 31;195(3):349–58.
82. Kumar A, Chatterjee I, Anbazhagan AN, Jayawardena D, Priyamvada S, Alrefai WA, et al. *Cryptosporidium parvum* disrupts intestinal epithelial barrier function via altering expression of key tight junction and adherens junction proteins. *Cellular Microbiology*. 2018 Jun;20(6):e12830.
83. Okhuysen PC, Chappell CL. *Cryptosporidium* virulence determinants – are we there yet? *International Journal for Parasitology*. 2002 May;32(5):517–25.
84. Hanevik K, Dizdar V, Langeland N, Hausken T. Development of functional gastrointestinal disorders after *Giardia lamblia* infection. *BMC Gastroenterol*. 2009 Dec;9(1):27.
85. Ras R, Huynh K, Desoky E, Badawy A, Widmer G. Perturbation of the intestinal microbiota of mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *International Journal for Parasitology*. 2015 Jul;45(8):567–73.
86. Mammeri M, Chevillot A, Thomas M, Julien C, Auclair E, Pollet T, et al. *Cryptosporidium parvum*-Infected Neonatal Mice Show Gut Microbiota Remodelling Using High-Throughput Sequencing Analysis: Preliminary Results. *Acta Parasit*. 2019 Jun;64(2):268–75.
87. Zhao H, Jiang X, Chu W. Shifts in the gut microbiota of mice in response to dexamethasone administration. *Int Microbiol*. 2020 May.
88. Rajilić–Stojanović M, Biagi E, Heilig HGJ, Kajander K, Kekkonen RA, Tims S, et al. Global and Deep Molecular Analysis of Microbiota Signatures in Fecal Samples From

- Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*. 2011 Nov;141(5):1792–801.
89. Kassinen A, Krogius-Kurikka L, Mäkivuokko H, Rinttilä T, Paulin L, Corander J, et al. The Fecal Microbiota of Irritable Bowel Syndrome Patients Differs Significantly From That of Healthy Subjects. *Gastroenterology*. 2007 Jul;133(1):24–33.
90. Chong PP, Chin VK, Looi CY, Wong WF, Madhavan P, Yong VC. The Microbiome and Irritable Bowel Syndrome – A Review on the Pathophysiology, Current Research and Future Therapy. *Front Microbiol*. 2019 Jun 10;10:1136.
91. Okhuysen PC, Chappell CL, Crabb JH, Sterling CR, DuPont HL. Virulence of Three Distinct *Cryptosporidium parvum* Isolates for Healthy Adults. *J INFECT DIS*. 1999 Oct;180(4):1275–81.
92. Charania R, Wade BE, McNair NN, Mead JR. Changes in the Microbiome of *Cryptosporidium*-Infected Mice Correlate to Differences in Susceptibility and Infection Levels. *Microorganisms*. 2020 Jun 10;8(6):879.
93. Bartelt LA, Bolick DT, Kolling GL, Stebbins E, Huston CD, Guerrant RL, et al. Amoxicillin Reduces Severity of Cryptosporidiosis but Does Not Have *In Vitro* Activity against *Cryptosporidium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Oct 8;62(12):e00718-18, /aac/62/12/e00718-18.atom.

Annexes

Annexe 1 : Protocole kit dosage facteur de transcription C-fos par colorimétrie (ELISA)

Préparation des réactifs :

-Dithiothreitol (DTT), Protéase inhibitor cocktail (PIC), Poly d(I-C) prêt à l'emploi

-Tampon de lyse : préparation du tampon de lyse complet (CLB), ne se conserve pas
préparer la portion nécessaire, une fois ouvert le tampon de lyse peut se garder à +4°C

Réactif préparé	Composants	1 échantillon	8 échantillons	48 échantillons	96 échantillons
CLB	DTT	0,02 µL	0,2 µL	1,2 µL	2,4 µL
	PIC	0,23 µL	1,8 µL	10,8 µL	21,6 µL
	Tampon de lyse	22,25 µL	178,0 µL	1,068 mL	2,136 mL
	total	22,5 µL	180,0 µL	1,08 mL	2,16 mL

-Tampon de liaison : préparation complète du tampon de liaison (CBB), ne se conserve pas mélanger

