

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة الجزائر



ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE – ALGER

THESE

En vue de l'obtention

Du diplôme de Doctorat *es-Sciences*

**Caractérisation phénotypique et génotypique de  
*Cryptosporidium* chez les ruminants  
et stratégies thérapeutiques**

Présentée par : Mme SAHRAOUI Lynda

Date 27/01/2020

Devant le Jury :

Présidente :	AISSI Mériem	Professeur	ENSV
Directrice de thèse :	AINBAZIZ Hacina	Professeur	ENSV
Co-Directeur de thèse :	ADJOU Karim	Professeur	ENV d'ALFORT
Examinatrice :	BENMAHDI Mériem H	Professeur	ESSAIA
Examineur :	HAKAM Ahcène	Professeur	ISV Djelfa
Examineur :	LAATAMNA Hakim	MCAA	ISV Djelfa
Examineur :	BAROUDI Djamel	MCAA	ENSV

Année 2019/2020

**REMERCIEMENTS**

Je remercie en premier lieu Allah le clément et le miséricordieux qui, par sa grâce, a permis la réalisation de ce modeste travail.

Je voudrais remercier chaleureusement tous ceux qui d'une manière ou d'une autre ont participé à ce travail.

**Aux membres du jury :**

**Au président du jury,  
Professeur AissiMérim,**

Je vous remercie de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de notre thèse.

**Aux examinateurs,  
Professeurs Benmahdi Mérim H,  
Professeur Hakam AHcène,  
Dr Laatamna Hakim,  
Dr Baroudi Djamel**

Je vous remercie tous d'avoir accepté de consacrer un peu de votre temps si précieux pour rapporter et juger notre travail. Soyez assurés de notre profonde reconnaissance.

**A notre cher co-directeur de thèse,  
Professeur Adjou Karim**

Sans vous, cette aventure n'aurait jamais pu commencer ni même être imaginée. Je vous en serais éternellement reconnaissante pour la réalisation de ce travail, pour vos précieux conseils, vos encouragements et votre soutien non seulement en tant responsable scientifique mais aussi comme ami.

**A notre chère directrice de thèse,  
Professeur Ain Baziz Hacina**

L'un de mes plus grands regrets durant cette thèse est de n'avoir pas su profiter, plus que je ne l'ai fait, de la chance qu'il m'a été donnée d'être encadrée par le scientifique et l'être exceptionnel que vous êtes. Je vous suis très reconnaissante de m'avoir guidée et soutenue toujours avec simplicité et générosité.

**Au laboratoire d'accueil :**

Je tiens à remercier **Professeur Nadia Haddad** de m'avoir accueillie dans son laboratoire BIPAR mais également pour son soutien.

Je tiens à remercier vivement tous les membres de l'équipe **PARALIM** qui m'ont accueilli parmi eux :

**Isabelle Vallet** pour son énergie et l'enthousiasme avec lesquels elle a contribué chaque jour à l'avancement de notre projet,

**Bruno polack** pour ses conseils scientifiques et sa grande contribution dans notre travail,

**Pr Karim Adjou** pour son encadrement et ses précieux conseils scientifiques.

## **REMERCIEMENTS**

---

**Phd Mohamed Mammeri** pour l'aide qu'il m'a apporté, en particulier au début de mon travail quand il a fallu me familiariser avec la vie du laboratoire. Plus qu'un ami il a été un véritable frère pour moi. Il n'a eu de cesse de me soutenir et de m'encourager y compris dans les moments les plus critiques durant ce travail. Je te suis profondément reconnaissante pour tout ce que tu as fait et, continue de faire pour moi. Tu brilles par tes connaissances et ta personnalité exceptionnelle.

**Ingénieure Myriam Thomas** pour son amitié, son aide ainsi que pour tout ce qu'elle m'a permis d'apprendre en biologie moléculaire.

**Aurélié Chevillot** notre brillante technicienne pour son aide, sa passion, sa disponibilité et sa gentillesse une personne indispensable à notre groupe aussi bien scientifiquement qu'humainement. Tu es toujours disponible, de bon conseil et ta rigueur nous fait avancer plus sereinement dans tous nos projets.

**Dany et Mado** Merci pour votre soutien moral, votre disponibilité et votre gentillesse.

### **A l'animalerie**

Je remercie aussi **Océane et Alainde** leur précieux travail quant à la rigueur et le savoir-faire avec les animaux de laboratoire.

### **Aux vétérinaires**

Je remercie tous les vétérinaires, **Djaffer A, Boulehya S, Saidi S, Bestal A, Imad I, Karim A**, qui ont contribué à ce travail dans différentes régions étudiées en Algérie.

### **A l'assistant ingénieur du laboratoire de parasitologie de l'ENSV,**

**A SAADI Ahmed** merci pour l'aide que tu nous as apporté au début de ce travail.

### **Aux collègues enseignants,**

Un grand merci pour l'ensemble des collègues qui m'ont soutenu et encourager afin d'arriver au terme de ce travail.

Enfin, je tiens à remercier mon **époux D. Rahim** qui m'a toujours encouragé et aidé pour pouvoir accomplir au mieux ce travail de thèse. Aussi, je remercie vivement mes chères enfants **Nihad et Salem** qui ont pu supporter mon absence durant l'accomplissement de mes formations.



## Résumé

*Cryptosporidium* est un parasite protiste intracellulaire mais extra-cytoplasmique obligatoire qui infecte un large éventail d'hôtes vertébrés et cause une maladie intestinale importante chez les animaux et chez l'homme. Le but de cette étude était de détecter et de caractériser *Cryptosporidium spp.* dans des échantillons fécaux de veaux et d'agneaux naturellement infectés en Algérie. Un total de 65 et 83 échantillons fécaux de veaux et d'agneaux (âgés de moins de 3 mois) a été recueilli dans 12 et 14 fermes d'élevages de vaches laitières et de bergeries respectivement, dans quatre régions réparties sur huit wilayas. La présence de *Cryptosporidium* a été établie par une méthode d'immunofluorescence (IF). Des échantillons positifs ont ensuite été analysés par PCR-ARNr 18S et PCR-RFLP afin de déterminer les espèces présentes. Les échantillons positifs pour *Cryptosporidium parvum* ont été sous-typés via un séquençage des produits d'amplification du gène gp60. L'étude microscopique à l'immunofluorescence a révélé la présence d'oocystes de *Cryptosporidium* dans 40/65 (62%) et 36/83 (43%) respectivement chez les veaux et les agneaux. Les résultats de l'analyse PCR-gp60 ont montré la présence de *C. parvum*, *C. bovis* et *C. ubiquitum*. L'étape du sous-typage des isolats de *C. parvum* a révélé deux familles du génotype, IIa et IIc. Quatre sous-types ont été reconnus dans la famille IIa (IIaA15G2R1, IIaA13G2R1, IIaA16G2R1 et IIaA21G2R1). Un sous-type majoritaire a été reconnu dans la famille IIc, le sous-type IIcA16G1. Ces résultats illustrent la forte présence de *Cryptosporidium* chez les ruminants et augmentent la diversité des isolats de *C. parvum* avec la première description des sous-types IIaA15G2R1 et IIcA16G1 en Algérie. La présence de familles de sous-types zoonotiques de *C. parvum* (IIa, IIc) dans cette étude suggère que les ruminants constituent probablement un important réservoir de *C. parvum* zoonotique. Il n'existe actuellement aucun traitement disponible totalement efficace contre la cryptosporidiose chez l'homme ou chez l'animal. Par conséquent, il existe un besoin critique pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Afin de montrer l'activité "anticryptosporidienne" de deux polysaccharides naturels : chitosans ainsi que de la Paromomycine, nous avons étudié les effets de ces molécules sur *C. parvum* d'isolats bovin et ovin dans deux modèles *in vitro* (lignées HCT-8 et Caco-2) et *in vivo* (souris CD-1 nouveau-nés). Les tapis cellulaires ainsi que les souris ont été inoculés avec des oocystes de *C. parvum* (isolats naturels), traités avec les molécules à tester et comparés à des témoins. La paromomycine, un médicament classique utilisé en médecine vétérinaire, a été utilisée comme composé de référence. Un test d'infectiosité des isolats a été effectué avant l'évaluation de ces molécules. Nos résultats ont montré l'apparition considérable de formes intracellulaires des parasites et des réductions significatives de ces formes intracellulaires des oocystes de *Cryptosporidium*. En outre, la paromomycine, et les chitosans inhibent de manière significative la multiplication du parasite dans les cellules HCT-8 et Caco-2 ( $P < 0,05$ ). Dans les études *in vivo*, le traitement avec chitosans ou du sulfate de paromomycine a considérablement réduit l'excrétion parasitaire chez les souris nouveau-nées infectées. En conclusion, ces résultats constituent la première preuve *in vitro* et *in vivo* des activités anticryptosporidiennes de ces polysaccharides naturels sur des isolats de terrain de *Cryptosporidium*.

**Mots clés :** *Cryptosporidium spp.*, Ruminants, PCR, culture cellulaire, souris CD-1, infectiosité, zoonose, chitosans, paromomycine, Algérie.

## Summary

*Cryptosporidium* is an obligate intracellular but extra-cytoplasmic parasite that infects a wide range of vertebrate hosts and causes significant intestinal disease in animals and humans. The aim of this study was to detect and characterize *Cryptosporidium* spp. in faecal samples from naturally infected calves and lambs in Algeria. A total of 65 and 83 faecal samples from calves and lambs (less than 3 months old) were collected from 12 and 14 dairy cow and sheepfold farms respectively, in four regions across eight wilayas. The presence of *Cryptosporidium* has been established by an immunofluorescence method (IF). Positive samples were then analyzed by PCR-18S rRNA and PCR-RFLP to determine the species present. The positive samples for *Cryptosporidium parvum* were subtyped via sequencing of the amplification products of the gp60 gene. The immunofluorescence microscopic study revealed the presence of *Cryptosporidium* oocysts in 40/65 (62%) and 36/83 (43%) in calves and lambs, respectively. The results of the PCR-gp60 analysis showed the presence of *C. parvum*, *C. bovis* and *C. ubiquitum*. The subtyping step for *C. parvum* isolates revealed two families of the genotype, IIa and IIc. Four subtypes have been recognized in the IIa family (IIaA15G2R1, IIaA13G2R1, IIaA16G2R1 and IIaA21G2R1). A majority subtype has been recognized in the IIc family, the IIcA16G1 subtype. These results illustrate the strong presence of *Cryptosporidium* in ruminants and increase the diversity of isolates of *C. parvum* with the first description of the subtypes IIaA15G2R1 and IIcA16G1 in Algeria. The presence of families of zoonotic subtypes of *C. parvum* (IIa, IIc) in this study suggests that ruminants probably constitute an important reservoir of zoonotic *C. parvum*. There is currently no treatment available that is completely effective against cryptosporidiosis in humans or animals. Therefore, there is a critical need for the development of new therapeutic agents. To study the "anti-cryptosporidian" activity of two chitosans; Chitosan NAG, chitosan Mix and Paromomycin. We studied the effects of these molecules on *C. parvum* of bovine and ovine isolates in two *in vitro* models (HCT-8 and Caco-2 lines) and *in vivo*, newborn CD-1 mice were inoculated by the oral with *C. parvum* oocysts (natural isolates), treated with the test molecules and compared with untreated infected animals. Paromomycin, a classic drug used in veterinary medicine, was used as the reference compound. An infectivity test of the isolates was carried out before the evaluation of these molecules. Our results showed the considerable appearance of intracellular forms of parasites and significant reductions of these intracellular forms of *Cryptosporidium* oocysts. In addition, paromomycin, chitosan mix and chitosan NAG significantly inhibit the multiplication of the parasite in HCT-8 and Caco-2 cells ( $P < 0.05$ ). In *in vivo* studies, treatment with (Chitosans) or paromomycin sulfate significantly reduced parasitic shedding in treated infected newborn mice. In conclusion, these results constitute the first *in vitro* and *in vivo* evidence of the anticryptosporidial activities of these natural polysaccharides on *Cryptosporidium* field isolates.

**Key words:** *Cryptosporidium* spp. Ruminants, PCR, cell culture, CD-1 mice, infectivity, zoonosis, chitosans, paromomycin, Algeria.

الكريبتوسبور يديوم هو طفيل حمائي أو إقداخل خللا يايص بمجموعته واسعة من مضيفات الفقار ياتو بسبب أمراض معدوية كبيرة في الحيوانات البشر. في عينات البراز من العجول المصابة طبيعياً في الجزائر. *Cryptosporidium* spp. كان الهدف من هذه الدراسة هو اكتشاف توصيف تمجعمها مجموعته 65 و 83 عينة من البراز من العجول الحملان (أقل من 3 أشهر) من 12 و 14 (IFA). مزرعة للأبقار والأغنام على التوالي، في أربعمناطق في شمالية تونسية. تم تأسيس وجود الكريبتوسبور يديوم من خلال طريقة المناعي لتحديد الأنواع الموجودة. PCR-RFLP و rRNA و PCR-18S تمت تحليل العينات الإيجابية بواسطة *Cryptosporidium parvum* gp60. من خلال تسلسل منتجات التضخيم لمجين *Cryptosporidium parvum* تمت تقيح العينات الإيجابية للعينات كشفت الدراسة المجهرية المناعية عن وجود بويضات الكريبتوسبور يديوم في 65/40 (62 %) و 83/36 (43 %) *C. ubiquitum* و *C. parvum* و *C. bovis* وجود PCR-gp60 في العجول الحملان، على التوالي. أظهرت نتائج تحليل و *Ila* (IlaA15G2R1) و *Ild* و *Ila* عن أن التينما التريكيالوراث *C. parvum* كشفت الخطوة الفرعية لعزل *IldA16G1*، النوع الفرعي *Ild* التمتع فعلة غالبية الأنواع الفرعية في عائلة (*IlaA21G2R1* و *IlaA16G2R1* و *IlaA13G2R1* مع الوصف الأول للنوع الفرعي *C. parvum* توضيح هذه النتائج التواجد القوي للكريبتوسبور يديوم في المجترات و زيادة تنوع عزلات *C. parvum* (Ila، Ild) في الجزائر. يشير وجود عائلتين من الأنواع الفرعية حيوانية المنشأ من *IldA16G1* و *IlaA15G2R1* *parvum* في هذه الدراسة إلى أن المجترات ربما تشكل جزءاً مهماً من حيوانية المنشأ. لا يوجد حالياً علاج متوفر فعال تماماً ضد الكريبتوسبور يديوم في البشر أو الحيوانات. لذلك، هناك حاجة ماسة لتطوير عوامل علاجية جديدة. الشيتوزان أميكسولبار وموميسين. NAG لاثنين من الشيتوزان؛ الشيتوزان "antirypptosporidian" من أجل دراسة نشاط (Caco-2 و HCT-8) لعزل الأبقار والأغنام في اثنين من نماذج المختبر (خطوط *C. parvum* العزلات الطبيعية) (*C. parvum* oocysts) حديثي الولادة بواسطة عن طريق الفم مع CD-1 وفي الجسم الحي، تمت تقيح الفئران، تعامل مع عزلات الاختبار ومقارنة مع الحيوانات المصابة غير المعالجة. يستخدم البار وموميسين، وهودوا كلاسيكي يستخدم في الطب البيطري، كمر كبرمجي. تم إجراء اختبار للعدوى من العزلات لتقييم هذه العزلات. أظهرت نتائج المظهر الكبير للأشكال داخل الخلايا من الطفيليات تخفيضات كبيرة في هذه الأشكال من خلايا أو ستات الكريبتوسبور يديوم. ( $P < 0.005$ ) Caco-2 و HCT-8 بشكل كبير تكاثر الطفيل في خلايا NAG بالإضافة لذلك، يثبط البار وموميسين، الشيتوزان أميكسولبار. في الدرسات المجراة، قلل العلاج باستخدام (Chitosan Mix، Chitosan، NAG) في الدرسات المجراة، قلل العلاج باستخدام أو كبريتات البار وموميسين بشكل كبير من نسبة الطفيليات في الفئران حديثي الولادة المصابة. في الختام، تشكل هذه النتائج دليلاً على المختبر وفي الجسم الحي على أنشطة مكافحة الكريبتوسبور يديوم من هذه السكريات الطبيعية في عزلات الكريبتوسبور يديوم.

CD-، استنبات الخلايا، الفئران، PCR، المجترات، *Cryptosporidium* spp. الكلمات المفتاحية: العدوى، الأمراض الحيوانية المنشأ، الشيتوزان، البار وموميسين، الجزائر 1

## LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
1	Photographie prise au microscope électronique montrant plusieurs stades de <i>Cryptosporidium</i> .	14
2	Schéma représentatif de la différenciation du sporozoïte en trophozoïte.	15
3	Développement apical de <i>Cryptosporidium parvum</i> dans les entérocytes (MET).	16
4	Représentation schématique du cycle de développement biologique de <i>Cryptosporidium</i> sp.	16
5	Différents stades de développement de <i>Cryptosporidium</i> à la surface des microvillosités intestinales. Un méronte de type I est représenté par la lettre M,	17
6	Micrographie électronique à balayage des plaques de Peyer iléales d'un jeune agneau d'une semaine infecté par <i>Cryptosporidium parvum</i> .	29
7	Représentation schématique et simplifiée de la voie de signalisation des chemokines et cytokines lors de l'infection par <i>Cryptosporidium</i> spp.	30
8	Observation d'oocystes de <i>C. parvum</i> à l'immunofluorescence (Kit mérifluor).	54
9	Structure chimique du chitosan et sa production à partir de la chitine par hydrolyse alcaline du Groupes N-acétyl.	79
10	Les régions d'étude (Algérie carte <i>d-maps.com</i> )	91
11	Récolte des matières fécales directement au moment de leur émission	92
12	Concentration des oocyste à l'éthyle et apparition des trois phases.	94
13	Kit Mérifluor (a), Lame (Slide) noire de 10 puits (b1-b2) avec une lamelle (Coverslide) couvre objet (24 x 67 mm).	95
14	Matériel de protection pour l'étape de prétraitement avec l'azote (a) et kit d'extraction <i>QIAmp Mini Kit DNA</i> (b).	96
15	Les différentes étapes de la PCR nichée 18S. Préparation avec le Master Mix (a), amplification dans le thermocycleur (b), dépôt des ADN dans le gel (c1, c2), migration des ADN en électrophorèse (d) et lecture du gel sous UV (e).	98
16	Nombre de fermes bovines étudiées dans les différentes régions en Algérie.	105
17	Nombre de fermes ovines étudiées dans les différentes régions en Algérie.	105
18	Distribution du nombre de bovins étudiés par wilaya	106
19	Distribution du nombre d'ovins étudiés par wilaya	106
20	Répartition des effectifs bovins étudiés selon l'âge.	107
21	Répartition des effectifs ovins étudiés selon l'âge.	108
22	Statut clinique des bovins étudiés.	109
23	Statut clinique des ovins étudiés.	109
24	Prévalence de la cryptosporidiose dans les matières fécales de veaux analysées par immunofluorescence.	111
25	Détection des isolats de veaux infectés (nombre) par	111

## LISTE DES FIGURES

	immunofluorescence en fonction de l'âge (jours).	
26	Détection des veaux infectés (nombre) analysés par immunofluorescence en fonction du statut clinique	112
27	<i>Cryptosporidium spp.</i> observés à l'immunofluorescence dans les matières fécales après concentration chez les	113
28	Excrétion des oocystes (nombre) chez les bovins en fonction de l'âge (jour).	114
29	Excrétion des oocystes (nombre) chez les bovins en fonction du statut clinique.	114
30	Excrétion des oocystes (nombre) chez les bovins en fonction des régions d'étude (Centre et Est)	115
31	Prévalence de <i>Cryptosporidium spp.</i> chez les isolats bovins détectées par PCR nichée ARNr 18S.	116
32	Répartition des isolats de veaux (nombre) positifs à <i>Cryptosporidium spp</i> en fonction de l'âge (jours).	117
33	Répartition du nombre des isolats de veaux positifs à <i>Cryptosporidium spp</i> identifiés par PCR en fonction du statut clinique.	118
34	Répartition des espèces <i>Cryptosporidium spp</i> chez les bovins.	118
35	Prévalence de la cryptosporidiose chez les agneaux déterminée par immunofluorescence.	122
36	Excrétion d'oocystes (nombre) examinée par immunofluorescence en fonction de l'âge (jours) des agneaux.	123
37	Détection d'agneaux infectés (nombre) analysés par immunofluorescence en fonction du statut clinique	123
38	<i>Cryptosporidium spp.</i> observées à l'immunofluorescence dans les matières fécales après concentration chez les ovins	124
39	Niveau d'excrétion (nombre d'oocystes) chez les ovins en fonction de l'âge.	125
40	Excrétion des oocystes (nombre) chez les ovins en fonction du statut clinique	126
41	Excrétion des oocystes chez les ovins en fonction de la région	126
42	Prévalence de <i>Cryptosporidium spp.</i> chez les isolats ovins détectés par PCR nichée ARNr 18S.	128
43	Répartition des isolats de agneaux positifs à <i>Cryptosporidium spp</i> en fonction de leur l'âge	128
44	Répartition des isolats d'agneaux positifs à <i>Cryptosporidium spp</i> en fonction du statut clinique.	129
45	Répartition des espèces <i>Cryptosporidium spp</i> chez les ovins étudiés.	130
46	Tapis cellulaires observés au microscope photonique x10	145
47	Culture cellulaire en flasque	148
48	Préparation des tapis cellulaire sur lamelles dans les plaques	148
49	Préparation des tapis cellulaire sur lamelles dans les plaques	149
50	Protocole expérimental de l'essai <i>in vitro</i>	151
51	Groupe de souriceaux nouveaux-nés	152
52	Protocole expérimental de l'essai <i>in vivo</i>	154
53	Oocystes de <i>Cryptosporidium parvum</i> (isolat bovin) marqués à	156



## LISTE DES FIGURES

	l'anticorps polyclonal Sporoglo ( <i>Waterborne</i> , USA) et observé en immunofluorescence au microscope	
54	Etude de l'infectiosité des isolats bovins cultivés sur HCT-8	157
55	Etude de l'infectiosité des isolats bovins cultivés sur Caco-2	157
56	Etude de l'infectiosité des isolats ovins cultivés sur les cellules HCT8	158
57	Evaluation du potentiel « anti-cryptosporidien » des polysaccharides naturels (chitosans) sur les isolats bovins B1, B13 et B29 sur Caco2	158
58	Evaluation du potentiel « anti-cryptosporidien » des polysaccharides naturels (chitosans) sur les isolats bovins B1, B13 et B29 sur Caco2	161
59	Evaluation du potentiel « anti-cryptosporidien » des polysaccharides naturels (chitosans) sur les isolats bovins B1, B13 et B29 cultivés sur les cellules HCT8	162
60	Evaluation du potentiel « anti-cryptosporidien » des polysaccharides naturels (chitosans) sur les isolats ovins O2, O33 et O70 cultivés sur les cellules HCT8	164
61	Evaluation du potentiel « anti-cryptosporidien » des polysaccharides naturels (chitosans) sur les isolats ovins O2 et O70 cultivés sur Caco-2	165
62	Effet des chitosans et paromomycine sur l'isolat B29 dans le modèle <i>in vivo</i> .	166
63	Taux de mortalité de l'effectif des souris durant l'essai <i>in vivo</i>	166
64	Caractérisation du modèle souris CD-1 infecté par <i>C. parvum</i>	171

## LISTE DES TABLEAUX

N°	Titre	Page
1	Position taxonomique du genre <i>Cryptosporidium</i> .	6
2	Caractères biologiques de 26 espèces de <i>Cryptosporidium spp.</i>	9
3	Prévalence de la Cryptosporidiose par les méthodes de coloration classiques chez les bovins dans certaines régions de l'Algérie	40
4	Espèces et sous-types de <i>Cryptosporidium</i> provenant de bovins laitiers utilisant l'analyse moléculaire en Algérie.	41
5	<i>Cryptosporidium spp.</i> détectés chez les petits ruminants en Algérie.	42
6	Espèces et sous-types de <i>Cryptosporidium</i> isolés à partir des équidés, de volailles et de dromadaires en Algérie.	42
7	Nombre de bovins et d'élevages étudiés par région	102
8	Nombre d'ovins et d'élevages étudiés par région	102
9	Nombre d'ovins et d'élevages étudiés par région	104
10	Les différents types d'élevages étudiés chez les petits ruminants.	104
11	Nombre d'élevage bovins positifs déterminés à l'immunofluorescence.	109
12	Nombre d'élevage bovins positif identifiés par PCR 18S	115
13	Nombre de bovins infectés par <i>C. parvum</i> et <i>C. bovis</i> en fonction de l'âge	118
14	Espèces et sous-types de <i>Cryptosporidium</i> caractérisés chez les bovins étudiés.	120
15	Elevages ovins positifs par analyse à l'immunofluorescence	121
16	Elevages ovins caractérisés par PCR nichée ARNr 18S	127
17	Nombre d'agneaux infectés par <i>C. parvum</i> et <i>C. ubiquitum</i> en fonction de l'âge	130
18	Espèces et sous-types de <i>Cryptosporidium</i> caractérisés chez les ovins étudiés.	132
19	Caractéristiques des isolats bovins et ovins retenus pour les essais	155
20	Taux de réduction des formes intracellulaire de <i>C. parvum</i> en pourcentage (%) sous l'effet des anti-cryptosporidiens	160
21	Taux de réduction des formes intracellulaires du parasite en pourcentage (%) sous l'effet des molécules chitosans et paromomycine	163

**ADN :** Acide désoxyribonucléique

**ANOFEL :** Denomination de l'Association française des enseignants et praticiens hospitaliers titulaires de parasitologie et mycologie médicales.