Réactif préparé	Composants	1 échantillon	8 échantillons	48 échantillons	96 échantillons
CBB	DTT	0,03 µL	0,3 µL	1,8 µL	3,6 µL
	Poly d(I-C)	0,34 µL	2,7 µL	16,2 µL	32,4 µL
	Tampon de liaison	33,40 µL	267 µL	1,602 mL	3,2 mL
	total	33,8 µL	270 µL	1,62 mL	3,24 mL

-Tampon de lavage : préparation 1x en faisant une dilution 1/10 avec de l'eau distillée agiter doucement car risque de mousse (le tampon dilué peut se garder à 4°C pendant une semaine) la forme non diluée peut former des amas si c'est le cas vortexer pendant 2 min avant utilisation

Réactif préparé	Composants	1 échantillon	8 échantillons	48 échantillons	96 échantillons
1x tampon de lavage	ddH ₂ O	2,025 mL	16,2 mL	97,2 mL	194,4 mL
	10x Tampon de lavage	225 µL	1,8 mL	10,8 mL	21,6 mL
	Total	2,25 µL	18 mL	108 mL	216 mL

-Tampon de liaison anticorps (ABB) : préparation 1x en faisant une dilution 1/10 avec de l'eau distillée, mélanger doucement pour éviter de mousser. Doit être utilisé le jour même, si formation d'amas mettre le buffer à la chaleur et vortexer pendant une minute avant utilisation

Réactif préparé	Composants	1 échantillon	8 échantillons	48 échantillons	96 échantillons
1x ABB	ddH ₂ O	202,5 µL	1,62 mL	9,72 mL	19,44 mL
	10x Tampon de lavage	22,5 µL	180 µL	1,08 mL	2,16 mL
	Total	225 µL	1,8 mL	10,8 mL	21,6 mL

-Anticorps C-fos : à diluer au 1/1000 dans le 1x ABB, éviter de multiplier les congélations décongélations.

Réactif préparé	Composants	1 échantillon	8 échantillons	48 échantillons	96 échantillons
AB dilution 1/1000	C-FOS Ab	0,11 µL	0,9 µL	5,4 µL	10,8 µL
	1x ABB	110 µL	900 µL	5,4 mL	10,8 mL
	Total	110,11 µL	900,9 µL	5,4 mL	10,8 mL

-Anticorps anti-rabbit HRP-conjugués : A diluer au 1/1000 dans 1x ABB

Réactif préparé	Composants	1 échantillon	8 échantillons	48 échantillons	96 échantillons
AB dilution 1/1000 (2)	HRP-conj Ab	0,11 µL	0,9 µL	5,4 µL	10,8 µL
	1x ABB	110 µL	900 µL	5,4 mL	10,8 mL
	Total	110,11 µL	900,9 µL	5,4 mL	10,8 mL

-Solution de développement (DS) : prêt à l'emploi, doit être sorti 1h avant son utilisation à température ambiante. Solution ouverte non utilisée dans le noir à 4°C. la solution de développement peut développer une teinte jaune au fil du temps, mais cela n'affecte pas les performances de production. Une couleur bleue présente dans la solution de développement indique qu'elle a été contaminée et doit être jetée

Réactif préparé	Composants	1 échantillon	8 échantillons	48 échantillons	96 échantillons
DS	total	112,5 µL	900 µL	5,4 mL	10,8 mL

-Solution d'arrêt : prêt à l'emploi (attention solution corrosive port de gant, lunette et blouse obligatoire)

Réactif préparé	Composants	1 échantillon	8 échantillons	48 échantillons	96 échantillons
Solution d'arrêt	total	112,5 µL	900 µL	5,4 mL	10,8 mL

-K-562 Nuclear extract : prêt à l'emploi, 5 µL par échantillon et à garder au -80°C

-contrôle oligonucleotides :

Réactif préparé	Composants	1 échantillon	8 échantillons	48 échantillons	96 échantillons
Oligo dans CBB	Wt ou mutant	2 µL	16 µL	96 µL	N/A
	CBB	31,8 µL	254 µL	1,524 mL	N/A
	Total	33,8 µL	270 µL	1,62 mL	N/A

Préparation des échantillons :

Utilisation du kit d'extraction ab113474

Procédure:

- Préparer les réactifs, il est recommandé de passer tous les échantillons en duplicata

1. AP-1 c-Fos : liaison à la séquence consensus

- Ajouter 30 µL CBB contenant wt or mutated oligo pour les puits de contrôle de la liaison compétitive.
- Ajouter 30 µL CBB pour les autres puits
- Préparation des échantillons et des puits contrôle :
 - puits contrôle liaison compétitive : 20 µL d'échantillon dilué dans CLB
 - puits d'échantillons : 20 µL d'échantillon dilué dans CLB
 - puits contrôle positif : 2 µL qkq-562 nuclear extract + 18 µL CLB
 - puit blanc : 20 µL CLB uniquement
- Utiliser l'adhésif pour couvrir la plaque. Incuber 1h à température ambiante avec agitation (100 rpm)
- Laver chaque puit 3 fois avec 200 µL 1x tampon de lavage. Pour chaque lavage, égoutter la plaque au-dessus d'un évier pour vider les puits, puis appuyez trois fois la plaque inversée sur du papier absorbant

2. Liaison du premier anticorps

- Ajouter 100 µL d'anticorps dilués (1/1000 dilution dans 1xABB) dans tous les puits utilisés
- Couvrir la plaque et incuber 1h à température ambiante avec agitation (100 rpm)
- Laver chaque puits 3 fois avec 200 µL 1x tampon de lavage. Pour chaque lavage, égoutter la plaque au-dessus d'un évier pour vider les puits, puis appuyez trois fois la plaque inversée sur du papier absorbant

3. Liaison du second anticorps

- Ajouter 100 µL de l'anti rabbit HRP-antibody dilué (1/1000 dans 1xABB) dans chaque puits utilisé
- Couvrir la plaque et incuber 1h à température ambiante avec agitation (100 rpm)
- Pendant l'agitation placer la solution de développement à température ambiante

- Laver chaque puits 4 fois avec 200 μ L 1x tampon de lavage. Pour chaque lavage, égoutter la plaque au-dessus d'un évier pour vider les puits, puis appuyez trois fois la plaque inversée sur du papier absorbant

4. Mesure

- Ajouter 100 μ L de la solution de développement (TA) dans chaque puits utilisé

- Incuber 2-10 min à température ambiante, protéger de la lumière directe. Le temps d'incubation optimal variera pour chaque expérience en fonction de la quantité de facteur de transcription présent dans l'échantillon. Surveiller le développement de la couleur bleue dans les puits d'échantillon jusqu'à virer au bleu moyen. Ne pas trop développer. Il peut être nécessaire de surdévelopper les puits témoins positifs pour permettre un développement adéquat de la couleur dans les puits échantillons

- Ajouter 100 μ L de solution stop dans les puits qui ont été utilisés, la solution dans les puits passera du bleu au jaune après l'ajout de la solution d'arrêt (présence d'une solution acide dans la solution stop)

- Lire l'absorbance sur un spectrophotomètre à DO 450 nm dans les 5 minutes, avec une longueur d'onde de référence de DO 665 nm.

Annexe 2 : Protocole Q : Extraction d'ADN des échantillons fécaux (technique IHMS)