**ARN:** AcideRibonucléique,

**ARNm:** ARN messenger

**ARNr:** ARN ribosomal

**BET:** Bromured'ethidium

**ELISA:** Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

**EMT :** microscope électronique à transmission

**ENVA :** Ecole Nationale Vétérinaire Alfort

**FIC :** forme intracellulaire

**Gp60:** Glycoprotéine60

**ID50:** infectious dose to 50% of exposed individuals

**IFN:** interferon

**IL:** interleukin

**kDa:** Kilodalton

**kg:** Kilogramme

**mg:** Milligramme

**ng:** Nanogramme

**MgCl<sub>2</sub> :** Chlorure de Magnésium

**mL:** Millilitre

**OMS :** Organisation Mondiale de Santé

**Opg :** Oocyste par gramme

**Pb :** Pairede base

**PCR :**Polymerase Chain Reaction

**PSM :** Poste de sécurité microbiologique

**RFLP:***Restriction Fragment Length Polymorphisme*

**Spp:** espèces

**TLR:***Toll like receptors*

**TNF:***Tumor necrosis factor*

**UMR BIPAR :** Unité Mixte de Recherche de biologie moléculaire et d'immunologie parasitaire

<b>INTRODUCTION</b>	1
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE GENRE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i></b>	3
I.1. Historique et découverte du parasite	3
I.2. Classification et taxonomie	5
I.2.1. Nouvelle position taxonomique du genre <i>Cryptosporidium</i>	8
I.2.2. Classification des espèces de <i>Cryptosporidium</i>	9
I.2.2.1. Espèces de <i>Cryptosporidium</i> chez les ruminants	10
I.2.2.2. Espèces de <i>Cryptosporidium</i> chez les autres animaux	12
I.2.2.3. Espèce <i>Cryptosporidium</i> chez l'homme	13
I.3. Biologie du parasite	13
I.3.1. Morphologie du parasite	13
I.3.2. Cycle de développement	14
I.3.3. Survie et résistance dans le milieu extérieur	18
I.4. Génétique de <i>Cryptosporidium</i>	20
<b>CHAPITRE II : ETUDE DE LA CRYPTOSPORIDIOSE</b>	21
II.1. Cryptosporidiose chez les ruminants	21
II.1.1. Aspect clinique chez le bovin	22
II.1.2. Aspect clinique chez les petits ruminants (ovins et caprins)	24
II.2. Association de la Cryptosporidiose et les autres entéropathogènes	25
II.3. Cryptosporidiose chez l'homme	26
II.4. Pouvoir pathogène et physiopathologie de la Cryptosporidiose chez les animaux	27
II.5. Système immunitaire en présence de Cryptosporidiose	29
<b>CHAPITRE III : ÉPIDÉMIOLOGIE</b>	33
III.1. Épidémiologie descriptive chez les ruminants	33
III.1.1. Épidémiologie descriptive chez les ruminants dans le monde	33
III.1.2. Espèces de <i>Cryptosporidium</i> présentes chez les ruminants	35
III.1.3. Caractérisation de l'aspect zoonotique	38
III.1.4. Épidémiologie de la cryptosporidiose en Algérie	39
III.1.4.1.Épidémiologie de la cryptosporidiose chez les ruminants	39
III.1.4.2. Épidémiologie de la cryptosporidiose chez d'autres animaux	43
III.1.5. Variabilité des résultats d'études épidémiologiques	43
III.2. Épidémiologie analytique chez les ruminants	44
III.2.1. Sources de parasites	44
III.2.2. Facteurs favorisants	46
III.3. Epidémiologie chez l'homme	48
III.3.1. Epidémiologie dans le monde	48
III.3.2. Epidémiologie en Algérie	50
<b>CHAPITRE IV : METHODES DE DIAGNOSTIC ET D'ETUDE DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i></b>	52
IV.1. Méthodes classiques de détection et d'identification de <i>Cryptosporidium spp</i>	52
IV.1.1. Techniques de concentration	52
IV.1.2. Techniques de coloration microscopique	53
IV.1.3. Méthodes immunologiques	54

IV.2. Identification de <i>Cryptosporidium spp.</i> par les méthodes de biologie moléculaire	56
IV.2.1. Extraction de l'ADN de <i>Cryptosporidium spp</i>	56
IV.2.2. Réactions d'amplification en chaîne par polymérase (PCR)	56
IV.2.2.1. Amplification du gène ADN <sub>r</sub> 18S par PCR 18S	57
IV.2.2.2. PCR-RFLP pour l'identification de <i>Cryptosporidium spp.</i>	57
IV.2.2.3. PCR gp60 et identification des sous-types <i>Cryptosporidium spp.</i>	58
IV.2.2.4. PCR quantitative ou PCR temps réel	59
IV.2.2.5 Séquençage cellulaire	59
IV.2.2.6. Génotypage <i>multilocus</i>	60
IV.3. Technique et outils d'étude de <i>Cryptosporidium</i>	61
<b>CHAPITRE V : MOYENS DE LUTTE THERAPEUTIQUE ET CONTROLE DE LA CRYPTOSPORIDIOSE</b>	66
V.1. Pratiques de gestion des exploitations agricoles	67
V.2. Traitement symptomatique	67
V.3. Thérapeutique spécifique	69
V.3.1. Antimicrobiens	69
V.3.1.1. Antibiotiques	69
V.3.1.2. Autres produits antimicrobiens	71
V.4. Molécules issues de la médecine traditionnelle et des plantes	74
V.4.1. Charbon actif (ou charbon activé)	74
V.4.2. Grenade	74
V.4.3. Ail	75
V.4.4 Curcuma	75
V.4.5. Acides ginkgoliques	76
V.4.6. Alcaloïde issu de <i>Sophora flavescens</i>	76
V.4.7. Mangiférine	77
V.4.8. Génistéine	77
V.5. Molécules à activité anticryptosporidienne potentielle	77
V.5.1. Molécules de nature saccharidique	77
V.5.1.1. Cyclodextrine	77
V.5.1.2. Polysaccharides naturels « Chitosans »	78
V.5.2. Molécules de natures lipidique, peptidique ou autres	82
V.6. Immunothérapie et prophylaxie	82
V.6.1. Vaccination	82
V.6.2. Prophylaxie par le colostrum	83
<b>VI. CONCLUSION</b>	85

## ***PARTIE EXPERIMENTALE***

<b>CONTEXTE</b>	87
<b>I. Lieu du travail et laboratoire d'accueil</b>	87
<b>II. Cadre du travail et financement</b>	87

**1<sup>ERE</sup> PARTIE. CARACTERISATION PHENOTYPIQUE ET GENOTYPIQUE  
DE *CRYPTOSPORIDIUM. SPP* CHEZ LES RUMINANTS.**

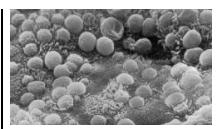
<b>I. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS</b>	88
<b>II. MATERIELS ET METHODES</b>	90
II.1. Type de l'étude	91
II.2. Régions d'étude	91
II.3. Population d'étude	91
II.4. Période de l'étude	92
II.5. Modalités de prélèvement	92
II.6. Réactifs et matériels de laboratoire	93
II.7. Méthodes d'analyses	93
II.7.1. Concentration des oocystes par sédimentation au diéthyle	93
II.7.2. Recherche et quantification des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> par immunofluorescence	94
II.7.3. Détection et identification de <i>Cryptosporidium spp.</i> par la méthode de biologie moléculaire	95
II.7.3.1. Extraction de l'ADN génomique de <i>Cryptosporidium spp.</i>	95
II.7.3.2. Détection de <i>Cryptosporidium</i> par PCR nichée 18S	97
II.7.3.3. Identification des espèces de <i>Cryptosporidium</i> par PCR-RFLP	98
II.7.3.4. Détection du gène gp60 de l'espèce <i>C. parvum</i> par PCR-gp60	99
II.7.3.5. Séquençage du gène de la glycoprotéine 60 chez <i>C. parvum</i>	100
II.7.4. Analyse statistique	100
<b>III. RESULTATS</b>	101
III.1. Pland'analyse	101
III.2. Caractérisation phénotypique et génotypique de <i>cryptospridium</i> chez le bovin	109
III.2.1. Caractérisation phénotypique	109
III.2.2 Caractérisation moléculaire	114
III.2.2.1. Elevages positifs caractérisés par PCR nichée ARNr 18S	114
III.2.2.2. Isolats de veaux positifs caractérisés par PCR nichée ARNr18s	114
III.2.2.3. Identification des espèces de <i>Cryptosporidium spp.</i> par PCR-RFLP	117
III.2.2.4. Recherche et séquençage du gène de la gp60 dans les isolats de <i>C. parvum</i>	118
III. 3. Caractérisation phénotypique et génotypique de <i>cryptosporidium</i> chez les ovins	121
III.3.1. Caractérisation phénotypique	121
III.3.2. Caractérisation moléculaire	126
III.3.2.1. Elevages positifs caractérisés par PCR nichée d'ARNr18S	126
III.3.2.2. Caractérisation des isolats ovins par PCR nichée 18S	127
III.3.2.3. Identification des espèces de <i>Cryptosporidium spp.</i> par PCR-RFLP	129
III.3.2.4. Recherche et séquençage du gène de la gp60 dans les isolats de <i>C. parvum</i>	130
<b>IV. DISCUSSION</b>	133
IV.1. Caractérisation phénotypique et génotypique de <i>Cryptospridium</i> chez les bovins	133
IV.2. Caractérisation phénotypique et génotypique de <i>Cryptospridium</i> chez les ovins	138
<b>V. CONCLUSION</b>	142

**2<sup>ème</sup> PARTIE.ETUDE DE L'INFECTIOSITE DU PARASITE ET  
EVALUATION DU POTENTIEL « ANTI-CRYPTOSPORIDIEN » DES  
CHITOSANS SUR LES ISOLATS DE TERRAIN *IN VITRO* ET *IN VIVO***

<b>I. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS</b>	143
<b>II. MATERIELS ET METHODES</b>	144
II.1. Laboratoire de culture cellulaire et équipements	144
II.2. Modèle <i>in vitro</i> « culture cellulaire »	144
II.3. Le Modèle <i>in vivo</i>	145
II.4. Parasites utilisés	146
II.4.1. Souche de référence (Iowa)	146
II.4.2. Isolats naturels testés	146
II.5. Molécules anti-cryptosporidiennes utilisées	146
II.5.1. Sulfate de Paromomycine	146
II.5.2. Polysaccharides naturels (Chitosans)	147
II.6. Protocole expérimental <i>in vitro</i>	147
II.6.1. Préparation des cultures cellulaires	147
II.6.2 Etude de l'infectiosité des isolats de terrain d'origine bovine et ovine	148
II.6.3. Etude de l'effet des « anti-cryptosporidiens » polysaccharides naturels (chitosans) sur les isolats de terrain d'origine bovine et ovine	150
II.7. Protocole expérimentale <i>in vivo</i>	151
II.7.1. Le choix du modèle	151
II.7.2. Evaluation <i>in vivo</i> de l'infectiosité des isolats ovins et bovins	152
II.7.3. Etude de l'effet des produits « anti-cryptosporidiens » sur les isolats de terrain d'origine bovine <i>in vivo</i>	153
II.8. Analyses statistiques	154
<b>III. RESULTATS</b>	155
III.1. Caractérisation des isolats bovins et ovins	155
III.2. Résultats de l'étude de l'infectiosité des isolats <i>in vitro</i>	156
III.3. Evaluation <i>in vitro</i> du potentiel « anti-cryptosporidien » des polysaccharides naturels (chitosans) et la paromomycine sur les isolats de terrain de <i>Cryptosporidium</i>	159
III.4. Estimation de l'infectiosité <i>in vivo</i>	165
III.5. Evaluation <i>in vivo</i> du potentiel « anti-cryptosporidien » des polysaccharides et de la paromomycine	165
<b>IV. DISCUSSION</b>	167
<b>V. CONCLUSION</b>	172
<b>DISCUSSION GENERALE</b>	174
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	182
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	

# ***INTRODUCTION***

---





Le genre *Cryptosporidium* est un protozoaire appartenant à l'embranchement des Apicomplexa qui se multiplie dans les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal et du système respiratoire d'un grand nombre de vertébrés, y compris l'homme (Chalmers et Katzer, 2013 ; Ryan *et al.*, 2014).

La cryptosporidiose est une zoonose opportuniste cosmopolite causée par diverses espèces de *Cryptosporidium*. Plus d'une trentaine d'espèces ont été validées pour le genre *Cryptosporidium*, 30 espèces ont été rapportées par Osman *et al.*, en 2017. Les espèces qui parasitent le plus fréquemment l'homme sont *C. parvum* et *C. hominis*, même si des infections par *C. meleagridis*, *C. cuniculus*, *C. andersoni*, *C. felis*, et *C. canis* ont été rapportées mais le plus souvent chez des patients à risques (Chalmers et Katzer, 2013 ; Xiao, 2010). En effet, cette parasitose émergente a un impact considérable chez le patient immunodéprimé, surtout chez les malades du syndrome de l'immunodéficience acquise. En Algérie, une étude récente a révélé un taux de présence de 9,4% de *Cryptosporidium spp.* chez des personnes infectées par le virus du HIV (Semmani *et al.*, 2019). L'infection est toutefois possible chez les sujets immunocompétents, de façon sporadique ou associée à des épidémies, mais cela se traduit par des diarrhées auto-résolutives, généralement sans complications. De récentes données ont montré que *Cryptosporidium* est parmi les principales causes de diarrhée infantile modérée à sévère chez les enfants âgés de moins de 2 ans dans les pays en développement (Kotloff *et al.*, 2013 ; Striepen, 2013). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2011), la cryptosporidiose est incluse dans la liste des maladies négligées qui constituent un frein au développement socio-économique dans les pays en voie de développement. Cette maladie révèle une incidence importante en santé publique.

Les animaux âgés de moins d'un mois sont particulièrement sensibles à cette parasitose intestinale, se traduisant par de la diarrhée, pouvant s'accompagner d'une morbidité et d'une mortalité élevées. Cette maladie peut être théoriquement prévenue en élevage par des mesures d'hygiène très strictes. Cependant, du fait d'une grande résistance des oocystes excrétés dans l'environnement, la transmission ne peut être totalement contrôlée. Les oocystes sont la forme de résistance et de dissémination du parasite. Le mode de transmission de cette infection est oro-fécal, soit indirectement par ingestion d'oocystes contaminant l'eau ou les aliments soit par contact direct avec un sujet infecté. Ce dernier peut être un homme ou un animal, la maladie peut donc se répandre par la voie anthroponotique ou zoonotique (Chalmers *et* Katzer, 2013 ; Ryan *et al.*, 2014).

En Afrique du Nord, l'Algérie est un important pays d'élevage ovin. Le cheptel de l'espèce ovine compte 28 Millions d'animaux ce qui représente 80% du cheptel national des ruminants qui comprend également 4,9 Millions de caprins et 2 Millions de bovins (Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et du Développement Rural, 2016).

Dans notre pays, la cryptosporidiose a été déterminée chez diverses espèces d'animaux domestiques, la prévalence chez les ruminants indique des taux d'infection allant de 7% à 50,8%. Toutefois, il existe peu d'études sur la caractérisation moléculaire de *Cryptosporidium*. Des données d'identification moléculaire ont été publiées concernant les espèces de *Cryptosporidium* chez les ruminants (Benhouda *et al.*, 2017 ; Baroudi *et al.*, 2018 ; Ouakli *et al.*, 2018) et la forme zoonotique de *C. parvum* chez les bovins (Baroudi *et al.*, 2017 ; Ouakli *et al.*, 2018). Aussi, très peu de données concernant la diversité génétique de l'espèce *C. parvum* circulant chez les petits ruminants (Baroudi *et al.*, 2018).

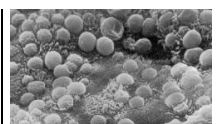
Actuellement, il n'existe pas de traitement efficace contre cette parasitose. Par conséquent, les moyens de contrôle à notre disposition restent très limités. Pour cela la deuxième partie de notre travail est consacrée à l'approche thérapeutique *in vitro* et *in vivo*.

Ainsi, la cryptosporidiose est plus que jamais un sujet d'actualité. Dans cette optique, notre travail de thèse est réalisé sur deux axes :

- Le premier axe est de caractériser la variabilité génétique des espèces de *Cryptosporidium* chez les ruminants domestiques dans plusieurs régions de notre pays. Cette caractérisation phénotypique et génotypique de *Cryptosporidium. spp* chez les ruminants domestiques en Algérie vise deux objectifs :
  - Identifier les espèces excrétées par les animaux,
  - Identifier les sous-types de *C. parvum* et estimer le potentiel zoonotique.
- Le second axe est d'évaluer le potentiel anticryptosporidien des polysaccharides naturels et de la paromomycine sur les isolats de terrain qui vise deux objectifs :
  - Etudier l'infectiosité des isolats des ruminants,
  - Evaluer l'effet potentiel des polysaccharides naturels « chitosan » et la paromomycine sur les isolats.

## ***PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE***

---



## **CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE GENRE *CRYPTOSPORIDIUM***

### **I.1. Historique et découverte du parasite**

L'une des premières observations du parasite *Cryptosporidium* fut sûrement celle du docteur James Jackson Clarke en 1895. Ce dernier remarque la présence de coccidies dans le tractus digestif d'une souris trouvée morte. La mise en culture du parasite puis son inoculation à une nouvelle souris lui permet d'observer le cycle de développement du parasite. Il note alors ses différents aspects morphologiques et rapproche ce parasite de celui observé par Eimer, nommé *Eimeria* par Schneider en 1875. Ce sont cependant deux parasites différents, appartenant à l'embranchement des Apicomplexa.

*Cryptosporidium* a été décrit ensuite au début du 19<sup>ème</sup> siècle par Ernest Edwards Tyzzer. Ce parasitologue de l'université de Harvard (Boston, USA) avait décrit entre 1907 et 1912 deux espèces parmi ce genre. Il isola un parasite unicellulaire de l'épithélium gastrique de la souris de laboratoire, qu'il nomma *Cryptosporidium muris*. En 1912, il mit en évidence, une nouvelle espèce, dans l'intestin grêle chez le même animal qu'il nomma *Cryptosporidium parvum*. Ces deux espèces étaient différentes de par leur localisation et la taille de leur oocyste.

Depuis, de nombreuses espèces furent décrites en se basant principalement sur l'animal hôte comme critère d'identification (Vetterling *et al.*, 1971). Cependant, la morphologie de ces différentes espèces, vue au microscope, était similaire si bien que la méthodologie d'identification des espèces fut remise en question. De nouvelles techniques de biologie moléculaire, apparues à la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, ont permis d'identifier et de répertorier plusieurs espèces chez l'homme et chez les animaux.

En 1955, Slavin décrit *Cryptosporidium meleagridis* chez le dindon (*Meleagris gallopavo*), la première espèce associée à la présence des signes cliniques apparus chez ces oiseaux.

En 1971, chez les ruminants et spécifiquement chez les bovins, Panciera *et al.*, décrivent une cryptosporidiose clinique chez une génisse. Depuis, ce parasite fut reconnu en médecine vétérinaire comme agent responsable d'épizooties de diarrhées pouvant être mortelles dans les élevages de jeunes veaux.

Chez l'homme les premiers cas ont été dépistés aux Etats-Unis en 1976, chez un enfant âgé de trois ans avec une gastro-entérite et chez un adulte âgé de 39 ans immunodéprimé (Meisel *et al.*, 1976; Nime *et al.*, 1976). Ce n'est que dans les années suivantes, avec l'apparition du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), que les rapports associés aux agents pathogènes opportunistes ont été concentrés particulièrement sur la cryptosporidiose humaine. En effet, un premier cas de cryptosporidiose chez un patient séropositif fut rapporté en août 1981 aux Etats-Unis (Ma et Soave, 1983) avec des diarrhées sévères et prolongées. Les symptômes rapportés chez les patients contaminés par le VIH étaient plus importants et ne se résolvaient pas spontanément, contrairement aux patients immunocompétents (Flanigan *et al.*, 1992). Le nombre de cas rapportés chez des patients atteints du SIDA fut alors exponentiel, plus d'une cinquantaine de cas diagnostiqués entre août 1981 et septembre 1983 dans les états de New York, du New Jersey, de Boston et de Philadelphie (Ma, 1984). L'avènement des antirétroviraux, avec le développement de la zidovudine (AZT) en 1987 a permis une augmentation de l'espérance de vie des patients séropositifs (Conti *et al.*, 2000). Dans les pays développés ayant accès à ces traitements, l'incidence de la cryptosporidiose chez les patients séropositifs diminue de façon notable grâce à la baisse de la charge virale (Pozio *et al.*, 2005).

Il a de même été mis en évidence le rôle de *Cryptosporidium* dans de nombreuses épidémies. La plus importante fut celle de Milwaukee, aux Etats-Unis, qui toucha, en mars et avril 1993, plus de 400 000 personnes (Mac Kenzie *et al.*, 1994), soit 26% de la population locale. De nombreuses autres épidémies ont également été rapportées, le plus souvent en relation avec la consommation d'eaux souillées, mais aussi d'aliments contaminés, en Australie, aux Etats Unis, au Royaume-Uni (Fayer *et al.*, 2000), ainsi qu'en France en 2002 (Guyonnet *et* Claudet, 2002), et en 2019 une récente épidémie a eu lieu dans la ville de Grasse avec 30 000 personnes infectées (Nice-Matin, 2019).

Cependant, le développement et l'usage de médicaments immunosuppresseurs utilisés comme traitement de nombreuses pathologies auto-immunes, oncologiques ou en post-transplantation, fait émerger de nouvelles populations de patients très susceptibles aux micro-organismes opportunistes tel *Cryptosporidium*.

En outre, le parasite reste présent et il est responsable d'épidémies dans les pays en voie de développement où il représente un véritable problème de santé publique. Par ailleurs, il n'existe pas à l'heure actuelle un traitement efficace contre l'infection au *Cryptosporidium* ni de vaccin commercial chez les humains et les animaux. Or, en plus des diarrhées qu'il peut

engendrer, il a été montré que le *C. parvum* induit le cancer sur le modèle de souris immunodéprimé (Certad *et al.*, 2007 ; Certad *et al.*, 2007 ; Benamrouz *et al.*, 2014), soulevant la question du risque potentiel pour l'homme.

La résistance des oocystes du parasite dans l'eau et l'environnement, ainsi que des implications socio-économiques, ont amené l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) à inclure cette parasitose parmi les maladies négligées (Savioli *et al.*, 2006) et à utiliser *Cryptosporidium* comme « pathogène de référence » parmi les protozoaires transmis par la voie féco-orale dans le contrôle de la qualité de l'eau potable (Medema, 2009 ; OMS, 2011). La surveillance de la présence d'oocystes dans l'eau fait maintenant partie de la surveillance visant à appuyer les plans de salubrité de l'eau (OMS, 2011).

La dernière étape de notre perception changeante de l'importance des parasites de *Cryptosporidium* pour la santé publique a été l'inclusion de *C. parvum* et *C. hominis* dans la liste des agents infectieux de catégorie B en raison de leur potentiel de bioterrorisme (Widmer *et Sullivan*, 2012).

En fait, la faible dose infectieuse, la résistance de l'oocyste à de nombreux désinfectants et les symptômes potentiellement graves causés par le parasite pourraient motiver la contamination malveillante des systèmes centralisés d'approvisionnement en eau par des oocystes de *Cryptosporidium*.

### **I.2. Classification et taxonomie**

Les parasites du genre *Cryptosporidium* sont des protistes appartenant à l'embranchement des *Apicomplexa* et au groupe des Coccidies. Tous les membres des *Apicomplexa* sont des parasites et ont tous des caractéristiques spécifiques liées au parasitisme, notamment, la présence dans leurs formes invasives d'un complexe apical lié à la locomotion et à l'invasion cellulaire.

Dans cet embranchement sont également classées les genres *Babesia*, *Cyclospora*, *Eimeria*, *Isospora*, *Plasmodium*, *Sarcocystis* et *Toxoplasma* (Spano *et Crisanti*, 2000). Les parasites du genre *Cryptosporidium* appartiennent à la classe *Sporozoasida*, la sous-classe *Coccidiasina*, ordre *Eucoccidiorida*, sous-ordre *Eimeriorina*, et famille *Cryptosporidiidae* (Huw Smith, *et Rosely*, 2007). L'ensemble est décrit dans le Tableau 1.