1. Ajouter 0.25 g d'échantillon dans le tube contenant les billes
2. Ajouter 750 µL de la solution « PowerBead » dans le tube
3. Ajouter 60 µL de la solution C1, agiter par retournement et vortexer
4. Chauffer le tube à 65 °C pendant 10 min
5. Sécuriser les tubes à l'horizontal sur l'adaptateur du vortex et vortexer à vitesse maximum pendant 10 min
6. Refroidir l'échantillon dans la glace pendant 2 min
7. Centrifuger l'échantillon à 16000 g, 4°C pendant 5 min
8. Transférer le surnageant dans un tube de 2 mL
9. Reprendre le culot et refaire les étapes 2 à 7
10. Le surnageant obtenu est poolé avec le premier
11. Ajouter 260 µL d'acétate d'ammonium 10 M dans chaque échantillon, bien vortexer et incuber dans la glace pendant 5 min
12. Centrifuger à 16000 g, 4°C pendant 10 min
13. Transférer le surnageant dans deux tubes Eppendorf de 1.5 mL, ajouter un volume équivalent d'isopropanol, bien vortexer et incuber dans la glace pendant 30 min
14. Centrifuger à 16000 g, 4°C, 15min, retirer le surnageant, laver le culot avec 0.5 mL d'éthanol 70 %
15. Centrifuger à 16000 g, 4°C pendant 5 min et assécher le culot
16. Dissoudre le culot d'acide nucléique dans 100 µL de Tris-EDTA et pooler les 2 aliquots
17. Ajouter 2 µL de « DNase-free RNase » (10mg/mL) et incuber à 37°C, 15 min
18. Ajouter 15 µL de protéinase K et 200 µL de buffer AL, vortexer pendant 15 s et incuber à 70°C pendant 10 min
19. Ajouter 200 µL d'éthanol (96-100%) et vortexer
20. Transférer sur les colonnes QIAamp et centrifuger à 16000 g pendant 1 min à température ambiante
21. Jeter le liquide ayant traversé la colonne, ajouter 500 µL du tampon AW1 (Qiagen) et centrifuger à 16000 g pendant 1 min
22. Jeter le liquide ayant traversé la colonne, ajouter 500 µL du tampon AW2 (Qiagen) et centrifuger à 16000 g pendant 1 min
23. Assécher la colonne en centrifugeant à température ambiante pendant 1 min à 16000 g
24. Ajouter 200 µL de tampon AE (Qiagen), incuber pendant 1 min à température ambiante
25. Centrifuger 1 min à 16000 g pour récupérer l'ADN

Serment de Galien

SERMENT DE GALIEN

Je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



DEHAIS Marion

Contribution à l'étude des mécanismes physiopathologiques de type syndrome de l'intestin irritable au cours de l'infection par *Cryptosporidium parvum*.

Th. D. Pharm., Rouen, 2020, 90 p.

RESUME

Le syndrome de l'intestin irritable (SII) demeure un trouble ambigu de la fonction gastro-intestinale. L'infection par *Cryptosporidium* spp. a été évaluée comme une étiologie possible d'une hypersensibilité viscérale, symptômes proches de ceux du SII. Plusieurs hypothèses ont été postulées et annoncées quant à sa physiopathologie sous-jacente. L'objectif de cette étude était de documenter, à l'aide de modèles cellulaire et animal, l'impact de l'infection par *Cryptosporidium parvum* sur les paramètres impliqués dans le développement du trouble fonctionnel de l'intestin post-infectieux.

(i) *In vitro*, l'inoculation de *Cryptosporidium parvum* sur une monocouche de cellules HCT-8 induit une altération de la barrière épithéliale se traduisant par une augmentation significative de la perméabilité intestinale à 24h post-inoculation. Aucune modification de l'expression des gènes codant pour les protéines des jonctions serrées (Claudine-4, Occludine, Zonula occludens-1) n'a été observée.

(ii) Dans le modèle murin de cryptosporidiose expérimentale, aucune différence d'expression des gènes des protéines des jonctions serrées n'a été constatée entre les animaux infectés et non infectés. Au niveau inflammatoire, l'expression des gènes du *c-fos* et de la *tyrosine hydroxylase* sont significativement plus élevées au niveau cérébral qu'intestinal. L'expression élevée de *c-fos* dans le système nerveux central (SNC) pourrait être l'un des mécanismes clés de l'étiologie du SII. Par conséquent, la régulation de l'activation du SNC pourrait être une cible majeure dans le traitement des patients souffrant du SII.

D'autres paramètres sont en cours d'analyses (microbiotes et études des jonctions d'ancrage), et seront associés aux données obtenues au cours de cette étude afin d'obtenir une description globale de l'impact au niveau local et périphérique de l'infection par *Cryptosporidium* spp.

MOTS CLES : *Cryptosporidium*, syndrome de l'intestin irritable, perméabilité, inflammation, microbiote

JURY

Président et directeur :

Mr FAVENNEC Loïc, PU-PH

Co-directeur :

Mr RAZAKANDRAINIBE Romy, MCU

Membres :

Mr SAVOYE Guillaume, PU-PH

Mr GARGALA Gilles, MCU-PH

Mr COSTA Damien, AHU

DATE DE SOUTENANCE : 9 Octobre 2020