**Tableau 1.** Position taxonomique du genre *Cryptosporidium*.

Classification	Dénomination	Caractéristiques biologiques
Règne	Protiste	Micro-organismes non observés à l'œil nu
Sous-règne	Eukarayota	Caractérisés principalement par des cellules possédant un noyau avec enveloppe nucléaire
Embranchement	Apicomplexa	Existence d'un complexe apical dans les formes invasives
Classe	Sporozoasida	Cycle biologique avec reproduction sexuée et asexuée du parasite donnant des oocystes.
Sous-classe	Coccidiasina	Présence de microgamètes intracellulaires
Ordre	Eucoccidiorida	Cycle biologique avec mérogonie.
Sous-ordre	Eimeriorina	Formation indépendante des micro- et macrogamontes.
Famille	Cryptosporidiidae	Développement intracellulaire mais extra-cytoplasmique, cycle monoxène (chez un seul hôte), oocystes contenant 4 sporozoites nus, sans sporocystes.
Genre	<i>Cryptosporidium</i>	Absence de sporocystes

(Fayer et Ungar, 1986 ; Janoff *et* Reller, 1987 ; Current *et* Garcia, 1991).

Historiquement ; rapproché des coccidies (*Toxoplasma*, *Cyclospora*, *Isospora*, *Sarcocystis* ...) par des critères morphologiques, *Cryptosporidium* *sp.* se distingue cependant par plusieurs caractéristiques (Barta *et* Thompson, 2006) :

- Le développement de *Cryptosporidium* est intracellulaire mais extra-cytoplasmique, dans une vacuole parasitophore (Thompson *et al.*, 1988), alors que celui des coccidies est uniquement intracellulaire.

- On note la présence d'une organelle d'attachement (feeder organelle) située à la base de la vacuole parasitophore, entre les cellules hôtes et les sporozoïtes du genre *Cryptosporidium* (Spano *et* Crisanti, 2000).
- Il existe deux types d'oocystes dans le genre *Cryptosporidium* : l'oocyste à paroi épaisse (résistant et permettant la dissémination du parasite dans les selles et la contamination d'hôtes différents) et l'oocyste à paroi fine responsable de l'auto-infestation, libérant ses sporozoïtes lors de la sortie de la cellule hôte (Current *et* Garcia, 1991). Chez les coccidies, il n'existe qu'un seul type d'oocyste, à paroi épaisse.
- Les sporozoïtes du genre *Cryptosporidium* sont dénués de sporocystes, ils sont donc nus dans l'oocyste, contrairement aux autres coccidies (Spano *et* Crisanti, 2000), leur attribuant cette dénomination.
- La paroi des oocystes présente une suture longitudinale permettant aux sporozoïtes d'en sortir lors de l'excystation (Spano *et* Crisanti, 2000).
- Les agents anti-infectieux usuellement efficaces dans le traitement des maladies engendrées par les coccidies ne sont pas utilisables pour le traitement de la Cryptosporidiose (Coombs, 1999 *et* Petry, 2004).
- De plus, *Cryptosporidium* ne possède pas d'apicoplaste ni de mitochondries alors qu'il est démontré que son génome contient les gènes codant pour les mitochondries (Bouzig *et al.*, 2013).
- Enfin, les parasites appartenant au genre *Cryptosporidium* ont un génome très compact. Il a une taille de 9,1 Mb, qui est repartie en huit chromosomes (Bouzig *et al.*, 2013). Ces parasites possèdent un métabolisme basal plutôt simplifié avec des voies de biosynthèse très réduites, impliquant la dépendance du parasite envers son hôte (Rider *et* Zhu, 2010).

Bien que la découverte de *Cryptosporidium* remonte déjà à un siècle, c'est seulement après une vingtaine d'années que le monde médical et vétérinaire a considéré l'importance de cette parasitose dans leurs domaines respectifs. Même si le genre *Cryptosporidium* est maintenant bien reconnu par les scientifiques, la taxonomie du parasite au sein de ce genre soulève encore de nombreuses discussions.

En effet, certains auteurs placent le genre *Cryptosporidium* dans le groupe des Coccidies, mais séparé des coccidies typiques, à la base du phylum des Apicomplexa (Kuo *et al.*, 2008). Ce fait nous mène à une nouvelle classification concernant le genre *Cryptosporidium*.



### **I.2.1. Nouvelle position taxonomique du genre *Cryptosporidium***

Depuis la description du genre *Cryptosporidium*, sa classification taxonomique a fait l'objet de débat. Barta et al., (2006), ont regroupé toutes les différences significatives entre *Cryptosporidium* et les autres coccidies. Sur le plan phylogénétique, d'autres auteurs insistent sur un rapport probablement très étroit du genre avec la branche des grégarines (Chacín-Bonilla, 2007 ; Robinson et al., 2010).

Les avancées de séquençage du génome entier et l'analyse des données déterminées ont établi que les génomes organellaires et les voies métaboliques spécifiques observés chez des parasites étroitement liés à l'*Apicomplexa* n'étaient pas présents dans les génomes de *Cryptosporidium* (Zhu et al., 2000). En effet, *Cryptosporidium*, similaire aux grégarines (Toso et Omoto, 2007), a perdu son génome d'apicoplaste, présent dans tous les autres parasites Apicomplexa (Foth et McFadden, 2003 ; Waller et McFadden, 2005 ; Cavalier-Smith, 2014). Cela a différencié *Cryptosporidium* des autres parasites étroitement apparentés à l'apicomplexe, tels que *Toxoplasma* et *Plasmodium*. En plus de la perte du génome de l'apicoplaste, ils ont perdu les gènes mitochondriaux et nucléaires codant pour de nombreuses protéines mitochondriales nécessaires à plusieurs voies métaboliques telles que la phosphorylation oxydative et l'oxydation des acides gras. Au lieu de cela, ils hébergent un «mitosome» dégénéré, qui est probablement le site des protéines d'assemblage d'agrégats, et des protéines pour la biosynthèse de plusieurs facteurs nécessaires au métabolisme du parasite (ubiquinone, coenzyme A...).

Par conséquent, les données moléculaires actuelles montrent que *Cryptosporidium sp* est plus proche des grégarines que des coccidies (Carreno et al., 1999 ; Templeton et al., 2010 ; Karanis et al., 2008 ; Zhang et al., 2009 ; Borowski et al., 2008, 2010 ; Hijjawi et al., 2010 ; Karanis et Aldeyarbi, 2011 ; Boxell, 2012 ; Koh et al., 2013, 2014 ; Huang et al., 2014 ; Clode et al., 2015 ; Aldeyarbi et Karanis, 2016a, 2016b ; 2016c ; Edwinston et al., 2016 ; Paziewska-Harris et al., 2016). *Cryptosporidium* appartenant à l'embranchement *Apicomplexa* a été récemment reclassé en tant que membre de la sous-classe de grégarine (Ryan et al., 2016).

Les Grégarinidia sont une sous-classe de protozoaires apicomplexa primitifs, habituellement considérés comme des parasites d'invertébrés, ayant pour caractéristiques :

- Mobilité par mouvements de reptation assurés par la formation de plis épicytaires ;
- Localisation d'abord intracellulaire (cellules épithéliales de l'intestin) puis extracellulaire ;

- Accolement aux cellules hôtes par un épimérite et alimentation par mésocytose
- Existence ou non d'une multiplication asexuée par schizogonie (synonyme : mérogonie) avec, dans ce cas de nombreuses schizogonies et un pouvoir pathogène élevé.
- En l'absence de schizogonies, les trophozoïtes donnent directement des gamétocytes.

### **I.2.2. Classification des espèces de *Cryptosporidium***

Les deux espèces les plus communément rencontrées (> 90%) sont *C. hominis* et *C. parvum*. Bien que la première espèce semble être principalement limitée à l'homme, la dernière compte un large éventail d'hôtes, dont la plupart des animaux d'élevage (Fayer, 2010 ; Xiao, 2010). D'autres espèces ont une plus forte spécificité d'hôte mais celle-ci n'est cependant pas stricte (Fayer, 2004 ; Appelbee *et al.*, 2005).

La nécessité d'identifier les espèces présentant des risques pour l'homme et pour les animaux, va motiver le réexamen de la structure des espèces au sein du genre *Cryptosporidium*. Particulièrement, les outils moléculaires comme la *Polymerase Chain Reaction* (PCR), la *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), le *Multilocus genotyping*, le séquençage, etc., ciblant des séquences précises du génome de *Cryptosporidium* ont aidé à clarifier la taxonomie du genre en validant l'existence de plusieurs espèces (Xiao *et al.*, 2004).

Au cours de la 6ème réunion « *Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Disease* » à l'Institut Pasteur à Paris en 2002, une session intitulée « la Taxonomie du genre *Cryptosporidium* » a eu lieu. L'objectif de cette session était de réviser les critères les plus couramment employés pour nommer les espèces de *Cryptosporidium*. Le consensus entre les chercheurs a été que, pour nommer des nouvelles espèces de *Cryptosporidium*, quatre conditions de base devaient être remplies :

- a) Une étude morphométrique des oocystes (taille, forme, structure des différents stades de développement).
- b) Une caractérisation génétique (analyses des séquences nucléotidiques de différents gènes).
- c) L'étude du spectre des hôtes naturels et l'analyse de la spécificité d'hôte naturelle ou expérimentale lorsque cela est possible.
- d) La conformité aux règles de l'institut « *International code of zoological nomenclature* » (Xiao *et al.*, 2004).

Toutefois, il est évidemment difficile de définir une nouvelle espèce sur tous ces critères à la fois. Cependant, en 2013, 26 espèces différentes de *Cryptosporidium* ont été décrites ; elles sont résumées dans le Tableau 2 (Chalmers *et* Katzer, 2013). Ces espèces de *Cryptosporidium* sont considérées actuellement comme valides selon les critères évoqués ci-dessus.

### **I.2.2.1. Espèces de *Cryptosporidium* chez les ruminants**

Les espèces de *Cryptosporidium* provoquent des diarrhées néonatales chez les animaux de ferme, le plus fréquemment chez les veaux et les agneaux (Tableau 2).

La présence de *Cryptosporidium spp.* a été mise en évidence dans les années 1970 chez les ruminants. Ceux-ci constituent le groupe d'espèces, parmi les mammifères, le plus concerné par la cryptosporidiose. Les espèces suivantes : *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. ryanae*, *C. hominis*, *C. xiaoi* et *C. ubiquitum* sont les principales espèces de *Cryptosporidium* isolées chez les ruminants domestiques (Xiao, 2010 ; Xiao *et* Feng, 2008). De manière exceptionnelle, d'autres espèces ou génotypes peuvent infecter les ruminants.

*Cryptosporidium parvum* a été la première espèce décrite en 1912 par Tyzzer. Cette espèce est une source commune d'infection chez les jeunes ruminants (Geurden *et al.*, 2008; Karanis *et al.*, 2007; MuellerDoblies *et al.*, 2008; Pritchard *et al.*, 2007; Pritchard *et al.*, 2008; Quilez *et al.*, 2008a , 2008b). *C. parvum* est la cause la plus fréquente de diarrhée chez le veau et se retrouve principalement chez les veaux pré-sevrés (Amer *et al.*, 2013). En effet, cette espèce a été rencontrée en Algérie, en majorité chez une population de jeunes veaux à côté d'une minorité de *C. bovis* et *C. andersoni* (Baroudi *et al.*, 2017 ; Benhouda *et al.*, 2017 ; Ouakli *et al.*, 2018).

En outre, *Cryptosporidium parvum* possède un pouvoir zoonotique d'où son importance en santé publique (Fayer, 2010 ; Xiao, 2010).

*Cryptosporidium andersoni* est une espèce présentant des oocystes de grande taille (Carey *et al.*, 2004), isolée chez 5% de génisses laitières âgées de 1 à 2 ans, infectant principalement les cellules épithéliales de l'abomasum (Lindsay *et al.*, 2000). Elle est rarement retrouvée chez les jeunes de moins de 2 mois mais l'espèce serait responsable d'un aspect chronique de la maladie chez des bovins plus âgés (Ryan *et al.*, 2005). Cependant son pouvoir pathogène serait faible, de même que son pouvoir zoonotique (Lindsay *et al.*, 2000 ; Xiao, 2010).

*Cryptosporidium bovis* et *C. ryanae* sont des parasites adaptés au bétail. En effet, les hôtes majeurs sont les bovins tandis que les ovins sont des hôtes mineurs et les caprins très rarement

atteints (Xiao, 2010). Les infections à *C. ryanae*, ont été signalées avec des taux de 60% dans certaines populations du monde (Santin *et al.*, 2008). Tandis que, les taux sont plus élevés par l'infection à *C. bovis* (70% à 80%) et sont généralement observés chez les veaux âgés de 12 à 14 semaines (Santin *et al.*, 2008 ; Silverlas *et al.*, 2010). *Cryptosporidium ryanae* et *C. bovis* sont le plus souvent présentes chez les animaux sevrés (Santin *et al.*, 2004). L'infection par ces deux espèces est couramment asymptomatique et le pouvoir zoonotique reste faible (Fayer *et al.*, 2008 ; Chartier et Paraud, 2010).

*Cryptosporidium hominis*, anciennement connue sous le nom de *C. parvum* génotype 1 ou H ou génotype humain, atteint principalement les humains et dans de très rares cas les ruminants (Carey *et al.*, 2004). En effet, cette espèce a été identifiée dans 5 régions en France chez des bovins symptomatiques et asymptomatiques, un cinquième des prélèvements étaient infectés de *C. hominis* (Razakandrainibe *et al.*, 2018).

*Cryptosporidium xiaoi*, anciennement dénommée *Cryptosporidium* génotype « bovis-like », est rencontrée chez le mouton à diverses périodes de la vie (Fayer et Santin, 2009 ; Paraud et Chartier, 2012). Dans de récents travaux, cette espèce a été trouvée chez des agneaux et des chevreaux diarrhéiques en Algérie (Baroudi *et al.*, 2018). Elle infecte très rarement les humains et les signes cliniques liés à l'infection chez les animaux ne seraient pas importants (Fayer et Santin, 2009). Cependant, une étude de Diaz *et al.* (2010) montre qu'elle pourrait être responsable de diarrhée chez des chevreaux.

*Cryptosporidium ubiquitum*, autrefois connue sous le nom de *Cryptosporidium* génotype « cervine » (Fayer *et al.*, 2010), a été rencontrée aussi bien chez des ruminants domestiques et sauvages que chez les humains et d'autres espèces animales à travers le monde. Li *et al.* (2014) ont révélé l'aspect zoonotique de ce parasite. D'après certaines études, elle serait l'espèce prédominante chez le mouton dans certains pays comme la Belgique, la Norvège, l'Australie, les Etats-Unis et la Chine (Paraud et Chartier, 2012). Cependant, ce fait a été remis en cause par des études menées en Espagne et en Grande Bretagne où *C. parvum* est apparu être le pathogène dominant chez les agneaux (Xiao et Fayer, 2008 ; Xiao, 2010 ; Diaz *et al.*, 2015). Néanmoins, en Espagne, la présence de *C. ubiquitum* et *C. xiaoi* reste fréquente chez le cheptel ovin (Snak *et al.*, 2017).

### **I.2.2.2. Espèces de *Cryptosporidium* chez les autres animaux**

Le genre *Cryptosporidium* est capable d'infecter l'homme et plus de 150 mammifères différents (Fayer, 2004), mais il a été aussi décrit chez des oiseaux, des reptiles et des poissons (Ryan, 2010 ; Ryan *et al.*, 2014 ; Certad *et al.*, 2019).

La cryptosporidiose des oiseaux, causée par *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi* et *Cryptosporidium galli*, a été décrite pour la première fois par Slavin chez des dindes en 1955. *Cryptosporidium meleagridis* et *C. baileyi* provoquent une atteinte des intestins et de la bourse de Fabricius, cependant elles diffèrent par la taille de leurs oocystes. A la différence de ces 2 espèces, *C. galli* n'affecte que le proventricule (Xiao *et Fayer*, 2008). En Algérie, l'espèce *C. meleagridis* a été retrouvée chez le dindon ainsi que chez le poulet (Baroudi *et al.*, 2013 ; Laataamna *et al.*, 2017).

*Cryptosporidium suis*, observée uniquement chez le porc, a été détectée en Australie, en Norvège, en Irlande du Nord, au Danemark et en Espagne (Hamnes *et al.*, 2007 ; Langkjaer *et al.*, 2007 ; Suarez-Luengas *et al.*, 2007 ; Xiao *et al.*, 2006). Une autre espèce de *Cryptosporidium*, *C. scrofarum* a été détectée chez des porcs domestiques, mais son taux de prévalence est inférieur à 5% (Garcia-Presedo *et al.*, 2013).

*Cryptosporidium canis*, qui était auparavant exclusivement reconnu comme un génotype canin, est réputé à infecter les chiens domestiques dans le monde entier (Fayer *et al.*, 2001) est maintenant considéré comme zoonotique. Cette espèce a été isolée chez des enfants symptomatiques dans des ménages avec des chiens excréant des oocystes (Xiao *et al.*, 2007).

*Cryptosporidium pestis* ayant une répartition mondiale, a été isolée chez des veaux âgés de moins de 2 semaines (Santin *et al.*, 2004).

*Cryptosporidium fayeri* et *C. macropodum* sont couramment détectés en Australie et infectent des marsupiaux, notamment des kangourous, des wallabies et des koalas (Power *et Ryan*, 2008 ; Ryan *et al.*, 2008). Des chats domestiques asymptomatiques infectés par *C. felis* ont également été documentés dans le monde entier (Ballweber *et al.*, 2009 ; Fayer *et al.*, 2006a).

Les principales espèces rencontrées chez les rongeurs sont *C. parvum*, *C. muris* et *C. génotype souris* (Ong *et al.*, 2002 ; Morgan *et al.*, 1999). Une transmission de *C. muris* entre bovin et souris est soupçonnée mais n'a pu être confirmée par caractérisation génétique (Pavlassek *et al.*, 1983). En revanche, l'espèce *C. muris* a été bien retrouvée chez la souris (Sato *et*

*al.*, 2003). La présence de *C. muris* a été aussi signalée chez le phoque (*Phoca hispida*) du grand nord québécois (Santin *et al.*, 2005).

Un nouveau génotype *C. skunka* été identifié chez le raton laveur (*Procyon lotor*) en Amérique. Ceci peut constituer une source de contamination chez les ruminants et l'homme (Lesnianska *et al.*, 2016).

### **I.2.2.3. Espèce *Cryptosporidium* chez l'homme**

*Cryptosporidium hominis* (anciennement *C. parvum* type 1) est l'espèce la plus communément rencontrée chez l'humain, responsable de près de 97% des cas de Cryptosporidiose selon l'équipe de Pedraza-Diaz en 2001, et 40% selon l'équipe d'Ong en 2002. *Cryptosporidium parvum* (anciennement type 2) se retrouve aussi chez l'homme. Ces deux espèces principales *C. hominis* et *C. parvum*, provoquent d'importants syndromes diarrhéiques au sein de la communauté dans le monde entier. Bien que *C. hominis* et *C. parvum* soient considérés comme les principaux agents de la Cryptosporidiose humaine, on sait que jusqu'à 20 espèces distinctes sont à l'origine d'infections humaines graves à modérées (Slapeta, 2013 ; Ryan *et al.*, 2014).

Par ailleurs, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis* et *C. cuniculus* sont associées aux maladies humaines. D'autres espèces de *Cryptosporidium* sont également signalées chez l'homme tels que *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. fayeri*, *C. muris*, *C. scrofarum*, *C. suis*, *C. tyzzeri*, *C. ubiquitum* et *C. viatorum* (Chalmers et Katzer, 2013).

## **I.3. Biologie du parasite**

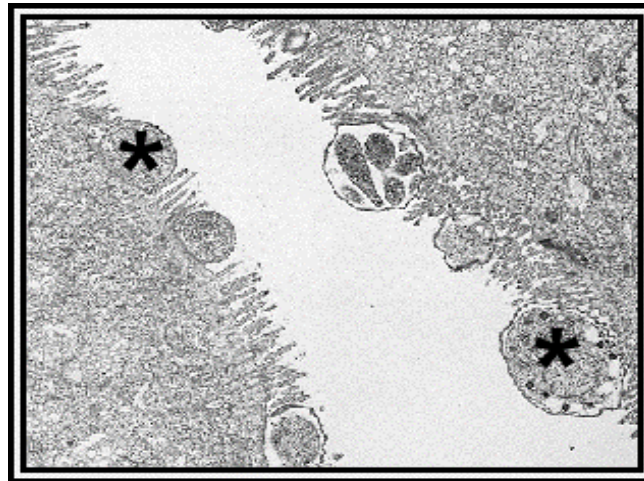
*Cryptosporidium* est un protozoaire qui infecte le tractus gastro-intestinal et les poumons. Il a un cycle de vie complexe comprenant des phases asexuées et sexuées. La prolifération et la différenciation se déroulent dans une vacuole parasitophore unique sous la bordure en brosse des cellules de l'hôte mais en dehors de leur cytoplasme (Leitch et He, 2012).

La forme infectante est l'oocyste sporulé. Ce stade est très important pour la dissémination, la survie et l'infectivité du parasite. Les oocystes sont très résistants dans le milieu extérieur dans lequel ils sont excrétés.

### **I.3.1. Morphologie du parasite**

Le parasite a une forme sphérique à elliptique et sa taille varie de 4 à 6 µm de diamètre ce qui est relativement petit par rapport aux autres coccidies (O'Donoghue, 1995). Il occupe une

position dans la cellule épithéliale très particulière, en zone apicale, jamais en profondeur. Les stades du cycle intracellulaire apparaissent en coupe histologique sous forme de petits corps basophiles donnant à la bordure en brosse un aspect granuleux (Figure 1).



**Figure 1 :** Photographie prise au microscope électronique montrant plusieurs stades de *Cryptosporidium* (deux marqués par une croix) dans l'épithélium intestinal d'un mouton (Ohio State University, 2001)

### **I.3.2. Cycle de développement**

Dès 1907, le parasitologue Tyzzer décrivait déjà en partie les différentes étapes du cycle biologique de *C. muris* et les morphologies adoptées par le parasite (Tyzzer, 1907). Les progrès dans le domaine de la microscopie ont permis de détailler les étapes du cycle biologique du parasite. *Cryptosporidium sp.* est un parasite ayant un cycle monoxène, c'est-à-dire que la totalité de son cycle biologique est réalisé chez un seul et même hôte. Le cycle se déroule dans les cellules épithéliales de l'intestin ou du tractus gastro-intestinal plus généralement, cependant des localisations erratiques sont possibles comme l'arbre respiratoire, la vésicule biliaire, le foie ou le pancréas (Fayer, 2004).

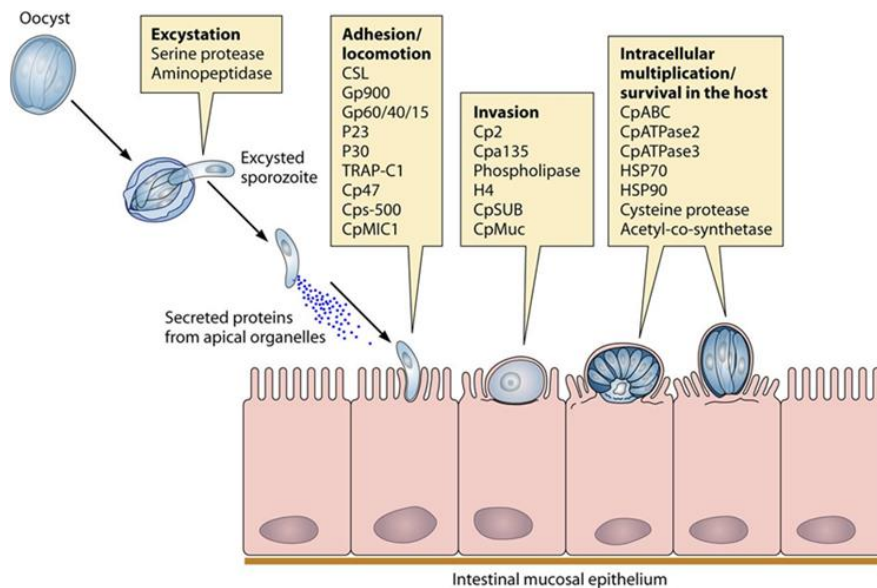
La période pré-patente, c'est-à-dire la durée s'écoulant entre le moment de l'ingestion des oocystes et leur excrétion, est comprise entre 3 et 5 jours mais elle peut durer de 2 à 14 jours (O'donoghue, 1995 ; Fayer, 2004).

La période patente, correspondant à la durée totale d'excrétion des oocystes, est comprise entre quelques jours et quelques mois. Cette grande variabilité est fonction de

l'immunocompétence de l'hôte et de l'espèce de *Cryptosporidium* incriminée (O'donoghue, 1995).

Le cycle biologique de *Cryptosporidium* se déroule en 6 étapes majeures : excystation, mérogonie, gamétogonie, fertilisation, formation de la paroi des oocystes et sporogonie (Current, 1985).

La contamination est réalisée par l'ingestion d'oocystes. Leur excystation, déclenchée par la température, le pH (Hijjawi *et al.*, 2001), ainsi que les sels biliaires et d'autres facteurs locaux (O'Hara et Chen, 2011), libère les sporozoïtes infestant la lumière du tractus gastro-intestinal. Les sporozoïtes libres vont alors infecter les cellules épithéliales de la bordure en brosse intestinale en deux étapes (l'intervention de plusieurs facteurs antigéniques et récepteurs membranaires a été démontrée) : attachement à la membrane plasmique de la cellule épithéliale puis envahissement du parasite par invagination de la membrane plasmique, qui entoure le parasite et forme la vacuole parasitophore (Figure 2) (Chen et Larusso, 2000 ; Bouzid *et al.*, 2013).



**Figure 2** : Schéma représentatif de la différenciation du sporozoïte en trophozoïte.  
(Bouzid *et al.*, 2013)

Ce mécanisme permet au parasite d'avoir un développement intracellulaire mais extra-cytoplasmique, ainsi protégé du contenu cellulaire (Figure 3). La communication entre la cellule hôte et le parasite est réalisée via l'organelle d'attachement, ou organelle nourricier,

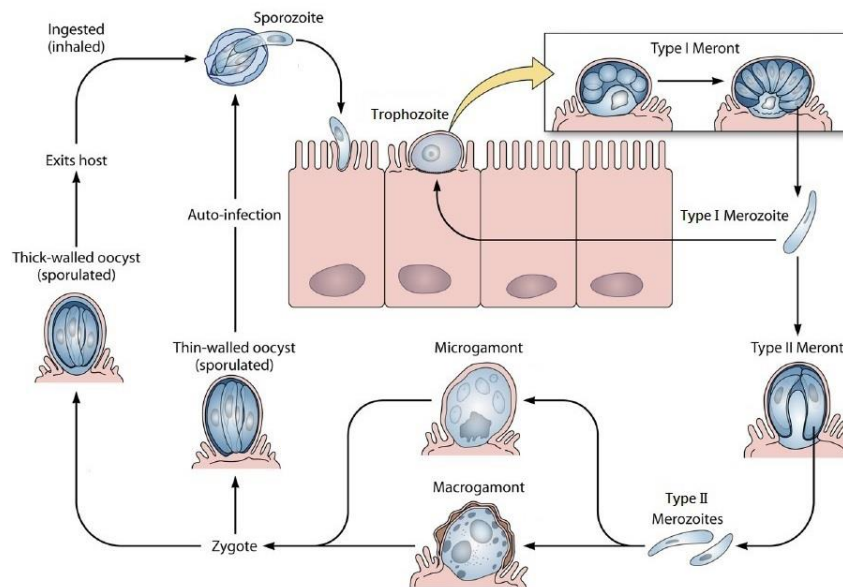


qui permet au micro-organisme de se nourrir des nutriments de la cellule hôte (Spano *et* Crisanti, 2000).



**Figure 3:**Développement apical de *Cryptosporidium parvum* dans les entérocytes (MET).  
(ANOFEL, 2016).

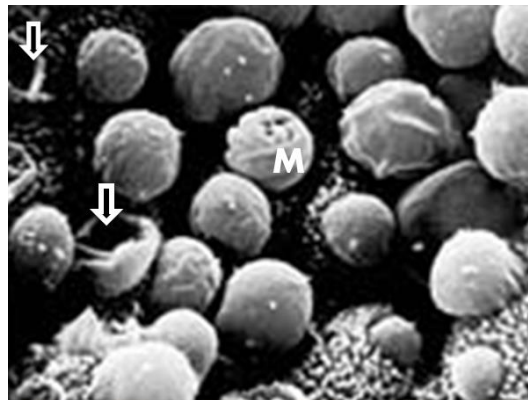
L'oocyste est le seul stade parasite retrouvé dans l'environnement. Après son ingestion par l'hôte, le cycle se déroule en différentes étapes illustrées et décrites selon le schéma de la Figure 4 : Le sporozoïte va réaliser son cycle de reproduction et les sporozoïtes se différencient en trophozoïtes (Bouzzid *et al.*, 2013).



**Figure 4:** Représentation schématique du cycle de développement biologique de *Cryptosporidium sp.* (Bouzzid *et al.*, 2013).

Ces derniers restent localisés dans la vacuole parasitophore, où se déroule la multiplication asexuée du parasite (mitose) ; la mérogonie ou schizogonie. Elle conduit à la formation d'un

méronte de type I contenant 6 à 8 mérozoïtes de type I (Leitch *et* He, 2012) libérés par éclatement du méronte et qui pénètrent dans les entérocytes adjacents. Ils vont alors former de nouveaux mérontes de type I (auto-infestation) ou des mérontes de type II (Current *et* Garcia 1991). Ces mérontes de type II vont initier la reproduction sexuée en produisant quatre mérozoïtes de type II qui seront libérés hors de la vacuole parasitophore. Les mérozoïtes de type II vont enfin se différencier en microgamontes (mâle) et macrogamontes (femelle) dans une cellule épithéliale voisine : c'est la gamétogonie. Jusqu'à 16 microgamètes sont produits par le microgamonte alors que le macrogamonte reste mono-nucléé. Les microgamètes sont responsables de la fécondation du macrogamonte, qui aboutira à la formation d'une cellule diploïde, le zygote (Chalmers *et* Davies, 2010). Il va ensuite subir un processus de sporogonie, apparenté à une méiose, aboutissant à la formation de quatre sporozoïtes nus, contenus dans un oocyste. Les différentes étapes du développement peuvent être observées simultanément à la surface des entérocytes (Figure 5).



**Figure 5 :** Différents stades de développement de *Cryptosporidium* à la surface des microvillosités intestinales. Un méronte de type I est représenté par la lettre M, les flèches indiquent les cratères des vacuoles vides après la sortie des parasites. (Current *et* Garcia, 1991).

Les particularités du cycle de *Cryptosporidium* par rapport à celui des autres coccidies consistent en l'excrétion d'oocystes directement infectants. Le recyclage des mérozoïtes de type I et la formation d'oocystes à paroi fine (20%) qui désenkystent immédiatement *in situ* (non éliminés avec les selles), entretiennent l'infection. Ces particularités expliqueraient le maintien de l'infection chez les sujets immunodéprimés (Current *et* Garcia 1991).

### **I.3.3. Survie et résistance dans le milieu extérieur**

L'oocyste est la forme de résistance par excellence du parasite. Ces oocystes sont très résistants dans le milieu extérieur, que ce soit dans l'eau, le sol ou bien les matières fécales. Ils peuvent demeurer infectieux pendant une longue période sans pour autant être capables de se multiplier. Leur survie dans les différents substrats explique toute la difficulté du traitement et de la désinfection de ceux-ci.

La détermination de la viabilité et de l'infectiosité des oocystes est au préalable nécessaire afin d'être capable d'évaluer la résistance des oocystes dans les différentes conditions expérimentales ou naturelles. La viabilité est la capacité pour l'oocyste à libérer les 4 sporozoïtes qu'il contient. Le pouvoir infectieux (ou infectiosité) est la capacité des sporozoïtes libérés à pénétrer dans les entérocytes de l'hôte. La mesure de la viabilité des oocystes repose le plus souvent sur la mise en évidence du dékystement des oocystes ou sur la coloration des acides nucléiques. Quant à la recherche d'infectiosité, elle se détermine *in vivo* en quantifiant le nombre d'animaux développant une maladie pour une dose de pathogènes donnés (Benamrouz *et al.*, 2012) ou quantifier des oocystes inoculés par voie orale à des souris. *In vitro*, l'infectiosité se définit à partir du nombre de forme d'infectivité (forme intracellulaire) observée sur des cultures cellulaires par rapport à un témoin (Rapport Anses, 2002 ; King *et al.*, 2011).

Par ailleurs, les oocystes peuvent rester viables et infectieux pendant plusieurs mois dans l'eau à des températures comprises entre 0 et 30°C et jusqu'à un an dans de l'eau de mer (Rapport Anses, 2002). Ainsi pour des températures de 0 à 20°C, les oocystes demeurent infectieux pendant 6 mois, ce chiffre passant à 3 mois pour des températures de 25 et 30°C et à 1 semaine pour une température de 35°C (Fayer, 2004). Cette résistance environnementale a ses limites. Ainsi, les températures extrêmes comme la chaleur ou la congélation accélèrent la destruction des oocystes (Fayer *et al.*, 1996 ; Fujino Matsui *et al.*, 2003). Les oocystes sont aussi très sensibles à la dessiccation : selon des études différentes seuls 3% restaient viables après 2h et seulement 5% après 4h à température ambiante (King *et al.*, 2006). Cependant, lorsqu'ils sont enfouis dans le sol ou en milieu aqueux, les oocystes peuvent demeurer actifs et conserver leur pathogénicité pendant plusieurs mois selon la température ambiante (Peeters *et al.*, 1989 ; Naciri *et al.*, 1999). Par exemple, la viabilité des oocystes peut durer 12 mois dans l'eau à +4 °C (Peeters *et al.*, 1989).

En outre, les espèces du genre *Cryptosporidium* sont relativement résistantes aux conditions adverses de l'environnement en comparaison avec les autres protozoaires. En effet, les oocystes de *Cryptosporidium* sont très résistants à la plupart des désinfectants et des antiseptiques.

L'utilisation du chlore à des concentrations usuelles pour le traitement des équipements d'eau et des piscines n'a que peu d'impact sur la viabilité des oocystes (Fayer, 2004 ; Jenkins *et al.*, 2010). De plus, l'efficacité du chlore est diminuée par la présence de matières fécales où se trouvent le plus souvent les oocystes (Tzipori et Widmer, 2008).

En 1999, Wilson et Margolin ont confirmé que ni le glutaraldéhyde 2,5 %, ni le phénol 10 % pas plus que la providone-iodine 10 % ne sont efficaces pour l'élimination des oocystes (Lucio-Foster, 2010). En 1996, Fayer et ses collaborateurs ont testé l'efficacité de la désinfection par certains gaz, ainsi, l'ammoniac, l'oxyde d'éthylène et le bromure de méthyle (ou bromométhane) ont une excellente efficacité selon cette étude (Lake *et al.*, 2007). L'oxyde d'éthylène, utilisé dans les hôpitaux pour la stérilisation du matériel, est potentiellement carcinogène (Harari *et al.*, 1986). Le bromure de méthyle, utilisé comme antiparasitaire en agriculture, est considéré nocif pour l'environnement (destruction de la couche d'ozone) ainsi que pour les humains (cancers de la peau) (Kourenti *et al.*, 2007). Le traitement de l'eau de consommation par les produits chlorés, comme pratiqué pour certains processus de traitement des eaux, n'est pas suffisant pour l'élimination complète du pouvoir infectant (Tzipori et Widmer, 2008).

L'ozonation et le traitement aux UV sont les plus efficaces pour la désinfection de l'eau (LeChevallier *et al.*, 1991). Une concentration aussi faible que 0,59 mg d'ozone par litre d'eau suffit à réduire de 96 % le nombre de souris qui produisent des oocystes, souris inoculées à raison de  $10^5$  oocystes/mL (LeChevallier *et al.*, 1991). Mais l'ozonation serait moins efficace à température basse (Naciri, 1992). Un autre obstacle pour l'utilisation à grande échelle de l'ozone est la formation de bromate lorsque l'eau contient du bromide. Il s'agit d'un produit carcinogène (Naciri, 1992). Une dose faible de rayons ultra-violets peut inactiver 99,9 % des oocystes de *Cryptosporidium* (Naciri, 1992). Le dioxyde de chlore a également montré des effets intéressants (LeChevallier *et al.*, 1991). Une concentration de 0,46 mg de dioxyde de chlore par litre d'eau suffit à réduire de plus de 93 % le nombre de souris qui produisent des oocystes.

Cependant, les cellules de *Cryptosporidium* ont la capacité de se déformer pour traverser des pores de dimension inférieure à leur diamètre (Smith et Rose, 1998). L'utilisation de filtre de sable réduit le nombre d'oocystes sans les éliminer totalement (Tzipori et Widmer, 2008).

### **I.4. Génétique de *Cryptosporidium***

L'ère de la recherche génomique sur *Cryptosporidium* a débuté à la fin des années 90. En effet, une collection de l'ensemble des données séquencées publiées a reconstitué environ 2,5% du génome de *C. parvum* (Liu *et al.*, 1999), suivie du premier séquençage d'une banque d'ADNc de *C. parvum* qui fournissait un aperçu du génome de *Cryptosporidium*. En raison de plusieurs épidémies notoires, notamment l'épidémie de Milwaukee en 1993 et son importance chez les patients infectés par le VIH, un consortium de trois universités américaines (Université de Minnesota, Université du Commonwealth de Virginie et Université de Tufts) a lancé le premier projet de séquençage du génome complet de *Cryptosporidium*. Le génome de *Cryptosporidium* aurait une taille totale d'environ 9,1 Mb et comprenait huit chromosomes allant de 0,9 à 1,4 Mb. Il contenait environ 31% de GC, contre 19,4% et 52% respectivement chez *Plasmodium* et *Toxoplasma*. Plus récemment, un projet de séquençage complet du génome de *C. parvum* et *C. hominis* a été entrepris pour améliorer la compréhension de la structure génétique de la population de *Cryptosporidium* ce qui a confirmé sa taille et la présence de 4000 gènes (Abrahamsen *et al.*, 2004 ; Xu *et al.*, 2004).

Cependant, le genre *Cryptosporidium* a connu un impact significatif sur l'évolution de son génome suite à un transfert de gènes. Selon la littérature, cela a eu lieu par un transfert latéral de gènes provenant d'un autre organisme, en particulier de procaryotes, soit intracellulaire par endosymbiose chez les eucaryotes. Contrairement aux autres parasites Apicomplexa, *Cryptosporidium* a acquis de nombreux gènes transférés latéralement (Sateriale *et* Striepen, 2016). Une étude récente utilisant des approches phylogénomiques a identifié 31 gènes acquis via une endosymbiose ayant une origine procaryotique (Huang *et al.*, 2004). Pour s'adapter à l'environnement anaérobie de l'intestin de l'hôte, *Cryptosporidium* a acquis horizontalement plusieurs gènes, dont l'enzyme lactate déshydrogénase, afin de générer le dinucléotide adénine nicotinamide (NAD). *Cryptosporidium* a également obtenu l'enzyme tryptophane synthétase B (TrpB) d'une protéobactérie, ce qui lui permet de produire du tryptophane. Lorsque ce dernier manque au moment où des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) sont régulées à la hausse en réponse à une infection à

*Cryptosporidium* (Chen *et al.*, 1993 a ; Chen *et al.*, 1993b ; Huang *et al.*, 2004 ; You *et al.*, 1998).

Toutefois, *Cryptosporidium* qui n'a pas la capacité à synthétiser les nucléotides et dépend donc beaucoup de son hôte pour récupérer des purines et des pyrimidines, via deux gènes transférés latéralement, l'inosine 5'-monophosphate déshydrogénase (IMPDH) et la thymidine kinase (TK) ayant comme ancêtre d'origine des protéobactéries (Striepen *et al.*, 2004). Ainsi, ces gènes transférés latéralement influencent, non seulement, l'adaptation de *Cryptosporidium* à un environnement anaérobie, facilitent la récupération des nucléotides de l'hôte infecté et échappent aux restrictions métaboliques imposées par l'immunité de l'hôte, mais introduisent également une hétérogénéité génomique dans *Cryptosporidium*. Cette hétérogénéité peut maintenant être exploitée pour identifier des marqueurs spécifiques à une espèce afin de comprendre les origines de la divergence génétique et de la recombinaison de *Cryptosporidium* chez des isolats sauvages qui affectent une gamme d'hôtes et un potentiel de propagation épidémique.

La connaissance du génome complet de *C. parvum* (Abrahamsen *et al.*, 2004) et de *C. hominis* (Xu *et al.*, 2004) et leur publication dans la base de données de CryptoDB.org (Puiu *et al.*, 2004) ont été importants pour l'identification de *Cryptosporidium* spp.

## **CHAPITRE II : ETUDE DE LA CRYPTOSPORIDIOSE**

### **II.1. Cryptosporidiose chez les ruminants**

*Cryptosporidium* est décrit chez de nombreux animaux, aussi bien, domestiques, sauvages qu'en captivité. Les animaux les plus jeunes semblent être les plus susceptibles et les plus touchés par la maladie (Ramirez *et al.*, 2004).

L'intérêt pour l'infection due à *Cryptosporidium* chez les ruminants s'est intensifié à mesure que les cas d'infections humaines et animales ont augmenté, non seulement parce que les animaux ont été considérés comme des réservoirs, mais également parce que l'infection par ce protiste peut avoir des répercussions économiques chez ces animaux de rente (De Graaf *et al.*, 1999 ; Ramirez *et al.*, 2004).

En effet, c'est le groupe d'espèces parmi les Mammifères le plus concerné par la cryptosporidiose. Les élevages bovins, ovins et caprins sont les plus touchés par la maladie (Xiao, 2007).

### **II.1.1. Aspects cliniques chez les bovins**

Chez les bovins, comme pour la majorité des espèces animales sensibles, la maladie causée par *C. parvum* est surtout observée chez les jeunes âgés de 4 à 30 jours alors que le système immunitaire est encore relativement immature. Au sein des troupeaux laitiers, le parasite fait partie du complexe de la diarrhée néonatale qui occasionne d'importantes mortalité et morbidité (Naciri *et al.*, 1999). Les pertes économiques pour l'éleveur sont associées à la mortalité, au retard de croissance, aux mesures de prévention mises en place et au coût des traitements instaurés (De Graaf *et al.*, 1999 ; Sanford *et* Josephson, 1982). De nombreux veaux peuvent être exposés à *C. parvum* dès les premières heures de vie (Naciri *et al.*, 1999 ; Faubert *et* Litvinski, 2000) et ainsi excréter les parasites à partir de 3 ou 4 jours d'âge (Snodgrass *et al.*, 1980 ; Xiao *et al.*, 1994 ; Quilez *et al.*, 1996; Mohammed *et al.*, 1999).

De plus, il a été montré que l'excrétion fécale de *Cryptosporidium sp* chez la vache porteuse asymptomatique est plus importante lors du stress associé au vêlage, augmentant d'avantage l'exposition du nouveau-né (Faubert *et* Litvinski, 2000). Cependant, les adultes n'excrètent pas nécessairement les génotypes de *Cryptosporidium* qui infectent les jeunes veaux (Wade *et al.*, 2000). On rapporte habituellement une forte morbidité associée à une mortalité modérée à élevée (Faubert *et* Litvinski, 2000). Une étude de Heine et ses collaborateurs a montré que *Cryptosporidium* à elle seule peut produire les signes cliniques suivants : anorexie, dépression, diarrhée et fièvre (Heine *et al.*, 1984). Des rechutes sont possibles après rémission apparente (Tzipori *et al.*, 1983). Les adultes et parfois les jeunes peuvent excréter le protozoaire tout en demeurant porteurs asymptomatiques (Villeneuve *et al.*, 2003). Les veaux peuvent également être porteurs asymptomatiques lors d'infection à *C. muris* qui est une espèce différente de *C. parvum* (Kvac et Vitovec, 2003). La virulence, la pathogénicité, l'antigénicité, la sensibilité aux différents médicaments ainsi que le caractère infectieux peuvent être influencés par la variabilité phénotypique entre les différentes souches de *Cryptosporidium* (Pozio *et al.*, 1992 ; Thompson et Lymberry, 1996). Ainsi, un individu souffrant de cryptosporidiose peut montrer des signes cliniques légers ou sévères en fonction du phénotype (virulence et pathogénicité) du parasite (Thompson et Lymberry, 1996). La guérison dépend de la réponse au traitement qui peut être bonne ou mauvaise selon les protéines exprimées par le microorganisme (Thompson et Lymberry, 1996). La nature des protéines d'un organisme change en fonction du phénotype exprimé ce qui peut influencer la réponse immunitaire de l'hôte qui est basée essentiellement sur la reconnaissance des

protéines antigéniques retrouvées à la surface des oocystes (Thompson et Lymberry, 1996). Les plus importants signes et syndromes liés à la cryptosporidiose chez les bovins sont les suivants :

### **II.1.1.1. Diarrhée et douleur abdominale**

Une diarrhée aqueuse puis mucoïde jaunâtre intermittente, à l'odeur putride caractéristique, persiste 5 à 12 jours, avec une moyenne de 7 jours (Villeneuve *et al.*, 2003 ; Sanford et Josephson, 1982). Un dos arrondi en raison de la douleur abdominale fait souvent partie des signes cliniques (Naciri *et al.*, 1999). La sévérité et la durée varient considérablement d'un individu à l'autre (Fayer *et al.*, 1998). Certains auteurs ont montré une corrélation significative entre la présence de diarrhée et l'excrétion de *Cryptosporidium* (Naciri *et al.*, 1999 ; Wade *et al.*, 2000 ; Castro-Hermida *et al.*, 2002) alors que d'autres n'arrivaient pas aux mêmes conclusions (Ruest *et al.*, 1998 ; Huetink *et al.*, 2001). Selon une étude de Wade *et al.* (2000), un animal diarrhéique a 36,5 fois plus de chance d'être excréteur de *C. parvum* qu'un animal en bonne santé. En revanche, un animal normal a 2 fois plus de chances d'excréter *C. muris* qu'un animal diarrhéique. Cela pourrait s'expliquer par le fait que *C. muris* est faiblement pathogène (porteurs asymptomatiques la plupart du temps) chez les bovins et qu'elle n'est pas l'espèce à suspecter lors d'épisodes de diarrhée (Anderson *et al.*, 1987).

### **II.1.1.2. Déshydratation et perte d'électrolytes**

La déshydratation et la perte d'électrolytes sont les conséquences directes de la perte importante d'eau par malabsorption intestinale lors de diarrhée. Naciri et ses collaborateurs rapportent 11,8% (n=153) de veaux de boucherie déshydratés de façon importante lors de cryptosporidiose (pli de peau persistant au-delà de 30 secondes, yeux enfoncés dans les orbites et muqueuses sèches). Cette étude révèle également l'existence d'un décalage entre le moment de la diarrhée, qui se produit autour du troisième jour d'observation, et celui de la déshydratation qui survient plutôt vers le quatorzième jour (Naciri *et al.*, 1999).

Des déséquilibres électrolytiques (Na, Cl, K, Ca et P) ainsi que des variations du pH sanguin sont à prévoir lors de diarrhées importantes s'étalant sur plusieurs jours (Villeneuve *et al.*, 2003).

### **II.1.1.3. Diminution de la production laitière**

*Cryptosporidium muris* serait responsable d'une diminution significative de la production laitière (Anderson *et al.*, 1987). Esteban et Anderson (1998) ont montré une diminution de



13% de lait en moins, entre 70 à 149 jours de lactation, par rapport aux vaches non porteuses. L'espèce *Cryptosporidium muris*, découverte d'abord chez les rongeurs, infecte principalement les glandes de l'abomasum des bovins ce qui n'entraîne pas de signes cliniques décelables. Cependant, la production d'acide chlorhydrique est retardée ce qui ralentit la digestion stomacale des protéines. Selon Anderson (1998), ce phénomène pourrait expliquer la baisse de production laitière chez les vaches portant ce parasite et qu'il est plus important d'éviter le contact de l'eau de surface par des fèces contaminées pour éviter la baisse de production laitière.

### **II.1.2. Aspects cliniques chez les petits ruminants (ovins et caprins)**

Chez les petits ruminants, l'infection s'installe chez les animaux âgés de 5 à 20 jours, très sensibles à la maladie (Paraud et Chartier, 2012). En plus de la diarrhée (de consistance molle à liquide, jaunâtre), on peut noter de l'abattement, de l'anorexie, de la dépression, un retard significatif de la croissance ainsi que de la douleur abdominale. Le tout est accompagné d'une importante excrétion d'oocystes via les fèces (Martin-Gome *et al.*, 2005). La gravité de la diarrhée est généralement corrélée à l'intensité de cette excrétion fécale d'oocystes (les petits ruminants en diarrhée peuvent excréter entre  $10^6$  et  $10^8$  opg) (Fayer *et al.*, 1998 ; Chartier, 2002 ; Trotz Williams *et al.*, 2005, 2007 ; Paraud *et al.*, 2009).

La diarrhée dure de 3 à 5 jours voire parfois deux semaines dans les cas plus sévères (De Graaf *et al.*, 1999a). L'excrétion d'oocystes atteint son maximum 5 à 6 jours post-inoculation puis diminue rapidement entre 10 et 15 jours (De Graaf *et al.*, 1999). La quantité d'oocystes excrétés est corrélée à la sévérité de la diarrhée chez le chevreau, mais ce n'est pas le cas chez l'agneau. En revanche, une étude a montré que la probabilité d'observer de la diarrhée était plus élevée chez des agneaux excrétaient des oocystes que chez ceux qui n'en excrétaient pas (Paraud et Chartier, 2012). Chez le chevreau, la morbidité peut atteindre 80 à 100% et la mortalité peut dépasser 50% (Paraud et Chartier, 2012).

En effet, la diarrhée provoquée par *Cryptosporidium* peut être plus grave chez les chevreaux que chez les veaux. L'équipe de Johnson rapporte un épisode de cryptosporidiose fulgurant dans une ferme où, malgré les soins prodigués, 238 caprins âgés de 2 jours à plus d'un an sont mortes (Johnson *et al.*, 1999). La morbidité chez les jeunes était près de 100 % (Johnson *et al.*, 1999).

Selon plusieurs études, les symptômes décrits sont surtout observés en présence de *C. parvum*. Certaines espèces retrouvées chez les bovins (*C. ryanae* et *C. andersoni*), les ovins et

les caprins (*C. ubiquitum*) sont cependant moins retrouvées chez des animaux malades. Ces données présentent ainsi les différences phénotypiques existantes entre les espèces de *Cryptosporidium spp.* Et réaffirment l'intérêt des outils moléculaires qui permettent l'identification de celles-ci pour approfondir les connaissances sur la cryptosporidiose des ruminants.

### **II.2. Association de la Cryptosporidiose et les autres entéropathogènes**

Une plus forte mortalité est généralement associée à une infection concomitante avec d'autres agents pathogènes appartenant au complexe des diarrhées néonatales comme *Escherichia coli*, les rotavirus de même que les coccidies (Snodgrass *et al.*, 1980 ; Naciri *et al.*, 1999 ; Villeneuve *et al.*, 2003).

Olson *et al.* (1997) rapportent une prévalence de 20% de *Cryptosporidium* chez 104 bovins adultes au Canada en 1997, alors qu'aucun n'a de signes de diarrhée (porteurs asymptomatiques). Mais d'autres aspects du fumier peuvent être corrélés avec l'excrétion du parasite (fèces molles ou liquides avec présence de mucus et de sang) (Castro-Hermida *et al.*, 2002a ; Castro-Hermida *et al.*, 2002b). Cependant, la diarrhée causée par *Cryptosporidium parvum* seule n'entraîne pas l'apparition de sang dans les fèces en raison de la localisation très superficielle du parasite (Castro-Hermida *et al.*, 2002a ; Castro-Hermida *et al.*, 2002b), aussi, une faible corrélation entre la présence de fèces liquides et l'excrétion du protozoaire est constatée (Atwill *et al.*, 1999). En général, la présence de sang et les fèces liquides sont plutôt associées à une coexistence entre *Cryptosporidium parvum* et d'autres agents entéropathogènes (infection mixte avec Rotavirus, Coronavirus, Salmonella, ou autres) (De la Fuente *et al.*, 1998 ; Naciri *et al.*, 1999).

Aussi, la perte de poids a été souvent signalée par plusieurs auteurs dans l'association de ces entéropathogènes. Les maladies entériques causant de l'amaigrissement sont habituellement celles qui causent une diarrhée modérée sur une longue période (chronique) plutôt qu'une diarrhée aiguë pendant une courte période de temps comme c'est le cas en général lors de cryptosporidiose simple (Naciri *et al.*, 1999 ; Villeneuve *et al.*, 2003). Cependant, la maladie ouvre la porte à d'autres agents pathogènes opportunistes permettant de prolonger et d'augmenter la sévérité de la diarrhée en plus d'occasionner un amaigrissement important (Naciri *et al.*, 1999 ; Villeneuve *et al.*, 2003).

### **II.3. Cryptosporidiose chez l'homme**

La cryptosporidiose est plus communément considérée comme une maladie intestinale chez les personnes immunocompétentes. La plupart des cas sont détectés chez des enfants de moins de 5 ans (Chalmers et Davies, 2010). La période d'incubation rapportée a été de 7 jours en moyenne après l'exposition (Chalmers., 2003). Le symptôme le plus notable chez les personnes immunocompétentes est une diarrhée aqueuse et volumineuse, généralement entre 3 et 6 selles par jour, mais parfois même davantage (Chalmers et Davies, 2010). Le mucus peut être présent dans les selles, mais le sang et les leucocytes sont rares. D'autres symptômes tels que des crampes abdominales, l'anorexie, des nausées, des vomissements, une perte de poids, une faible fièvre et de la fatigue ont également été rapportés (Fayer, 2004). Chez les individus immunocompétents, la durée des symptômes est de 9 jours en moyenne et ces manifestations cliniques sont spontanément résolutive (Ripert et Guyot, 2003).

En revanche, chez les patients immunodéficients, une diminution des lymphocytes T CD4 + est associée à un risque plus élevé de développer une cryptosporidiose (Marcos et Gotuzzo, 2013). Chez les patients immunodéprimés, l'infection par la cryptosporidiose peut devenir chronique et mettre la vie en danger en raison des évacuations liquides et fréquentes entraînant une déshydratation très grave. Plus la charge parasitaire au niveau de l'intestin augmente plus les symptômes sont fréquents et sévères (Leitch et He, 2012).

Par ailleurs, la survenue de certains cancers a été associée à la présence de parasites. Particulièrement, pour *Cryptosporidium*, un cas d'adénocarcinome du colon a été diagnostiqué sur une biopsie chez un patient de 64 ans chez lequel on a retrouvé des oocystes de *Cryptosporidium* (Izquierdo *et al.*, 1988). Plus récemment, une prévalence de 18% de parasitisme par *Cryptosporidium* a été rapportée chez des patients atteints de cancer colorectal en Europe (Sulzyc-Bielicka *et al.*, 2007).

En effet, la capacité de *C. parvum* à induire des modifications néoplasiques gastro-intestinales a été établie expérimentalement chez des souris SCID atteintes d'un déficit immunitaire. Ces lésions néoplasiques sont apparues après l'infection par des souches *C. parvum* (Iwoa *et TUMII*), quelle que soit la taille de l'inoculum utilisé (d'un à 10<sup>7</sup> oocystes). Les lésions néoplasiques induites par ces souches ont progressé à travers toutes les couches du tube digestif et se sont propagées par les vaisseaux sanguins (Certad *et al.*, 2007, 2010, 2012 ; Benamrouz *et al.*, 2012, 2014).

Cependant, l'impact majeur de la cryptosporidiose humaine dans le monde entier concerne les pays en développement (Putignani et Menichella, 2010). Cette parasitose est signalée comme la deuxième cause de maladies diarrhéiques en Afrique subsaharienne et en Asie du Sud (Striepen, 2013). Elle est reconnue comme un contributeur majeur à la morbidité et à la mortalité chez les enfants (Widmer *et al.*, 2012 ; Kotloff *et al.*, 2013 et Platts-Mills *et al.*, 2015). La susceptibilité à la maladie est encore accrue chez les enfants mal nourris et immunodéprimés, tels que ceux atteints d'une infection par le VIH (Guerrant *et al.*, 2008) ou les greffés d'organes solides (Bonatti *et al.*, 2012 ; Hadauria *et al.*, 2015, Lanternier *et al.*, 2015, 2017).

### **II.4. Pouvoir pathogène et physiopathologie de la cryptosporidiose chez les animaux**

La virulence d'un pathogène se définit non seulement par rapport au pathogène en lui-même mais également par rapport à l'hôte qu'il infecte. Plus précisément, la virulence désigne la propriété d'un pathogène à endommager un hôte, mais cette propriété est modulée par la résistance et la susceptibilité de cet hôte (Casadevall et Pirofski., 1999 ; Bouzid *et al.*, 2013). En effet, chez les hôtes humains ou animaux la sévérité de la cryptosporidiose est variable en fonction de l'espèce hôte, âge, statut immunitaire et de la pathogénicité intrinsèque des isolats (Okhuysen et Chappell, 2002).

Jusqu'ici, les facteurs spécifiques de virulence de *Cryptosporidium* n'étaient pas bien connus. Néanmoins, certaines molécules ont été identifiées par des méthodes immunologiques et moléculaires, et certains mécanismes associés à la pathogénicité ont été décrits :

**a)** L'étape initiale critique est l'attachement du parasite aux cellules hôtes. En effet, de nombreuses molécules probablement associées à l'adhérence ont été caractérisées (Riggs *et al.*, 1997 ; Barnes *et al.*, 1998 ; Spano *et al.*, 1998 ; Nesterenko *et al.*, 1999 ; Riggs *et al.*, 1999 ; Cevallos *et al.*, 2000 ; Strong *et al.*, 2000).

**b)** La diarrhée est le symptôme le plus caractéristique de la cryptosporidiose, mais le mécanisme spécifique par lequel *Cryptosporidium* induit la diarrhée n'a pas été identifié. Par contre, la présence d'une entérotoxine responsable de la diarrhée sécrétoire profuse est suspectée. Plusieurs observations soutiennent cette idée. La diminution du flux d'anions en présence d'inhibiteurs de cyclo-oxygénase a mené à l'hypothèse d'une activité potentielle entérotoxino-gène de *Cryptosporidium*. Celle-ci impliquerait la sécrétion des prostaglandines par les cellules épithéliales intestinales infectées (Okhuysen *et al.*, 2002).

c) Les mécanismes impliqués dans la rupture des membranes pendant l'invasion de *Cryptosporidium* demeurent inconnus. Les phospholipases, les protéases, ou les hémolysines sont des molécules qui peuvent potentiellement altérer directement les tissus. Une protéine spécifique de *Cryptosporidium* pourrait être associée à l'invasion cellulaire et à la perte de fonction barrière. C'est l'hémolysine H4 codée par le gène *hemA* (Steele *et al.*, 1995).

d) La modulation du processus d'apoptose des cellules hôtes : Le contrôle de l'apoptose des cellules hôtes par le parasite apparaît biphasique. *In vitro*, la première phase décrite peu après l'infection (6 à 12 h) serait anti-apoptotique et faciliterait ainsi l'installation et la prolifération parasitaire. La seconde, modérément pro-apoptotique serait plus tardive et associée à la libération des mérozoïtes (Mele *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2008 et 2009). L'infection des cellules épithéliales par *C. parvum* conduit notamment à une surexpression de gènes codant pour des inhibiteurs de protéines induisant l'apoptose. Une mort des cellules hôtes par des mécanismes non apoptotiques est également observée. Une nécrose des entérocytes est produite suite à la sortie de *Cryptosporidium parvum* au niveau de la membrane plasmatique (Wyatt *et al.*, 2010).

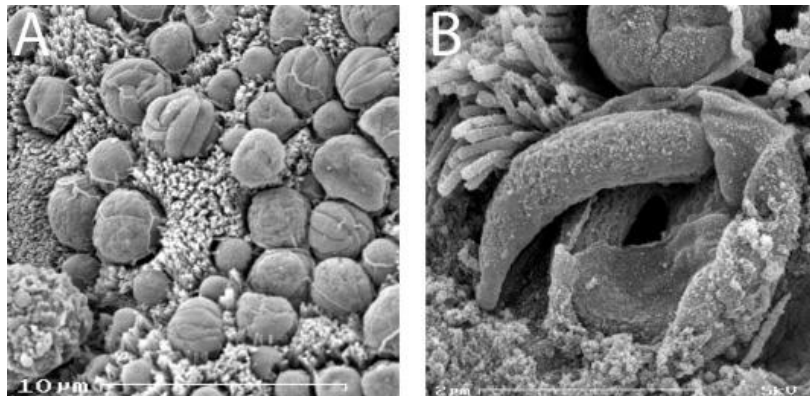
En outre, *Cryptosporidium* est cytopathogène vis-à-vis des cellules épithéliales directement infectées mais également des cellules non infectées. Cet effet cytopathogène est lié à l'apoptose des cellules infectées et des cellules non infectées au moment de l'entrée du parasite dans la cellule (Chen *et al.*, 1999).

Par ailleurs, chez des souris SCID-D, Certad *et al.*, (2012) et Benamourz *et al.*, (2014) ont souligné le haut pouvoir infectieux et tumorigène de *C. parvum*. Ces travaux ont montré qu'une souche de *Cryptosporidium* (IIaA15G2R1), isolée chez l'homme, était capable d'induire chez la souris SCID-D, le développement d'adénocarcinomes invasifs, mettant en évidence la capacité de ce parasite à entraîner le développement de néoplasies même avec de très faibles inocula.

Pohlenz *et al.* (1978) ont étudié les différents stades de développement de ce parasite au niveau de l'intestin du veau. Ce sont surtout les parties postérieures de l'intestin grêle qui sont parasitées. L'iléon est le lieu de développement le plus fréquent. Cependant, plus rarement, certains parasites peuvent se développer au niveau du jéjunum et l'infection peut s'étendre jusqu'au côlon.

Au microscope électronique à balayage, les cryptosporidies apparaissent comme des corps sphériques distribuées à la surface des villosités intestinales atrophiées. Elles sont soit au

sommet des villosités, à la surface de la cellule en brosse soit dans la bordure en brosse, attachées à la surface de la cellule épithéliale (Figure 6).



**Figure 6:** Micrographie électronique à balayage des plaques de Peyer iléales d'un jeune agneau d'une semaine infecté par *Cryptosporidium parvum*. (Fabrice et Lacroix-Lamande ; 2017).

(A) Le dôme est recouvert de nombreux parasites en développement.

(B) Mérozoïte émergeant d'une cellule infectée.

La cryptosporidiose conduit à une atrophie des villosités et à une diminution de la surface totale de la muqueuse intestinale. Une accélération de la perte des entérocytes matures des villosités et une atrophie des microvillosités avec une augmentation de la perméabilité membranaire en résultent, conduisant à une diarrhée de type mal-digestion/malabsorption.

## **II.5. Système immunitaire en présence de cryptosporidiose**

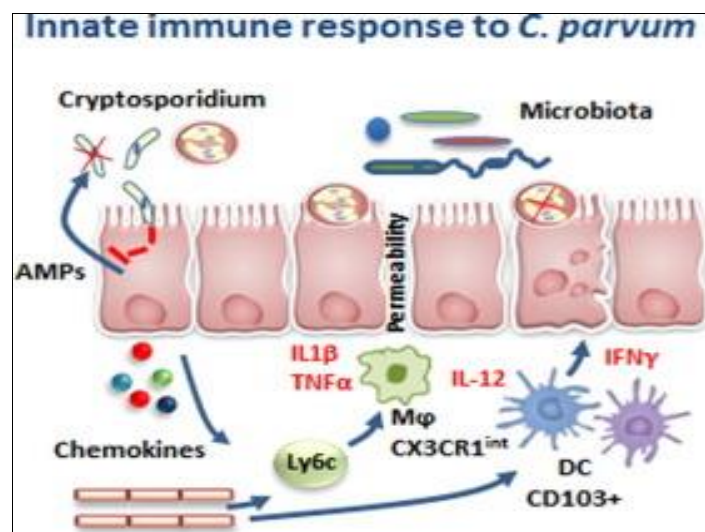
Chez les bovins, lorsque les nouveau-nés infectés sont séparés trop rapidement de leur mère (moins de 48 heures après la naissance), une diarrhée aqueuse avec mortalité rapide (quelques jours) survient vers l'âge d'une à deux semaines en raison d'un manque de transfert de l'immunité passive de la mère. Le statut immunitaire du veau joue un rôle important dans la contamination et l'excrétion d'oocystes de *Cryptosporidium* sp. Toutefois, un colostrum de bonne qualité contenant une faible quantité d'anticorps anti-*Cryptosporidium*, ne suffit pas à lui seul pour protéger le veau d'une contamination par des oocystes présents dans l'environnement. Cependant le colostrum va amener une immunité intestinale locale qui protégera le veau des autres agents diarrhéiques (Wyatt *et al.*, 2010). Cette protection vis à vis des autres agents va réduire le risque de diarrhée néonatale et d'affections concomitantes et ainsi limiter l'excrétion d'oocystes de *Cryptosporidium* sp. Le statut immunitaire du veau nouveau-né est également affecté par les carences liées à la gestation.

Des carences en vitamines et sélénium prédisposent à une immunité affaiblie pouvant occasionner une infection à *Cryptosporidium* sp. et une excrétion d'oocystes massive (Chartier et Parraud, 2010).

La réponse immunitaire à ce parasite est mal comprise. Cependant, les systèmes immunitaires innés et adaptatifs semblent jouer un rôle clé. Plusieurs composantes impliquées dans cette réponse ont été résumées dans différentes revues (Zu et al., 1992 ; Laurent et al., 1999; Leitch et He, 1999; Riggs, 2002 ; Petry et al., 2010; O'Hara et Chen, 2011; Thomson et al., 2017 ; Fabrice et Lacroix-Lamande, 2017).

### **II.5.1. L'immunité innée**

Ces dernières années, plusieurs études ont mis en évidence l'importance de l'immunité innée. En effet, les cellules épithéliales intestinales ont montré un rôle majeur à côté des phagocytes mononucléés dans les réponses immunitaires dans le mécanisme de protection. Ainsi, l'immunité innée est la première barrière de défense de l'organisme contre l'agent pathogène (Figure 7).



**Figure 7:** Représentation schématique et simplifiée de la voie de signalisation des chemokines et cytokines lors de l'infection par *Cryptosporidium* spp. (Fabrice et Lacroix-Lamande ; 2017).

Les cellules épithéliales intestinales jouent donc un rôle central dans la réplication du parasite et dans la réponse immunitaire protectrice. Elles vont stimuler l'induction de l'apoptose et la production de peptides antimicrobiens et de chimiokines pour le recrutement de cellules immunitaires sur le site de l'infection. Ces cellules expriment aussi une variété de récepteurs de reconnaissance de type Toll like receptor (TLR) et des récepteurs de type Nod (NLR)

intracellulaires qui permettent une reconnaissance microbienne conduisant à l'expression des chimiokines (Petry *et al.*, 2010). Une interaction entre *C. parvum* et TLR2 / TLR4 exprimé par les cellules épithéliales intestinales entraîner l'activation du facteur nucléaire-kappa B NFκB et la production subséquente de chimiokines (CXC et CC), attirant les cellules immunitaires effectrices vers le site de l'infection (Laurent *et al.*, 1997, Chen *et al.*, 2001, Lacroix -Lamande *et al.*, 2002, Auray *et al.*, 2007, Hu *et al.*, 2014).

Les cellules NK (nature Killer) jouent le rôle majeur dans l'immunité innée. Elles produisent des cytokines pro-inflammatoires en particulier le (l'IFN-γ) (Okazawa *et al.*, 2004). Ce facteur clé l'IFN-γ empêche directement le parasite des cellules hôtes envahissantes, très probablement en régulant la signalisation STAT voie de la liaison aux récepteurs IFN-γ sur les cellules épithéliales intestinales (inhibant le catabolisme du tryptophane), ainsi que par modification des concentrations intracellulaires de Fe<sup>2+</sup> (Pollok *et al.*, 2001). Une étude récente suggère que l'infection à *C. parvum* peut réguler négativement l'IFN-γ en supprimant la signalisation STAT1-α, qui facilite l'invasion.

Par ailleurs, les cellules épithéliales intestinales produisent de nombreux peptides antimicrobiens (AMP) dans le cadre de la réponse immunitaire innée contre les agents pathogènes. Les AMP sont de petits polypeptides (<100 acides aminés) possédant des propriétés antimicrobiennes et immunomodulatrices et des effecteurs du système immunitaire inné conservés au cours de l'évolution (Wehkamp *et al.*, 2007).

Parmi l'immunité innée, les micro-ARN et des ARN-non codant cellulaires sont devenus des régulateurs omniprésents de l'expression des gènes liés aux réponses cellulaires. Plusieurs auteurs ont étudié de manière approfondie leur contribution à l'immunité antimicrobienne de l'hôte et à la défense de la cellule épithéliale. Ils modulent les réponses immunitaires épithéliales à chaque étape du réseau immunitaire inné après une infection à *Cryptosporidium*, notamment la production de molécules antimicrobiennes, l'expression de cytokines/chimiokines, la libération d'exosomes dérivés de cellules épithéliales et la régulation rétroactive de l'homéostasie immunitaire (Chen *et al.* ; 2005 ; Carpenter *et al.* 2013 ; Zhou *et al.*, 2011, 2015 ; Ming *et al.*, 2017).

De plus, d'autres cellules immunitaires sont supposées être impliquées dans la résistance de l'hôte, telles que les macrophages et les neutrophiles (Takeuchi *et al.*, 2008 ; Petry *et al.*, 2010).



Le rôle du complément dans l'immunité contre *C. parvum*, activé par des voies classiques et des voies de la lectine, a été également rapporté (Petry et *al.*, 2008).

Par ailleurs, parmi les chimiokines produites par les cellules épithéliales intestinales pendant l'infection, la CXCL10 joue un rôle majeur dans la réponse immunitaire protectrice dépendante de l'IFN- $\gamma$  chez les souris néonatales en recrutant des cellules dendritiques (Lantier et *al.*, 2013).

L'immunité innée se met en place très rapidement à la différence de l'immunité acquise, spécifique au pathogène, à l'origine d'une mémoire immunitaire, et d'une durée plus importante. Elle comprend une réponse humorale et une réponse cellulaire.

### **II.5.2. Immunité adaptative**

#### **II.5.2.1. Immunité humorale**

Des anticorps spécifiques IgA, IgM et IgG ont été détectés dans le sérum de veaux et d'agneaux infectés. De même que des anticorps sécrétoires locaux IgA ont été mis en évidence dans des fèces d'agneaux (O'Donoghue, 1995).

Le rôle de ces différents anticorps dans la résolution de l'infection n'est pas clairement établi mais il a été remarqué que les taux d'anticorps augmentent et le niveau d'excrétion d'oocystes diminuent chez les veaux et les agneaux (O'Donoghue, 1995).

Chez les jeunes animaux, la prise de colostrum intervient en diminuant la fréquence et la sévérité de l'infection. L'administration à des veaux de colostrum contenant des anticorps neutralisant l'antigène p23 de *C. parvum* a montré une protection contre les signes cliniques et une diminution de l'excrétion d'oocystes. Cependant les anticorps, qu'ils soient d'origine endogène ou exogène, peuvent agir sur les formes libres du parasite (sporozoïtes et mérozoïtes) en réduisant leur pouvoir infectieux. En revanche, ils ne peuvent pas agir sur les stades intracellulaires (Wyatt et *al.*, 2010).

#### **II.5.2.2. Immunité cellulaire**

Lors d'inoculations expérimentales, des veaux ont présenté une réponse à base de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> avec une production de cytokines de type interleukine-12 et interféron gamma (Fayer et *al.*, 1998).

Il a été montré que l'immunité acquise se met en place dans les intestins avant même l'apparition de la diarrhée. En effet, des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et des cytokines

(IL10) ont été mis en évidence à de nombreuses localisations avant la survenue des signes cliniques : au niveau des villosités, de la lamina propria, des plaques de Peyer dans l'iléon (Wyatt *et al.*, 2010).

Dans une étude citée par Chartier (2002) sur des veaux maintenus isolés, une infection d'épreuve par *C. parvum* provoque une diarrhée et une excrétion d'oocystes pour des âges variant de 1 semaine à 3 mois. Après rétablissement, la réinfection est impossible ce qui montre que l'état de résistance des animaux âgés est lié à un statut immunitaire spécifique et non à l'âge.

## **CHAPITRE III : ÉPIDÉMIOLOGIE**

### **III.1. Épidémiologie descriptive chez les ruminants**

#### **III.1.1. Épidémiologie descriptive chez les ruminants dans le monde**

La cryptosporidiose des ruminants est présente dans le monde entier (Fayer, 2004). Plusieurs études épidémiologiques ont été réalisées sur la prévalence d'excrétion, et pas forcément sur la maladie clinique (Radostits, 2007). Il est important de noter que les prévalences rapportées dans ces études sont très variables pour plusieurs raisons. En premier lieu, les méthodes de détection des oocystes n'ont pas toutes la même sensibilité, ce qui peut amener à de très fortes variations de prévalence ; ensuite, selon l'âge des animaux, leur statut clinique, le mode d'élevage, la période à laquelle sont réalisés les échantillons, on peut encore observer de fortes variations.

##### **III.1.1.1 Épidémiologie de la cryptosporidiose bovine**

La prévalence de l'infection semble largement varier chez les bovins. Des prévalences allant de moins de 1% à supérieur à 86% chez les veaux ont été signalées dans des pays africains (Soltan *et al.*, 2007 ; Samra *et al.*, 2016). Lefay *et al.*, (2000) évoquent des taux d'excrétion compris entre 14 et 80% chez les bovins. Les variations de prévalence sont liées aux raisons citées précédemment. Parmi cela, le type d'élevage « bovins allaitants ou bovins laitiers » ont été souvent évoqués (O' Handley *et al.*, 1999 ; Becher *et al.*, 2004 ; Fayer *et al.*, 2007). Selon certaines études, la plus forte prévalence de l'infection serait rencontrée dans les élevages de veaux laitiers (Kvá *et al.*, 2006; Geurden *et al.*, 2007). La prévalence de l'infection est beaucoup plus forte chez les jeunes animaux (< 2mois) que chez les animaux âgés (Santín *et al.*, 2004 ; Fayer *et al.*, 2006, 2007 ; Kvá *et al.*, 2006 ; Mendonça *et al.*, 2007).

Par exemple, une étude longitudinale réalisée en 2008 aux Etats-Unis, chez des bovins laitiers (de la naissance à 2 ans de vie) par Santín *et al.*(2008) a rapporté une prévalence cumulée de 100% chez des animaux de moins d'un mois et une prévalence de 2,2% chez des animaux âgés de 2 ans. En Afrique, comme dans la plupart des régions étudiées du monde, la prévalence de *Cryptosporidium* était supérieure chez les jeunes animaux (1 jour à 3 mois) que chez les plus âgés. En outre, l'âge, la source d'eau de boisson et la diarrhée ont été associés à la prévalence de *Cryptosporidium* chez les bovins (Soltan *et al.*, 2007 ; Siwila *et al.*, 2007 ; Helmy *et al.*, 2015).

#### **III.1.1.2. Epidémiologie de la cryptosporidiose ovine**

Le rôle de ce parasite dans les diarrhées néonatales ovines a été rapporté au début des années 1980, et par la suite a été décrit dans différents pays (Causapé *et al.*, 2002 ; Ryan *et al.*, 2005 ; Santín *et al.*, 2007). Ce parasite est d'une forte gravité chez les agneaux où la mortalité et la morbidité associées à la maladie sont importantes (de Graaf *et al.*, 1999). Comme chez les bovins, les prévalences d'infection et d'excrétion sont plus fortes chez les jeunes animaux (< 2 mois) (Causapé *et al.*, 2002 ; Santín *et al.*, 2007).

Selon les différentes études réalisées dans le monde, la prévalence de *Cryptosporidium spp.* chez les jeunes agneaux varie entre 2,6% et 82% (Causapé *et al.*, 2002 ; Ryan *et al.*, 2005 ; Santín *et al.*, 2007 ; Geurden *et al.*, 2008 a ; Yang *et al.*, 2009, Romero-Salas *et al.*, 2016). En France, une étude, en 2005, a rapporté que 91% des agneaux diarrhéiques de l'étude étaient positifs pour la cryptosporidiose (Roffet *et al.*, 2005). Les ovins adultes excrètent aussi le parasite avec des prévalences d'excrétion plus faibles, estimées entre 2,1% et 5,3% (Castro-Hermida *et al.*, 2007 a et b ; Wang *et al.*, 2010). Et entre 0 et 42,9% selon Santin *et* Trout (2008).

En Afrique, une cryptosporidiose ovine a été signalée en Égypte, en Tanzanie, en Tunisie et en Zambie, avec une prévalence respectivement de 2,5%, 22,2%, 11,2% et 12,5% (Mahfouz *et al.*, 2014 ; Parsons *et al.*, 2015 ; Soltane *et al.*, 2007 ; Goma *et al.*, 2007).

#### **III.1.1.3. Epidémiologie de la cryptosporidiose caprine**

Le premier cas de cryptosporidiose caprine a été rapporté en 1981 par Mason *et al.*, (1981). Par la suite, de nombreuses études décrivant la prévalence de l'infection chez les caprins ont été réalisées en Europe (Castro-Hermida *et al.*, 2005 a et b ; Delafosse *et al.*, 2006 ; Paraud *et al.*, 2009). Des épizooties de cryptosporidiose caprine ont également été décrites en Turquie et au

Brésil (Vieira *et al.*, 1997). *Cryptosporidium spp.* est très répandu en élevage caprin mais les données chiffrées de prévalence sont très variables, dépendant des enquêtes, des méthodes utilisées pour la recherche du parasite et de paramètres déjà cités. Selon les différentes études réalisées, la prévalence de l'excrétion chez les caprins varie entre 0 et 43% (Muoz *et al.*, 1996 ; Castro-Hermida *et al.*, 2005 a et b ; Geurden *et al.*, 2008 a ; Paraud *et al.*, 2009 ; Yusof *et al.*, 2017). Des taux de prévalence entre 5 et 35% sont rapportés chez les chevreaux d'après Diaz *et al.*, (2010). Comme chez les autres ruminants, ce parasite est aussi bien retrouvé chez les jeunes que chez les adultes mais la prévalence d'excrétion est plus forte chez les jeunes animaux non sevrés (Fayer *et Xiao*, 2007). Elle est comprise entre 5 et 30% (Delafosse *et al.*, 2006; Geurden *et al.*, 2008 a ; Paraud *et al.*, 2009). Les données concernant les chèvres adultes sont moins nombreuses et très variables d'un pays à l'autre. Castro Hermida *et al.* (2007 a et b), en Espagne, ont montré que la prévalence d'infection chez les chèvres adultes était de l'ordre de 7,7 à 9%. Selon une autre étude réalisée au Sri-Lanka la prévalence chez les chèvres adultes (> 12 mois) pourrait atteindre les 25% (Noordeen *et al.*, 2000).

Les jeunes ruminants sont les plus sensibles et les plus excréteurs et l'origine de la contamination est souvent difficile à identifier. En effet, la cryptosporidiose clinique peut toucher gravement certains élevages et d'autres modérément (Geurden *et al.*, 2008). Les oocystes, très résistants dans le milieu extérieur sont à l'origine de nouvelles infections.

### **III.1.2. Espèces de *Cryptosporidium* présentes chez les ruminants**

#### **III.1.2.1. Espèces présentes chez les bovins**

L'utilisation de la biologie moléculaire a permis l'étude plus fine des espèces du genre *Cryptosporidium* retrouvées chez les ruminants. Il existe de nombreuses études concernant les espèces de *Cryptosporidium* retrouvées chez les bovins. Les espèces *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae*, *C. andersoni*, *C. hominis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis*, *C. scrofarum* (anciennement *C. pig genotype II*) ont été signalées chez cette espèce de ruminant (Bornay-Llinares *et al.*, 1999 ; Fayer *et al.*, 2001, 2006 ; Santín *et al.*, 2004, 2008 ; Smith *et al.*, 2005 ; Geurden *et al.*, 2006 a ; Feng *et al.*, 2007 ; Langkjaer *et al.*, 2007).

Les quatre espèces majoritairement retrouvées chez les bovins sont : *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* et *C. andersoni* (Xiao *et al.*, 2004 ; Santín *et al.*, 2004, 2008 ; Fayer *et al.*, 2006 ; Geurden *et al.*, 2006).

Les espèces *C. felis*, *C. hominis*, *C. suis*, *C. suis like genotype* et *C. scrofarum*, *C. ubiquitum* n'ont été que très rarement identifiées. En effet, *C. hominis* n'a été rapporté qu'en Ecosse, Inde et Corée (Smith *et al.*, 2005 ; Park *et al.*, 2006 ; Feng *et al.*, 2007). L'espèce *C. suis*, elle, a été rapportée aux Etats-Unis et en Zambie (Fayer *et al.*, 2006 ; Geurden *et al.*, 2006 a). Les espèces et génotypes *C. suis like genotype* et *C. scrofarum* n'ont été retrouvées qu'au Danemark (Langkjaer *et al.*, 2007). L'espèce *C. felis* a été signalée une fois chez une vache en Pologne (Bornay-Llinares *et al.*, 1999). L'espèce *C. ubiquitum* a été identifiée une fois en France (Follet *et al.*, 2011).

Chez les bovins laitiers, une succession chronologique d'espèces de la naissance jusqu'à l'âge adulte a été suggérée aux Etats-Unis (Santín *et al.*, 2004, 2008). Cette succession fait intervenir les quatre principales espèces retrouvées chez les bovins : *C. parvum* qui est majoritairement présent chez les jeunes veaux non sevrés, *C. ryanae* et *C. bovis* qui sont retrouvés chez les jeunes animaux sevrés et *C. andersoni* qui devient prépondérant chez les vaches adultes (Santín *et al.*, 2004, 2008).

### **III.1.2.2. Espèces de *Cryptosporidium* présentes chez les ovins**

Chez les ovins, deux espèces ; *C. parvum* et *C. ubiquitum* ont principalement été identifiées jusqu'à présent. Des différences de prévalence pour ces deux espèces ont été observées selon les études. En Europe (Espagne, Royaume-Uni et Italie), des auteurs ont rapporté la présence de *C. parvum* chez des agneaux diarrhéiques ou non diarrhéiques (Quílez *et al.*, 2008 ; Mueller-Doblies *et al.*, 2008 ; Paoletti *et al.*, 2009).

D'autres auteurs ont rapporté la présence de *C. ubiquitum* chez l'agneau (Ryan *et al.*, 2005; Geurden *et al.*, 2008 a; Robertson *et al.*, 2010). *C. ubiquitum* est l'espèce qui a également été majoritairement rapportée chez les ovins de tout âge dans le reste du monde (Australie, Chine, USA) (Ryan *et al.*, 2005; Santín *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010). Une troisième espèce a été retrouvée chez des agneaux : *C. xiaoi* (Ryan *et al.*, 2005 ; Santín *et al.*, 2007 ; Fayer et Santín 2009 ; Sweeny *et al.*, 2011). Une étude de Yang *et al.* en 2009, a confirmé la faible prévalence de *C. parvum* chez les agneaux en Australie et grâce à l'utilisation d'une technique de biologie moléculaire considérée comme très sensible (PCR q), a mis en évidence la présence de co-infection par deux espèces de *Cryptosporidium spp*: *C. xiaoi* et *C. parvum*. En 2017, Feng et Xiao décrivaient que *Cryptosporidium xiaoi* semble être fréquente chez les ovins en Afrique et en Chine où la gestion des animaux est moins intensive (Soltane *et al.*, 2007; Mahfouz *et al.*, 2014; Parsons *et al.*, 2015; Hijjawi *et al.*, 2016). Toutefois, l'espèce *C.*

*hominis* a été retrouvée de façon importante en Ecosse où 88 échantillons sur 255 récoltés ont été identifiés *C. hominis* en mono ou co-infection avec d'autres espèces de *Cryptosporidium* chez des agneaux âgés de plus de 4 mois (Connelly *et al.*, 2013).

Chez les ovins, une répartition différente des espèces de *Cryptosporidium spp.* en fonction de l'âge des animaux a été mentionnée. En effet, deux études rapportent que les espèces *C. parvum* et *C. xiaoi* sont majoritairement identifiées chez les agneaux alors que l'espèce *C. ubiquitum* est retrouvée chez les animaux de tout âge (Yang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010). Cette répartition d'espèce en fonction de l'âge des animaux n'est cependant pas aussi claire que celle retrouvée chez les bovins laitiers aux Etats-Unis et mérite d'être approfondie (Santín *et al.*, 2008).

### **III.1.2.3. Espèces de *Cryptosporidium* présentes chez les caprins**

Chez les caprins, l'espèce *C. parvum* est l'espèce majoritairement retrouvée en Europe chez le chevreau non sevré, lors d'épisodes de diarrhée ou non (Ngouanesavanh *et al.*, 2006 ; Geurden *et al.*, 2008 a ; Quílez *et al.*, 2008 ; Paraud *et al.*, 2009). Plus récemment, en Espagne, il a été mis en évidence la présence de *C. xiaoi* (anciennement *C. bovis like genotype* ou *C. bovis* chez les moutons), chez des chevrettes de moins de 21 jours présentant de la diarrhée (Díaz *et al.*, 2010a). En 2017, Feng et Xiao signalaient la présence de cette espèce chez les caprins en Afrique et en Chine (Soltane *et al.*, 2007; Mahfouz *et al.*, 2014; Parsons *et al.*, 2015; Hijjawi *et al.*, 2016). Au Pérou, Cama *et al.* (2008) ont mis en évidence la présence d'une autre espèce de *Cryptosporidium* chez 8 chèvres adultes : l'espèce *C. ubiquitum* (anciennement *Cryptosporidium cervine genotype*). Les espèces *C. hominis* et *C. parvum* ont été décrites de façon ponctuelle chez des chèvres adultes (Chalmers *et al.*, 2002 ; Hajdusek *et al.*, 2004 ; Park *et al.*, 2006 ; Giles *et al.*, 2009 ; Xiao, 2010).

Dans un travail de synthèse, en 2017, Feng et Xiao rapportaient d'une manière générale que les ovins et caprins dans les pays européens sont fréquemment infectés par l'espèce pathogène et zoonotique *C. parvum*, alors que ceux des Amériques sont principalement infectés par *C. ubiquitum*. Les trois espèces de *Cryptosporidium* semblent être présents chez les moutons en Australie (Ye *et al.*, 2013; Ryan *et al.*, 2014). En revanche, *Cryptosporidium xiaoi* semble être fréquent chez les ovins et caprins en Afrique et en Chine (Soltane *et al.*, 2007; Mahfouz *et al.*, 2014; Parsons *et al.*, 2015; Hijjawi *et al.*, 2016).

### **III.1.3. Caractérisation de l'aspect zoonotique**

La caractérisation moléculaire des oocystes excrétés par les ruminants permet également de définir le caractère potentiellement zoonotique de certains isolats appartenant aux familles des sous-types IIa et II d de *C. parvum* (Xiao et Ryan, 2004). L'identification des différents sous-types se fait par la détermination de la séquence de la glycoprotéine de surface gp60. Il convient donc d'évaluer le potentiel de transmission de *C. parvum* par les ruminants à l'homme.

#### **III.1.3.1. Caractérisation de l'aspect zoonotique chez les bovins**

Chez les bovins, les sous-types appartenant à la famille IIa sont les plus rapportés mais les sous-types sont variables d'une région à l'autre (Alves et *al.*, 2003 ; Trotz-Williams et *al.*, 2006 ; Feng et *al.*, 2007 ; Xiao, 2010). Le sous-type majoritairement décrit dans le monde chez les bovins est le sous-type IIaA15G2R1 (Chalmers et *al.*, 2005 ; Alves et *al.*, 2006 ; Feng et *al.*, 2007 ; Trotz-Williams et *al.*, 2006 ; Xiao et *al.*, 2007). Dans certains pays tel que le Portugal ce sous-type est responsable de plus de 75% des infections chez des jeunes veaux (Alves et *al.*, 2006). Bien que, le sous-type IIaA15G2R1 soit le plus répandu dans le monde d'autres sous-types peuvent être retrouvés.

En effet, dans le nord de l'Irlande, le sous-type IIaA18G3R1 est responsable de l'infection de 55,6 % des jeunes veaux (Thompson et *al.*, 2007). Les sous-types IIaA18G2R1 et IIaA19G2R1 sont dominants en Floride alors que dans le sud de l'Ontario on retrouve majoritairement trois autres sous-types : IIaA16G1R1, IIaA16G2R1 et IIaA16G3R1 (Fayer et Xiao, 2007).

Ce dernier, IIaA16G3R1 est plus largement décrit que les autres, il a été trouvé récemment chez des veaux en Angleterre et aux Pays-Bas (Wielinga et *al.*, 2008 ; Xiao et *al.*, 2007 ; Brook et *al.*, 2009). Il a été décrit, dans les zones où il existe une grande diversité de sous types de *C. parvum*, que plusieurs sous-types peuvent circuler au sein des élevages et même au sein d'un même veau (Peng et *al.*, 2003 b ; Trotz-Williams et *al.*, 2006 ; Xiao et *al.*, 2007).

Les raisons pour lesquelles on observe une différence de sous-types selon les régions ou pays ne sont pas claires. Les pratiques d'élevages telles que les achats d'animaux pourraient être à l'origine de l'augmentation de la diversité des sous-types de *C. parvum* au sein du troupeau (Tanriverdi et *al.*, 2006). La forte prévalence du sous-type IIaA15G2R1 chez les bovins et la

détection de ce sous-type chez l'homme dans différents pays tels que l'Australie, le Portugal, la Slovénie et les Pays-Bas suggèrent que celui-ci peut se répandre facilement au sein de la population bovine et peut être à l'origine d'infection chez l'homme (Strong et *al.*, 2000 ; Alves et *al.*, 2003, 2006 ; Peng et *al.*, 2003 b ; Chalmers et *al.*, 2005 ; Wielinga et *al.*, 2008 ; Soba et Logar, 2008).

### **III.1.3.2. Caractérisation de l'aspect zoonotique chez les ovins**

Les études de génotypage de *C. parvum* chez les espèces caprine et ovine sont moins nombreuses. Jusqu'à présent, les isolats de *C. parvum* retrouvés chez les chevreaux et agneaux appartenaient aux sous-types des familles zoonotiques IIA et IID (Geurden et *al.*, 2008 ; Quílez et *al.*, 2008 ; Díaz et *al.*, 2010 ; Connelly et *al.*, 2013 ; Imre et *al.*, 2013).

Chez les ovins, l'étude de Quílez et *al.* (2008) a montré qu'en Espagne les agneaux étaient majoritairement infectés avec des sous types appartenant à la famille IID (IIDA17G1, IIDA19G1, IIDA18G1 majoritairement). Cette même étude ainsi que celle de Díaz et *al.* (2010) également réalisée en Espagne, ont montré que les agneaux pouvaient aussi être infectés par le sous type le plus largement retrouvé chez l'homme et les veaux à savoir le sous-type IIAA15G2R1 (Quílez et *al.*, 2008 ; Díaz et *al.*, 2010). Le rôle potentiel de réservoir des bovins (pour les oocystes de *C. parvum*) est bien établi. Celui des ovins et caprins a été récemment examiné par Robertson en 2009, montrant qu'en dépit des grandes variations de prévalence de l'infection par *Cryptosporidium* spp, la transmission des oocystes de *C. parvum* des petits ruminants à l'homme était possible (Smith et *al.*, 2010 ; Nget *al.*, 2012 ; Cacció et *al.*, 2013).

### **III.1.3.3. Caractérisation de l'aspect zoonotique chez les caprins**

Les sous-types retrouvés chez les caprins diffèrent en fonction des pays. En Belgique, deux sous-types appartenant à la famille IIA ont été identifiés (IIAA15G2R1 et IIAA22G1) et ont déjà été retrouvés chez l'homme (Alves et *al.*, 2006 ; Geurden et *al.*, 2008 a). En Espagne, les sous-types identifiés chez les chèvres appartenaient tous à la famille IID (sous type IIDA15G1 majoritaire) (Quílez et *al.*, 2008).

## **III.1.4. Épidémiologie de la cryptosporidiose en Algérie**

### **III.1.4.1. Épidémiologie de la cryptosporidiose chez les ruminants**

L'Algérie un pays du Nord-africain s'inscrit dans les pays en voie de développement où les parasitoses intestinales sont négligées. La cryptosporidiose connue chez les ruminants parmi



les maladies néonatales est restée longtemps non diagnostiquée. Par contre, il ya peu de temps plusieurs travaux se sont intéressés à cette parasitose. Elle a été surtout étudiée dans les cas de diarrhée néonatale du veau vu son impact économique.

Selon une étude synthétique récente effectuée par Mammeri et Adjou (2019), la prévalence chez le bovin, effectuée par les méthodes classiques est en moyenne de (38%). Le seuil optimal de 72,5% est rapporté par Ouchène *et al.* en 2012 dans la région Est du pays (Tableau 3). Par ailleurs, cette même étude rapporte une prévalence moyenne de (47,5%) déterminée par les méthodes de biologie moléculaire (Tableau 4).

En outre, les méthodes de biologie moléculaire ont permis d'identifier les espèces présentes chez les bovins en Algérie (Ouchène *et al.*, 2016 ; Baroudi *et al.*, 2017; Benhouda *et al.*, 2017 ; Ouakli *et al.*, 2018). Les espèces trouvées chez le bovin sont : *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae*, *C. andersoni*. Ce sont les espèces majoritairement décrites chez le bovin dans la plupart des autres régions du monde (Tableau 4).

À ce jour, peu d'informations sont disponibles sur l'aspect zoonotique des *Cryptosporidium spp.* La prévalence et la diversité moléculaire chez les bovins algériens à travers, seulement, quatre études utilisant des outils de biologie moléculaire ont été publiées depuis 2016. Ces études ont fait état de la présence des sous-types suivants : IIaA13G2R1, IIaA16G2R1 et IIaA17G3R1 (Tableau 4 ; Mammeri et Adjou, 2019).

**Tableau 4 :** Espèces et sous-types de *Cryptosporidium* provenant de bovins laitiers utilisant l'analyse moléculaire en Algérie (Mammeri et Adjou, 2019).

Regions	Nombre Ax (Age)	Méthodes /détection	Prevalence % Nombre	Espèces et sous-types symptomes/ (âge)	References
<b>Setif, El Taref et Constantine</b>	34 /338 ( < 3 mois)	Z-N, H, IFT, PCR	<b>68%,</b> 23/34 32%, 108/338	<i>C. parvum</i> , <i>C. bovis</i> , <i>C. andersoni</i> 55% de veaux diarrhéiques(1 à 14 jours)	Ouchene et <i>al.</i> , 2016
<b>Batna</b>	17/132 <8semaines	Z-N, AFS,  PCR PCR gp60	<b>84%,</b> 111/132  40%, 24/61	14/24 <i>C. bovis</i> 6/24 (1–2 mois) et (15à 20 jours) <i>C. ryanae</i> 4/24 1à 2 mois <i>C. parvum</i> 2/4 IIAA13G2R1 (< 1 mois).	Benhouada <i>et al.</i> , 2017
<b>Alger et Boumerdes</b>	19/102 (<3mois)	Z-N PCR RFLP PCR gp60	<b>13,7%,</b> 14/102	<i>C. parvum</i> , <i>C. bovis</i> ; <i>C. parvum</i> + <i>C. bovis</i> ; <i>C. bovis</i> + <i>C. andersoni</i> <i>C. parvum</i> : IIAA16G2R1 et IIAA17G3R1 Diarrhée associée à <i>C. parvum</i> et <i>C. bovis</i> veaux <= à un mois (20,7%) , veaux 2 mois (11,4%) , veaux âgés de 3 mois (10,5%). <i>C. parvum</i> (< 1 et 2 mois) , <i>C. bovis</i> et <i>C. andersoni</i> (2 et 3 mois)	Baroudi <i>et al.</i> , 2017
<b>Ain Defla, Blida, Sétif, Tizi Ouzou</b>	10/460 (2 jours à 18 mois) bovin	Z-N,  ELISA,  PCR 18S PCR gp60	<b>52,2%,</b> 240/460  <b>15,8%,</b> 38/240  <b>76,3%,</b> 29/38	<i>C. parvum</i> (72.4%, 21/29) :IIAA16G2R1 <i>C. bovis</i> (13.8%, 4/29), <i>C. andersoni</i> (3.4%, 1/29) et <i>C. ryanae</i> (3.4%, 1/29)  Diarrhée associée : Chez les veaux infectés âgés < à un mois	Ouakli <i>et al.</i> , 2018

**Ax :** Animaux ; **Z-N:** Ziehl–Neelsen modified technique; **H:** Heine technique; **AFS:** acid-fast staining method; **IFT:** ImmunoFluorescence Test; **ELISA:** enzyme-linked immunosorbent assay; **PCR:** polymerase chain reaction; **RFLP:** réaction des fragments polymorphisme; **PCRgp60:** PCR dugène de la glycoprotéine.

Aussi, des études utilisant des méthodes classiques ont rapporté une prévalence de la cryptosporidiose ovine, en Algérie, variant de 11,9% à 43%. Par contre, Il existe très peu de données disponibles sur *Cryptosporidium* chez les caprins d'Algérie. Néanmoins, quelques études ont été réalisées et ont montré une prévalence plus au moins élevée de l'ordre de 46,4% (Tableau 5 ; Synthèse personnelle).

**Tableau 5 :** *Cryptosporidium spp.* détectées chez les petits ruminants en Algérie.  
(Synthèse personnelle).

Espèce Animale	Régions	Nombre d'animaux (Age)	Méthodes /détection	Prévalence %(N) Symptômes/(Age) Associés à l'infection <i>Espèce/sous-types</i>	Références
Ovine	Médéa et Djelfa	802 agneaux 367 diarrhéiques et 435 non- diarrhéiques	Z-N	<b>11,9%</b> (96/802) Les animaux diarrhéiques (16,6%). Les animaux non diarrhéiques (8%). agneaux âgés < d'un mois plus infectés que chez les agneaux âgés de 2 à 3 mois.	Dahmani <i>et al.</i> , (2015)
	Aïn Oussera	254	Z-N	<b>14,6%</b> chez les agneaux âgés de 1 à 6 mois (20,3%) et les agneaux néonataux (<1 mois)	Laatamna <i>et al.</i> , 2018
	Médéa	62 Agneaux diarrhéiques et moins d'un mois	Z-N PCR	<b>14,5%</b> (6/9) <i>C. xiaoi</i> (3/9) <i>C. parvum</i> <i>C. xiaoi</i> infecte les jeunes animaux (âgés ≤ 30 jours) <i>C. parvum</i> infecte les animaux (âgés ≤ 15 jours)	Baroudi <i>et al.</i> , (2018)
Caprine	Alger et Boumerdes	211 diarrhéiques et non- diarrhéiques	OC and Z-N	<b>46,4%</b> (98/211) Les animaux diarrhéiques (60, 64%). Les animaux non -diarrhéiques (34, 18%). Les animaux infectés <3mois les animaux significativement infectés avaient (15 et 30 jours) (64,10%).	Baroudi <i>et al.</i> , (2011)
	Alger Boumerdes	92 chevreaux moins d'un mois	PCR 18s rRNA PCR- RFLP	<b>8,7%</b> (6/8) <i>C. xiaoi</i> (2/8) <i>C. ubiquitum</i> <i>C. xiaoi</i> infecte les jeunes animaux (âgés ≤ 20 jours) <i>C. ubiquitum</i> infecte les animaux (âgés = 15 jours)	Baroudi <i>et al.</i> , (2018)

**Z-N:** Ziehl–Neelsen modified technique; **OC:** oocyst concentration; **N:** Nombre

Actuellement, chez les petits ruminants la caractérisation moléculaire a permis d'identifier trois espèces chez les ovins à savoir : *C. parvum*, *C. ubiquitum* et *C. xiaoi* (Baroudi *et al.*, 2018) et chez le caprin (Baroudi *et al.*, 2018), avec une variabilité de la prévalence allant de 12 à 70%. Sur le plan zoonotique, Baroudi *et al.* (2018) ont identifié un seul sous-type IIAA13G2R1 chez les agneaux en Algérie (Tableau 5 ; Synthèse personnelle).

#### **III.1.4.2. Épidémiologie de la cryptosporidiose chez d'autres animaux**

Selon Mammeri et Adjou (2019), dans un travail de synthèse en Algérie, *Cryptosporidium* a été détecté, chez plusieurs espèces d'animaux autres que les ruminants, notamment, lapins, chevaux, ânes, volailles (poulet et dinde), par des méthodes microscopiques et parfois moléculaires. En effet, une prévalence de la Cryptosporidiose élevée à 83,3% (35/42) a été obtenue chez des lapins par la technique de Ziehl-Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz, après une étape de concentration de la technique de Ritchie (Mezali *et al.*, 2015).

Dans une étude moléculaire chez les équidés, Laatamna *et al.*, (2013 et 2015) ont montré que les chevaux et les ânes semblent être infectés à un taux de 2,3% de manière asymptomatique par plusieurs espèces de *Cryptosporidium*: *C. parvum*, *C. cuniculus*, *C. muris* et *C. homini* (Tableau 6 ; Synthèse personnelle).

Chez la volaille, les taux de prévalence varient de 9% à 44% chez des oiseaux domestiques, en captivité et sauvages (Tableau 6 ; Synthèse personnelle).

À ce jour, une seule étude a été réalisée sur des dromadaires pré-sevrés (*dromadaires Camelus*) âgés de moins de 3 mois dans 39 fermes de la région de Biskra (Baroudi *et al.*, 2018). L'espèce retrouvée est *Cryptosporidium parvum*, et le sous-type identifié est If-like-A22G2 (Tableau 6 ; Synthèse personnelle).

#### **III.1.5. Variabilité des résultats d'études épidémiologiques**

Ainsi, les nombreuses études épidémiologiques à travers le monde mettent en avant le fait que si un très grand nombre de pays est touché, il est difficile d'obtenir un résultat univoque et surtout représentatif de la réalité pour plusieurs raisons. Premièrement, on se rend compte assez rapidement que les taux d'excrétions varient fortement dans le temps, notamment selon l'âge des animaux. D'autre part, les prévalences enregistrées dépendent fortement de la méthode de détection des oocystes, toutes les méthodes n'ont pas la même sensibilité ni la même spécificité. Enfin, une autre considération à prendre en compte est que la prévalence d'infection est en général réalisée sur des animaux de tout venant, sans tenir compte du statut

clinique. En effet, plusieurs travaux de synthèse ont rapporté les résultats d'études épidémiologiques dans les différents continents montrant que l'apparition du parasite est impactée par plusieurs facteurs prédisposants et favorisants (Tzipori et Widmer 2009 ; Thompson et Ash., 2016 ; Feng et Xiao., 2017 ; Squire et Ryan., 2017 ; Gong *et al.*, 2017 ; Khan *et al.*, 2018 ; Nahavandi *et al.*, 2019).

### **III.2. Épidémiologie analytique chez les ruminants**

#### **III.2.1. Sources de parasites**

##### **III.2.1.1 Les jeunes ruminants**

Les jeunes animaux infectés du troupeau sont les sources principales de cryptosporidies. Ils rejettent des oocystes dans leurs fèces en grande quantité, en particulier pendant la deuxième semaine de leur existence. Dans la majorité des cas, l'excrétion d'oocystes est concomitante de l'épisode de diarrhée. Cela étant, l'excrétion d'oocystes a aussi été démontrée hors épisode de diarrhée, avec des prévalences importantes (Fayer, 2004).

Santin *et al.*, (2008) ont montré dans un élevage de vaches laitières dans le Maryland que la prévalence d'excrétion d'oocystes de *C. parvum* est plus importante chez les veaux avant le sevrage (1 à 8 semaine d'âge) que pour des veaux après le sevrage (3 à 12 semaines d'âge) et que pour des génisses entre 1 et 2 ans. Des résultats similaires avaient été trouvés par Santin *et al.*, en 2004 chez des bovins de 15 fermes laitières de la côte Est des États-Unis avec une prévalence de 35,5% chez les 5 jours-8 semaines et de 19,7% chez les 3 mois-11 mois.

De plus, Santin *et al.*, ont montré en 2004 que *C. parvum* était l'espèce présente dans 85% des cas chez les moins de 2 mois, et dans seulement 1% des cas chez les 3 mois-11 mois.

Ainsi, quand on dit que ce sont les jeunes animaux la source la plus importante d'oocystes, c'est à plus forte raison les jeunes animaux avant le sevrage. En effet, on voit non seulement que la prévalence est plus élevée chez les jeunes en pré-sevrage, mais que se sont ces derniers qui sont touchés par la principale espèce d'intérêt en médecine vétérinaire et humaine, à savoir *C. parvum*. Ces résultats sont en accord avec ceux de multiples autres études similaires réalisées à travers le monde référence (Feng *et Xiao.*, 2017 ; Baroudi *et al.*, 2017, 2018 ; Mammeri *et al.*, 2019 ; Feng *et al.*, 2019).

En ce qui concerne la quantité d'oocystes excrétés, elle varie fortement d'un individu à l'autre. Des expériences ont montré que des veaux infectés par  $10^5$  oocystes excrètent  $10^9$  à  $10^{10}$  oocystes pendant 7 à 10 jours (Fayer, 2004).

Le niveau d'excrétion moyen pour un veau infecté et clinique est de  $10^7$ . D'autres études ont montré un taux d'excrétion journalière chez des veaux allant de  $4.10^2$  à  $4.10^7$  oocystes par gramme de fèces (Fayer *et al.*, 1998).

Chez des animaux immunocompétents, la période patente, c'est-à-dire le temps pendant lequel des oocystes sont excrétés, peut durer d'une à plusieurs semaines. Elle est de 6 à 9 jours le plus souvent. L'excrétion peut devenir intermittente sur la fin (Fayer *et al.*, 1998 ; Chartier, 2002).

### **III.2.1.2. Les ruminants adultes**

Les animaux adultes peuvent également transmettre le parasite à leur progéniture lorsqu'ils sont porteurs. Ces animaux peuvent aussi avoir un rôle de réservoir puisqu'ils excrètent de façon continue, et participent donc à la pérennisation de l'infection dans les élevages (Paoletti, 2002).

L'existence d'une transmission in utero chez les bovins a été suggérée car des veaux retirés de sous leur mère immédiatement après la naissance et mis dans des locaux extrêmement bien désinfectés ont quand même développé la maladie (Fayer, 2004).

Chez les bovins adultes, chez qui la prévalence de *C. parvum* peut parfois atteindre 100%, le niveau d'excrétion est plus bas, de 900 à 18000 oocystes par gramme de fèces. Aucune variation d'excrétion liée à la mise-bas n'a été mise en évidence et le lien épidémiologique avec la Cryptosporidiose des veaux n'est pas établi mais fortement suspecté (Chartier et Paraud, 2010).

Chez les adultes, l'espèce la plus souvent retrouvée est *C. andersoni* (Santin *et al.*, 2008).

Chez la brebis, l'excrétion d'oocystes de *C. parvum* ne se produisant qu'au moment de la mise bas n'est pas décelable en dehors de cette période (Chartier et Paraud, 2010).

Enfin, chez les caprins, les seules données connues montrent une excrétion résiduelle chez des animaux âgés de 12 mois (Chartier et Paraud, 2010).

### **III.2.1.3. Les autres espèces animales**

Il semble qu'une transmission inter espèces peut s'effectuer par le biais des fèces. Ainsi, on sait que *C. parvum* est transmissible à de nombreuses espèces, notamment les rongeurs, les chevaux et les hommes (Radostits *et al.*, 2007) ; il est donc évident que ces derniers participent aussi à la propagation de l'agent pathogène au sein d'un élevage.

De plus, Fayer *et al.* (2000) indiquent que certains animaux peuvent jouer le rôle de transporteurs passifs, comme les mouches, certains organismes microscopiques nommés rotifères et certains oiseaux migrateurs.

#### **III.2.1.4. L'eau**

Les cas de cryptosporidiose ayant une origine hydrique sont fréquents dans l'espèce humaine. Ainsi, il est supposé que des cas dus à une consommation d'eau contaminée peuvent exister chez les ruminants, même si ce problème n'a pas été étudié en profondeur.

La source principale de contamination, quelle que soit l'espèce, sont donc les animaux en pré-sevrage. Ces derniers excrètent des quantités très importantes d'oocystes. Les animaux adultes ou d'autres animaux, notamment des rongeurs, peuvent également être des sources, mais dans une moindre mesure étant donné les niveaux d'excrétion plus bas et représentent cependant une source d'infection continue.

### **III.2.2. Facteurs favorisants**

#### **III.2.2.1 Espèce**

Parmi les ruminants domestiques, les caprins sont les plus sensibles à la cryptosporidiose, suivis des bovins puis des ovins. Par ailleurs, l'espèce parasitaire retrouvée majoritairement chez les veaux, chevreaux et agneaux est *C. parvum*.

Chez les animaux adultes, les bovins sont infectés le plus par *C. bovis*, *C. andersoni* et *C. ryanae*. Chez les ovins, on retrouvera, en plus de *C. parvum*, *C. xiaoi*, *C. hominis* et *C. ubiquitum*. Par ailleurs, *C. parvum* est largement dominant chez les chèvres (Chartier et Paraud, 2010).

#### **III.2.2.2. Race**

Nous avons vu plus haut que chez les races laitières, la prévalence de la maladie était plus importante que chez les races allaitantes. Ceci n'est pas réellement dû à un effet « race » d'après Chartier et Paraud (2010) mais plutôt influencé par les modes d'élevages liés à telle ou telle race, les allaitants étant souvent élevés de manière plus extensive. Cette affirmation est remise en cause par Xiao et Fayer (2008) qui citent une étude de Kvac et *al.* (2006) ayant montré que dans des conditions d'élevage identiques, des veaux de race allaitante étaient moins atteints que des veaux laitiers.

#### **III.2.2.3. Âge**

Selon Santin et *al.* (2008), la source principale d'oocystes était les veaux âgés entre 1 et 8 semaines, dont la prévalence d'excrétion est 2 fois supérieure à celle de veaux âgés entre 3 et 12 mois, et plus de 10 fois supérieure à celle des génisses entre 1 et 2 ans d'âge. De plus, les veaux âgés entre 1 et 8 semaines excrètent principalement *C. parvum*, à 98%. Les infections des tranches d'âge supérieures sont dues à des espèces au pouvoir pathogène bien moindre (*C.*

*bovis*, *C. ubiquitum*, *C. andersoni*). Ainsi, l'ensemble de ces données porte à penser que les animaux jeunes avant sevrage sont plus réceptifs et sensibles à l'infection.

D'après Chartier et Paraud (2010), les animaux jeunes sont plus réceptifs, surtout en dessous de l'âge de 3 semaines. Castro-Hermida et *al.* (2002a) affirment qu'il existe une association significative entre l'âge et le risque d'être infecté par la cryptosporidiose uniquement pour les animaux de moins de 30 jours. Ces mêmes auteurs ont montré que la période à plus haut risque dans les 30 premiers jours de vie était située entre 9 et 12 jours d'âge lors d'une étude expérimentale réalisée sur 32 veaux. Tous les animaux de cette étude finissaient par contracter la maladie avant l'âge de 18 jours, alors qu'ils étaient élevés séparément et dans de très bonnes conditions d'hygiène ; l'origine de l'infection avait dans cette étude été imputée à l'eau de boisson des animaux qui aurait été contaminée.

### **III.2.2.4. Statut immunitaire**

L'immunocompétence joue également un rôle essentiel dans la réceptivité à la maladie ; ainsi, une immunodéficience, qu'elle soit naturelle et liée à l'âge, ou acquise suite à une affection intercurrente, une maladie ou à une thérapeutique immunosuppressive, va favoriser l'apparition de la maladie.

En effet, la qualité du colostrum rentre en compte, ceci est en relation avec le transfert des immunoglobulines. Le statut nutritionnel et en particulier celui en oligo-élément a également été relevé comme facteur de réceptivité, notamment en ce qui concerne des taux faibles en sélénium (Chartier et Paraud, 2010).

La présence de pathologies associées, et plus particulièrement d'atteintes entériques, joue également un rôle en facilitant la contamination lorsque les animaux sont affaiblis. Ainsi, des expériences menées en Algérie chez des veaux ont montré que les animaux issus de troupeaux vaccinés contre le coronavirus, le Rotavirus et *E. coli* excrétaient significativement moins de cryptosporidies que ceux provenant de cheptels non vaccinés (Adjou, 2011).

Les facteurs de réceptivité ont non seulement un rôle dans l'apparition des symptômes mais peuvent aussi avoir un rôle en augmentant les taux de mortalité dus à la maladie (Chartier et Paraud, 2010). La réceptivité est donc liée à l'espèce, à l'âge de l'animal, et à son niveau immunitaire ; les chevreaux sont les plus sensibles, suivi des veaux puis des agneaux.



### **III.3. Épidémiologie chez l'homme**

#### **III.3.1. Épidémiologie dans le monde**

##### **III.3.1.1. Prévalence de la cryptosporidiose**

La cryptosporidiose est une infection cosmopolite signalée pratiquement sur tous les continents, avec une incidence et une prévalence variables dans le monde entier. La prévalence de la cryptosporidiose maladie chez les sujets immunocompétents est estimée de 1 à 3 % dans les pays développés contre 3 à 16% dans les pays en développement (Tzipori, 1988 ; Current *et* Garcia 1991 ; Ripert *et* Guyot, 2003 ; Guyot *et al.*, 2012). Ce sont les enfants qui sont les plus infectés, la cryptosporidiose peut atteindre 7% des enfants diarrhéiques des pays développés et 12% chez ceux des pays en développement. Par contre, la population la plus susceptible est celle des sujets immunodéprimés, surtout les sujets malades de Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA), la prévalence étant de 14% dans les pays développés et de 24% dans les pays en développement (Chen *et al.*, 2002 ; Nahrevanian *et* Assmar 2008). Cette prévalence varie également en fonction des méthodes de diagnostic utilisées : PCR, ELISA ou microscopie optique (Hira *et al.*, 2011).

Cependant, chez l'homme, la sensibilité à l'infection dépend de l'âge, de l'état immunitaire du sujet et de son état nutritionnel. De nombreuses études montrent une plus grande sensibilité et une plus grande fréquence de la cryptosporidiose chez les jeunes enfants de moins de 4 ans (Newman *et al.*, 1999 ; Bern *et al.*, 2000 ; Areeshi *et al.*, 2008).

En conséquence, c'est dans les pays en développement que la cryptosporidiose montre des taux les plus lourds en raison de la dissémination de la malnutrition chez les enfants et de la prévalence la plus élevée d'infection au HIV. Et donc, ce sont certains pays de ces zones géographiques de ces régions qui sont les plus touchés, en particulier en Afrique (Fergusson *et* Tomkins, 2009 ; Squire *et* Ryan, 2017).

##### **III.3.1.2. Caractérisation moléculaire des espèces et sous-types de *Cryptosporidium* spp.**

*C. hominis* et *C. parvum* sont les principaux agents responsables de la cryptosporidiose humaine chez les individus immunocompétents et immunodéprimés et leur prévalence varie selon les régions du monde. Des études épidémiologiques ont montré que *C. hominis* est plus répandue en Australie, en Europe occidentale, en Inde et en Afrique (Fournet *et al.*, 2013; Helmy *et al.*, 2013; O'Brien *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2013 ; Squire *et* Ryan, 2017), alors que *C. parvum* est plus fréquent au Chili, en Turquie, au Moyen-Orient et en Thaïlande

(Alyousefi *et al.*, 2013; Iqbal *et al.*, 2011; Neira *et al.*, 2012; Nuchjangreed *et al.*, 2008; Taghipour *et al.*, 2011; Usluca *et al.*, 2011). Aussi, *C. meleagridis* a été confirmé comme étant un agent pathogène humain émergent (Cama *et al.*, 2008). Des outils moléculaires ont permis de mieux comprendre la taxonomie de *Cryptosporidium* et son épidémiologie. L'analyse de la séquence (gène) de la glycoprotéine de 60 kDa a permis de classer *C. parvum* et *C. hominis* dans plusieurs familles de sous-types (Xiao, 2010).

On sait aujourd'hui que la plupart des épidémies dans le monde ont été causées par l'espèce anthroponotique *C. hominis* et sa caractérisation a permis l'identification du sous-type de la famille Ib dans la plupart des cas de cryptosporidiose. Le sous-type Ib avait des sous-types très différents à partir desquels les enquêtes ont identifié IbA9G3 et IbA10G2 que l'on trouve couramment dans la plupart des régions du monde (Leav *et al.*, 2002 ; Alves *et al.*, 2006; Cama *et al.*, 2008; Chalmers *et al.*, 2005; Gatei *et al.*, 2006b; Xiao, 2010 ; Fournet *et al.*, 2013). En effet, le sous-type IbA10G2 de *C. hominis* était l'agent associé à l'épidémie de cryptosporidiose d'origine hydrique de Milwaukee en 1993 (Corso *et al.*, 2003). En revanche, dans les pays en développement, certaines enquêtes épidémiologiques ont révélé la présence *C. hominis* de la famille Ie (Alyousefi *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2009; Gatei *et al.*, 2008; Sulaiman *et al.*, 2005). De même, d'autres sous-types rares des familles Id et If ont été rapportés (Sulaiman *et al.*, 2005 ; Trotz-Williams *et al.*, 2006 ; Hijjawi *et al.*, 2010 ; Nazemalhosseini-Mojarad *et al.*, 2011 ; Taghipour *et al.*, 2011).

Par ailleurs, la famille du sous-type *C. parvum* Ila est responsable de la majorité des infections dues à cette espèce. En particulier, les sous-types IlaA15G2R1, IlaA16G1R1, IlaA17G2R1 et IlaA19G2R1 sont responsables de la cryptosporidiose zoonotique et ont été découverts chez l'homme et les ruminants. Ces sous-types sont décrits dans de nombreuses zones géographiques du monde, en particulier le sous-type IlaA15G2R1, connu comme le sous-type principal de *C. parvum*. Il est fréquemment isolé dans des cas de cryptosporidiose humaine au Portugal, en Slovénie, aux Pays-Bas et en Irlande du Nord. C'est le sous-type commun identifié aussi chez les veaux (Feltus *et al.*, 2006; Jex et Gasser, 2008; Soba et Logar, 2008; Xiao, 2010). Le sous-type IId a été détecté chez des patients VIH dans de multiples régions au monde et a également été identifié chez des agneaux et des veaux (Khan *et al.*, 2018). Une forte présence de sous-type zoonotique de *C. parvum* familles (Ila et IId) ont, cependant, été détectés dans des études en Egypte, en Ethiopie et en Tunisie qui sont signalées par Squire et Ryan en 2017. Cependant, une autre famille de sous-types, IIC décrite

uniquement chez l'homme, est également responsable de la transmission de la Cryptosporidiose principalement dans les pays en développement (Wheeler *et al.*, 2007; Xiao et Feng, 2008). Ce sous-type de *C. parvum* transmis principalement par voie anthroponique a été souvent décrit dans les pays africains (Squire et Ryan, 2017). Par ailleurs, il existe plusieurs autres espèces de *Cryptosporidium*, y compris *C. meleagridis*, *C. canis* et *C. felis* qui auraient été associés à des cas humains, en particulier dans les pays en développement (Xiao et Feng, 2008 ;Khan *et al.*, 2018).La saisonnalité est également associée aux variations de l'incidence de la cryptosporidiose à travers le monde. Généralement, dans les pays développés, l'incidence atteint son maximum en été lorsque les personnes nagent plus souvent (Naumova *et al.*, 2005; Yoder, Harral et Beach, 2010; Yoder *et al.*, 2012 ; Loganathan *et al.*, 2012) et les parasites sont très résistants à la désinfection au chlore (Yoder *et al.*, 2010). En revanche, dans les pays en développement, la prévalence de la cryptosporidiose peut être plus élevée pendant les pluies en raison des forts ruissellements qui peuvent probablement contaminer les sources d'eau en particulier dans les pays tropicaux (Abd El Kader *et al.*, 2012; Iqbal *et al.*,2011). La cryptosporidiose a été également reconnue comme une cause importante de diarrhée du voyageur (Paschke *et al.*, 2011).

### **III.3.2. Epidémiologie en Algérie**

En Algérie, la cryptosporidiose est une parasitose négligée non diagnostiquée systématiquement dans les laboratoires de parasitologie. En dehors, d'un cas de cryptosporidiose humaine survenu à l'hôpital El Hadi Flici (ex El Kettar) à Alger en 1992, il n'existait pratiquement pas d'étude sur la cryptosporidiose en santé humaine. Parmi les quelques rares études, Benouis *et al.*(2013) ont rapporté une prévalence de 0,4 % de *Cryptosporidium sp.* en utilisant la méthode de coloration microscopique de Ziehl-Neelsen dans une étude épidémiologique des parasitoses intestinales humaines au niveau du C.H.U. d'Oran. Cette enquête s'est effectuée chez 1042 personnes âgées de quelques jours à 80 ans (Benouis *et al.*, 2013). En revanche, dans une étude récente sur des sujets immunodéprimés par acquisition du syndrome d'immunodéficience à l'hôpital El Hadi Fléci Ex El-Kettar, à d'Alger, la prévalence de cryptosporidiose chez ces malades était de 9% sur un effectif de 350 individus, dont 22 étaient amplifiés avec succès au niveau des loci de l'ARNr 18S et de la gp60. D'après l'analyse de séquences : 68,2% ont été identifiés comme *Cryptosporidium parvum* avec les sous-types familiaux IIa (n=7) et IIc (n=8), alors que

5 cas (22,7%) ont révélé la présence de *C. hominis* avec les sous-types familiaux Ia (n=2) ; Ib (n=3) et 9% (2/22) de *C. felis* (Semmani *et al.*, 2019).

Plusieurs facteurs sont étroitement associés à la transmission de la cryptosporidiose : distribution large dans l'environnement, résistance du parasite, la dose minimale infectante et l'infection par le parasite d'une grande variété d'animaux (Caccio *et al.*, 2005).

La transmission chez l'homme zoonotique, anthroponitque ou indirecte par l'environnement Hunter et Thompson., 2005 ; Caccio et Pozio., 2006).

**CHAPITRE IV : METHODES DE DIAGNOSTIC ET D'ETUDE DE *CRYPTOSPORIDIUM***

**IV.1. Méthodes classiques de détection et d'identification de *Cryptosporidium spp.***

De nombreux microorganismes peuvent provoquer de la diarrhée chez les jeunes ruminants et des techniques de diagnostic précises sont donc nécessaires afin d'identifier les différents agents infectieux en cause (Fayer et Ungar, 1986). Dans les années 70, le diagnostic de la maladie dépendait de l'examen histopathologique des tissus intestinaux affectés (Current et Garcia, 1991). Depuis les années 80, la détection sur matières fécales est possible suite au développement de nombreuses techniques de purification et de concentration des oocystes. Mais de nos jours, la biologie moléculaire est mise à profit pour une détection encore plus sensible et spécifique (Xiao, 2010).

Les symptômes rencontrés dans les infections par les cryptosporidies sont communs à d'autres maladies infectieuses à tropisme digestif. Par conséquent, les moyens doivent être suffisamment spécifiques pour permettre de poser un diagnostic de certitude valable. Ainsi, le diagnostic de la cryptosporidiose repose sur la mise en évidence de la forme de résistance, l'oocyste (Geurden *et al.*, 2006 ; Brook *et al.*, 2007). La mise en évidence des oocystes peut se faire de façon directe, à l'aide de techniques de coloration appliquées à des échantillons coproscopiques (par exemple, Heine, Ziehl-Nielsen modifié) ou bien par marquage, avec des anticorps monoclonaux fluorescents (immunofluorescence : IF). Des tests ELISA ciblant les antigènes de *Cryptosporidium spp.*, sont également disponibles et peuvent être utilisés lors de la recherche du parasite (Fayer *et Xiao*, 2007). D'autre part, la mise en évidence du parasite peut se faire de façon directe à l'aide de la biologie moléculaire et notamment par Polymerase Chain Reaction (PCR) ciblant un gène propre au genre *Cryptosporidium*.

**IV.1.1. Techniques de concentration**

Les méthodes de détection ou d'identification du parasite peuvent être précédées par des méthodes de concentration ; par sédimentation, flottation ou immunoséparation magnétique. Ces techniques permettent de concentrer les oocystes de *Cryptosporidium spp.* dans le culot et d'éliminer un maximum de débris (végétaux, matières grasses présentes dans les matières fécales des jeunes animaux etc...). L'utilisation de ces techniques dépend des laboratoires, des types d'échantillons à traiter et des types d'études à réaliser sur les prélèvements. En effet, l'efficacité de la détection est augmentée en utilisant certains produits : du formol pour la

fixation et la conservation des parasites et de l'éther : pour l'élimination des matières grasses (Allen *et* Ridley, 1970 ; Fayer *et* Xiao, 2007). En revanche, la technique de concentration à l'acétate d'éthyle a présenté de très bons résultats avec une prise d'essai de 1 gramme de matières fécales provenant d'animaux non sevrés (Castro-Hermida *et al.*, 2005). Ces auteurs rapportent que le seuil de détection de cette technique est estimé à 100 oocystes par gramme de fèces (opg).

Ces techniques sont fiables pour la concentration des oocystes de cryptosporidies. Elles permettent de purifier les échantillons et une meilleure détection des oocystes lors de la lecture microscope en Immunofluorescence (Kar *et al.*, 2011). En revanche, durant les différentes étapes de réalisation de ces techniques de concentration, des oocystes pouvaient être perdus (Weber *et al.*, 1991 ; Fayer *et al.*, 2000b). Cette perte peut donc avoir de l'importance surtout lorsque l'on travaille avec des matières fécales qui sont très peu chargées en oocystes (entre 100 et 1000 opg). Les produits chimiques utilisés pouvaient parfois interférer avec les méthodes de détection et diminuer leur sensibilité comme la PCR. (Ma *et* Soave, 1983 ; Casemore *et al.*, 1985).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus sur les techniques de concentration des oocystes de cryptosporidies. En effet, selon les laboratoires, les techniques utilisées sont différentes, sans doute du fait de la grande variabilité des échantillons à tester et du matériel disponible (Fayer *et al.*, 2000 ; Castro-Hermida *et al.*, 2005a et b ; Santín *et al.*, 2004, 2008 ; Coklin *et al.*, 2007 ; Silverlås *et al.*, 2010a et b).

### **IV.1.2. Techniques de coloration microscopique**

Les techniques de coloration des cryptosporidies sont nombreuses : Heine, Auramine-Phénol, Ziehl-Neelsen modifiée, Lugol, Giemsa, Safranine etc (Tyzzer, 1910, 1912 ; Henriksen *et* Pohlenz 1981 ; Heine, 1982 ; Ma *et* Soave, 1983 ; Garcia *et al.*, 1983 ; Heuschele *et al.*, 1986 ; Smith dans Fayer *et* Xiao, 2007). Ces méthodes peuvent détecter les oocystes chez l'animal malade, mais ne sont pas suffisamment sensibles pour détecter l'infection chez l'animal asymptomatique (Quílez *et al.*, 1996 ; Morgan *et al.*, 1998 ; Clark *et al.*, 1999). Les techniques de Ziehl Neelsen modifiée et Heine (variante de la technique de Ziehl Neelsen) sont les plus utilisées pour détecter les oocystes de *Cryptosporidium* spp présents dans les matières fécales (Casemore *et al.*, 1991 ; Webser *et al.*, 1996 ; Brook *et al.*, 2007 ; Fayer *et*

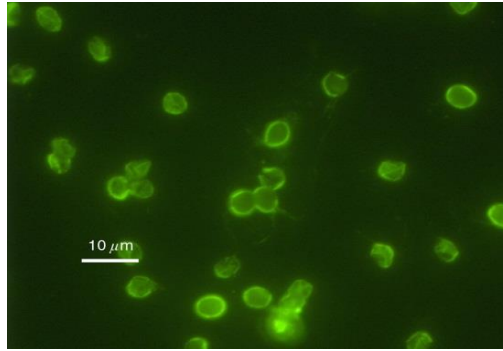
Xiao, 2007). Le diagnostic de routine est très souvent réalisé à l'aide de ces méthodes du fait du haut niveau d'excrétion en oocystes des animaux diarrhéiques atteints de Cryptosporidiose (Chartier *et al.*, 2002 ; Trotz-Williams *et al.*, 2005a, 2007). Ces deux techniques donnent des résultats similaires lors d'infection expérimentale chez le veau (Kar *et al.*, 2011). Les variations de consistance des fèces peuvent également influencer sur la facilité de détection des oocystes de *Cryptosporidium spp* par les méthodes de coloration (Weber *et al.*, 1991 ; Webster *et al.*, 1996).

### **IV.1.3. Méthodes immunologiques**

Il existe différentes techniques pour la détection immunologique des oocystes de cryptosporidies. Certaines sont plus pratiquées que d'autres pour des raisons multiples (sensibilité, spécificité, coût, disponibilité...). Le principe de ces techniques est la mise en évidence du parasite par un marquage aux anticorps monoclonaux ou polyclonaux avec une coloration à la fluorescence. Plusieurs techniques sont utilisées en fonction du colorant utilisé et moyen de lecture (IF, DAP, DAPI, ELISA, immunochromatographie ...).

#### **IV.1.3.1. Immunofluorescence directe**

La technique d'immunofluorescence avec anticorps monoclonaux colorés permet d'améliorer la détection des oocystes dans les matières fécales avec une sensibilité plus élevée. La technique est pratiquée en utilisant des kits commerciaux utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de surface de l'oocyste couplés à un fluorochrome (l'isothiocyanate de fluorescéine : FITC) sont largement utilisés. Il existe différents anticorps monoclonaux (Arrowood et Sterling, 1989 ; Jex *et al.*, 2008). Une excitation UV permet la visualisation des oocystes qui apparaissent colorés en vert. Un des kits utilisés dans la littérature est le kit commercial Merifluor® (Xiao et Herd, 1993 ; Garcia et Shimizu, 1997 ; Johnston *et al.*, 2003 ; Geurden *et al.*, 2006 b). Ce kit permet de visualiser à la fois les kystes de *Giardia*, autre protozoaire intestinal, et les oocystes de *Cryptosporidium spp* (Garcia et Shimizu, 1997 ; Johnston *et al.*, 2003 ; Geurden *et al.*, 2000). Il a été mis au point pour la détection des deux principales espèces retrouvées chez l'homme : *C. hominis* et *C. parvum*. Les oocystes de cryptosporidies sont ronds ou légèrement ovoïdes et apparaissent vert comme sous filtre FITC (Figure 8).



**Figure 8:** Observation d'oocystes de *C. parvum* à l'immunofluorescence, Kit mérifluor.  
(UMR BIPAR, 2017)

Cette technique peut être quantitative. En effet, en plus de pouvoir visualiser les oocystes, il est possible de les compter (en pesant les matières fécales utilisées et en comptant les oocystes présents dans un volume connu) et par une règle de calcul simple, connaître le nombre d'oocystes présents dans l'échantillon de départ. Par calcul, la limite de détection de la technique (concentration et IF) est de 100 oocystes par gramme de fèces pour une prise d'essais de 1 gramme.

#### **IV.1.3.2. Technique d'ELISA**

La technique ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) repose sur la détection des antigènes de surface des oocystes de *Cryptosporidium sp.* (Garcia et Shimizu, 1997 ; Johnston et *al.*, 2003). De nombreux kits sont commercialisés. Cette technique ne permet pas la quantification des oocystes (Chartier et *al.*, 2002).

#### **IV.1.3.3. Technique d'immuno-chromatographie**

Des kits de diagnostic rapide par immuno-chromatographie (IC) ont également été mis au point pour détecter *Cryptosporidium spp.* Il s'agit de bandelettes sur lesquelles sont fixés des anticorps dirigés contre des antigènes solubles de *Cryptosporidium spp.* Ces derniers, présents dans les matières fécales, migrent sur la membrane où sont fixés les anticorps. La liaison antigène-anticorps est révélée par une bande de couleur (Fayer et Xiao, 2007).

De nombreuses études sur la sensibilité et la spécificité de ces techniques ont été effectuées. Johnston et *al.* (2003), ont rapporté que les deux techniques de détection, IF et ELISA présentaient une spécificité élevée, comprise entre 96 et 100%. La sensibilité de ces techniques comparées aux techniques de coloration reste cependant discutée. En effet, pour



certain auteurs, les techniques immunologiques seraient plus sensibles que les techniques de colorations (Garcia et *al.*, 1987 ; Arrowood et Sterling, 1989 ; Weber et *al.*, 1991 ; Kehl et *al.*, 1995 ; Johnston et *al.*, 2003 ; Smith dans Fayer et Xiao, 2007) tandis que pour d'autres, elles présenteraient la même sensibilité que les techniques de coloration (Geurden et *al.*, 2006 ; Brook et *al.*, 2007). Les techniques immunologiques présentent généralement une plus grande spécificité que les techniques de coloration dans la détection de *Cryptosporidium spp.* mais sont aussi moins rapides et plus coûteuses.

### **IV.2. Identification de *Cryptosporidium spp.* par les méthodes de biologie moléculaire**

Les outils moléculaires ont d'abord été utilisés dans un contexte de recherche et d'études épidémiologiques notamment sur la transmission de *Cryptosporidium parvum* entre les ruminants et l'homme (Xiao et Ryan, 2004 ; Cacciò et *al.*, 2005). Aujourd'hui, ils sont principalement employés pour détecter et caractériser les différentes espèces et génotypes de *Cryptosporidium* chez l'homme, les animaux et lors de l'analyse de l'eau (Xiao, 2010).

#### **IV.2.1. Extraction de l'ADN de *Cryptosporidium spp.***

Afin de pouvoir procéder à l'identification de l'espèce en présence, il est nécessaire d'extraire l'ADN d'intérêt. A ce jour, l'efficacité de la plupart des méthodes décrites n'est pas complètement définie (Fayer et Xiao, 2007 ; Smith et Nichols, 2010). Cette étape est cependant cruciale. En effet, si l'extraction n'est pas optimale, le résultat obtenu par la suite risque d'être faussé surtout lors du traitement d'échantillons peu chargés en oocystes.

L'extraction peut se faire selon différentes méthodes : soit à partir d'échantillons concentrés, soit directement à partir des matières fécales (Boom et *al.*, 1990 ; Ward et Wang, 2001 ; Bialeck et *al.*, 2002 ; Nichols et Smith, 2004 ; Nichols et *al.*, 2006). De nombreux kits d'extraction sont commercialisés, certains sont manuels et d'autres préparés pour une utilisation en association avec un extracteur automatique (Xiao et Ryan, 2007).

#### **IV.2.2. Les réactions d'amplification en chaîne par polymérase (PCR)**

Les techniques de détection d'acide nucléique permettent l'identification de l'espèce de *Cryptosporidium spp.* et sont reconnues comme étant théoriquement plus sensibles que les techniques immunologiques et de coloration (Webster et *al.*, 1996 ; Monis et *al.*, 2005 ; Geurden et *al.*, 2006 b ; Smith et *al.*, 2006 b ; Xiao et Ryan, 2007 ; Jex et *al.*, 2008). Il existe des PCR ciblant différents sites sur le génome (18S, HSP70, COWP...).

La PCR est ainsi décrite comme étant plus sensible que les techniques de diagnostic conventionnelles pour détecter la présence de *Cryptosporidium* dans les matières fécales, bien que la sensibilité des méthodes PCR publiées soit variable. Geurden *et al.* (2006) ont rapporté une spécificité de 100% et une sensibilité de 59 à 79% (selon les protocoles de nested-PCR) comparées aux techniques de microscopie et immunologiques (IF et ELISA). Il a été montré que les PCR nichées étaient plus sensibles et spécifiques que les PCR en un seul tour (Xiao *et al.*, 1999, 2001).

### **IV.2.2.1. Amplification du gène ADN<sub>r</sub>18S par PCR 18S**

La PCR nichée ciblant le locus ADN<sub>r</sub>18S (PCR 18S) est utilisée dans la majorité des études d'épidémiologie moléculaire conduites chez les ruminants. En effet, un grand nombre de copies (20 copies) de cette cible est présent dans le génome de *Cryptosporidium* (Xiao, 2010). De nombreuses études ont été réalisées concernant les amorces à utiliser lors de la réalisation d'une PCR 18S (Johnson *et al.*, 1995 ; Xiao *et al.*, 1999, 2001 ; Ward *et al.*, 2002 ; Nichols *et al.*, 2003). Il a été montré que les amorces décrites par Nichols *et al.* (2003) étaient les plus sensibles, en particulier sur des échantillons contenant peu d'oocystes (moins de 10 oocystes), et que les amorces décrites par Xiao *et al.* (1999) avaient l'avantage de détecter un plus grand nombre d'espèces de *Cryptosporidium spp.*

Cependant bien que la PCR soit théoriquement considérée comme l'une des méthodes les plus sensibles pour la détection de *Cryptosporidium spp.* La sensibilité réelle de celle-ci peut être largement réduite dans des échantillons de matières fécales, du fait de l'effet de la matrice (présence de substances inhibitrices) et/ ou du fait d'un trop faible nombre d'oocystes présents dans l'échantillon (Sturbaum *et al.*, 2001 ; Ward *et al.*, 2001 ; Fayer *et al.*, 2006 ; Silverlås *et al.*, 2010a).

La technique de PCR, bien qu'étant la plus utilisée, présente par ailleurs, un inconvénient majeur : elle ne permet pas la détection de l'espèce. Un protocole de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) associé à cette PCR 18S a l'avantage d'identifier l'espèce et de mettre en évidence aussi les infections mixtes.

### **IV.2.2.2. PCR-RFLP pour l'identification de *Cryptosporidium spp.***

La PCR-RFLP (PCR-*Restriction Fragment Length Polymorphism*) est une technique qui permet l'identification des espèces de *Cryptosporidium* préalablement connues et la détection d'infections mixtes. Cette technique est largement utilisée, car plus rapide et moins coûteuse

que le séquençage (Morgan et *al.*, 1999 ; Xiao et Ryan, 2004 ; Trotz-Williams et *al.*, 2006 ; Fayer et Xiao, 2007).

Le principe est le suivant : les produits amplifiés à la suite d'une PCR (18S, COWP) vont être digérés par des enzymes de restriction. Selon les espèces de *Cryptosporidium*, les sites de restriction reconnus par les enzymes ne sont pas localisés au même endroit sur l'ADN amplifié. En analysant le profil des produits digérés sur gel d'agarose, la ou les espèces présentes peuvent être identifiées. La plupart des espèces infectant l'homme et les ruminants sont connues et ont été étudiées en PCR-RFLP (ciblant l'ARN r 18S). Les enzymes de restriction les plus utilisés sont les enzymes : *AseI* ou *VspI*, *SspI*, *DdeI* et *MboII* (Feng et *al.*, 2007). Cette technique présente donc les mêmes limites de sensibilité que la PCR mais apporte des informations supplémentaires pour les échantillons fortement chargés dans lesquels les infections mixtes peuvent être présentes de façon équivalente.

#### **IV.2.2.3. PCR gp60 et identification des sous-types *Cryptosporidium* spp.**

Cette PCR permet l'identification des sous-types et étude de la diversité génétique de *Cryptosporidium* spp. En effet, au sein de certaines espèces telles que *C. parvum*, *C. hominis*, *C. ubiquitum* et *C. meleagridis* des sous-types ont été identifiés (Sulaiman et *al.*, 2005 ; Alves et *al.*, 2003). L'identification de ceux-ci, permet entre autres, de pouvoir apprécier le potentiel zoonotique de certains isolats.

Une des cibles utilisées pour le sous-typage est le gène codant pour la glycoprotéine de surface, gp60. Cette glycoprotéine est localisée à la surface des sporozoïtes et mérozoïtes (stades invasifs) (Cevallos et *al.*, 2000 ; Strong et *al.*, 2000). Une partie de ce gène contient des répétitions micro satellites. Cette cible est largement utilisée pour le sous typage de *C. parvum* et *C. hominis* chez l'homme et est également utilisée dans la majorité des études d'épidémiologie moléculaire conduites chez les ruminants, dans le but d'accéder aux différents sous-types de *C. parvum* excrétés (sous types zoonotiques IIa et IIb) (Alves *etal.*, 2003, 2006 ; Fayer et Xiao, 2007 ; Widmer, 2009). Le motif répété en position 5' du gène codant pour la gp60 correspond à un motif codant pour une sérine : TCA/TCG/TCT. Le nombre de répétitions diffère d'un sous-type à l'autre (Xiao, 2010).

Une nomenclature a été établie pour identifier les différents sous-types de *C. parvum* et *C. hominis*. Ils sont nommés selon leur famille (Ia, Ib... ou IIa, IIb) et le nombre de chaque tri-nucléotide répété (Sulaiman *etal.*, 2005). Le marqueur gp60 est considéré comme l'un des

marqueurs les plus polymorphiques présents dans le génome de *Cryptosporidium* (Alves et al., 2003, 2006, Peng et al., 2003 ; Chalmers et al., 2005 ; Gatei et al., 2007 ; Trotz-Wiliams et al., 2006, Fayer et Xiao, 2007 ; Widmer, 2009 ; Abal-Fabeiro et al., 2013).

### **IV.2.2.4. PCR quantitative ou PCR temps réel**

La PCR quantitative (PCRq) est de plus en plus utilisée pour l'étude de *Cryptosporidium spp.* Cette technique présente plusieurs avantages comparés aux PCR conventionnelles. Elle est plus rapide, ne nécessite pas de séquençage ou de procédé RFLP pour la révélation et permet d'obtenir plusieurs informations simultanément. En effet, elle permet, selon les protocoles, une détection et quantification de ou des espèces de *Cryptosporidium spp.* dans l'échantillon. De plus, cette technique réalisée en une seule étape limite considérablement les contaminations (Jothikumar et al., 2008 ; Hadfield et al., 2011 ; De Waele et al., 2011 ; Hadfield et Chalmers, 2012 ; Burnet et al., 2013 ; Travaillé et al., 2016). Le coût des sondes reste cependant un inconvénient notoire (Fayer et Xiao, 2007 ; Jex et al., 2008).

Dans cette technique de PCRq, plusieurs gènes cibles peuvent être utilisés : ARNr 18S, HSP70, tubuline... (Fontaine et Guillot, 2002 ; Limor et al., 2002 ; Tanriverdi et al., 2002 ; Di Giovanni et LeChevallier, 2005 ; Jothikumar et al., 2008 ; Hadfield et al., 2011). Parmi ceux-ci, le gène codant pour la petite sous unité de l'ARN ribosomal 18S a été décrit comme étant la meilleure séquence cible (Abrahamsen et al., 2004).

### **IV.2.2.5. Séquençage cellulaire**

Troell et al., (2016) ont mis au point une méthode robuste pour générer des données de séquençage du génome entier à partir d'oocystes individuels triés en vue d'une amplification et d'un séquençage ultérieur du génome. Initialement, les cellules triées activées par fluorescence (FACS) ont été obtenues en utilisant des anticorps fluorescents spécifiques des antigènes de surface des oocystes. Ainsi, les cellules individuelles ont un potentiel impressionnant non seulement pour comprendre la véritable étendue de la variation génétique parmi les isolats de différents échantillons infectés, mais également pour détecter plusieurs espèces / sous-types (infection mixte) présents chez le même hôte (Troell et al., 2016).

#### **IV.2.2.6. Génotypage multilocus**

Le marqueur gp60 permet l'identification des sous-types de différentes espèces de *Cryptosporidium spp.* Plus récemment, il a été montré que d'autres marqueurs, majoritairement des micro et mini-satellites, pouvaient être associés et utilisés pour caractériser plus finement les différents sous-types de *C. parvum* et/ou *C. hominis* (Mallon et al., 2003 ; Gatei et al., 2006 ; Tanriverdi et al., 2008 ; Jex et al., 2008 ; Xiao, 2010 ; Quílez et al., 2011). Ces techniques de génotypage multilocus (MLT : Multilocus Typing et MLST : Multilocus sequence typing) sont des outils puissants pour l'étude de la structure génétique des populations de *C. parvum* ou *C. hominis* (Mallon et al., 2003 ; Tanriverdi et al., 2006 ; Fayer et Xiao, 2007 ; Morrison et al., 2008).

Jusqu'à présent de nombreux loci ont été identifiés et testés mais aucun protocole défini n'a été décrit. Les techniques MLST, basées sur les hétérogénéités de séquence des différents loci, donnent des informations plus complètes sur les variations de séquence entre les différents sous-types et mettent en évidence la présence de SNPs (Sulaiman et al., 2001 ; Peng et al., 2003 b ; Chalmers et al., 2005 ; Gatei et al., 2007 ; Wielinga et al., 2008). Les techniques, MLT, sont quant à elles basées sur l'analyse de taille des fragments des produits amplifiés, par électrophorèse capillaire (CE avec des amorces marquées) ou par l'intermédiaire de gel de polyacrylamide haute résolution (Feng et al., 2000 ; Mallon et al., 2003 ; Tanriverdi et Widmer, 2006 ; Tanriverdi et al., 2006 ; Morrison et al., 2008). La technique de MLST est plus longue et plus coûteuse que la technique de MLT (Feng et al., 2000 ; Mallon et al., 2003 ; Tanriverdi et Widmer, 2006 ; Tanriverdi et al., 2006).

Enfin, toutes ces techniques sont utilisées afin de définir les espèces et génotypes du parasite. Cependant, elles ne fournissent pas de données sur la viabilité et l'infectiosité des oocystes de *Cryptosporidium*. Pour obtenir des informations supplémentaires sur ces aspects très importants, les méthodes indirectes, telles que la PCR par transcriptase inverse (RT-PCR) doivent être utilisées. La RT-PCR étant basée sur l'ARNm, qui a généralement une demi-vie très courte, son utilisation fournit une indication plus étroitement corrélée à l'état de viabilité par rapport à l'ADN (Skotarczak, 2010).

### **IV.3. Techniques et outils d'étude de *Cryptosporidium***

Plusieurs efforts se sont déployés pour établir et mettre au point des méthodes plus adaptées afin d'étudier ce parasite. Avant d'aborder ces méthodes d'étude il est nécessaire de définir les aspects à vouloir déterminer chez le parasite à savoir : détecter le parasite, avoir la possibilité de le compter, estimer sa viabilité, son infectiosité et sa virulence. En raison des dangers réels et potentiels, il devient impératif de développer des systèmes capables de vérifier l'efficacité d'un traitement thérapeutique et de passer en revue un large spectre de molécules par criblage haut-débit. Enfin, de nombreux mécanismes concernant le cycle de vie de *Cryptosporidium* et sa relation avec les cellules-hôtes qu'il infecte demeure inconnus (Borowski et al., 2010). Cette incompréhension rend notamment la culture en routine *in vitro* du parasite impossible pour l'instant (Arrowood, 2002), d'où une nécessité de développer des outils également dans cette optique.

#### **IV.3.1. Modèles d'étude de *Cryptosporidium* *in vitro***

La première culture de *Cryptosporidium* fut réalisée en 1983 par Woodmansee et Pohlenz sur des cellules humaines de cancer rectal (HRT). Mais ils n'ont pu observer que le stade asexué (Woodmansee et al., 1983).

Le développement des cultures cellulaires a été important surtout dans les années 90. Cependant, malgré la variété de lignées cellulaires pouvant être infectées par *C. parvum*, des difficultés sont rencontrées dans la persistance de l'intensité de l'infection *in vitro*. Des protocoles standardisés sont utilisés en laboratoire mais d'importantes variations existent (temps d'incubation avec la molécule d'intérêt, analyse, quantification, infectiosité des oocystes utilisés...) rendant la comparaison de résultats délicate (Tzipori, 1998). Cependant le cycle du parasite a été reproduit avec succès dans une large variété de lignées cellulaires. Les cellules épithéliales intestinales paraissent les plus adaptées à la culture de *Cryptosporidium parvum*. Parmi les lignées les plus employées figurent les lignées humaines Caco-2 (*human colonic carcinoma*), RL95-2 (*human endometrial carcinoma*), HT29.74 (*galactose-adapted human colonic carcinoma*), HCT-8 (*human ileocecal adenocarcinoma*), et la lignée canine MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) (Arrowood 2002 ; Borowski et al., 2010). La lignée HCT-8 donne les meilleurs résultats en rendement parasitaire, sans toutefois permettre une multiplication suffisante du parasite pour envisager son utilisation pour la propagation continue. Cette lignée supporte également la plus longue durée de culture : 25 jours (Hijjawi et al., 2001). Une équipe américaine a même réussi en 2008 à infecter avec succès une culture

organoïde de cette lignée cellulaire (HCT-8) avec *C. parvum* (Warren et al., 2008). La plupart des études *in vitro* ont été réalisées avec des oocystes de *C. parvum*. Les oocystes de *C. hominis* ont pu infecter avec succès les lignées cellulaires MDCK (*Madin Darby canine kidney cells*) et MRC-5 (*secondary human lung fibroblast cells*) et Akiyochi et collaborateurs, en 2003 ont montré que *C. meleagridis* TU 1867 était capable d'infecter les cellules MDBK (*Madin Darby bovin kidney cells*) (Karanis et Aldeyarbi, 2011).

Des progrès encourageants ont toutefois été rapportés en culture axénique (Boxell et al., 2008 ; Hijjawi et al., 2004). Ces travaux, menés sur un milieu de culture RPMI-1640, ont permis l'obtention d'un cycle complet de développement de *C. parvum* à partir d'oocystes et ceux 8 jours après inoculation. Les différents stades évolutifs extra cellulaires de *C. parvum* développés en culture axénique pouvaient être visualisés par immunomarquage en utilisant des anticorps anti-sporozoïte et anti-paroi de l'oocyste.

Bien que cette méthode de culture ait été tentée sans succès par certains auteurs (Girouard et al., 2006), d'autres équipes (Rosales et al., 2005 ; Karanis et al., 2008 ; Zhang et al., 2009) ont également observé le développement de certaines étapes *in vitro* en cultures axéniques. De plus, Hijjawi et al., en 2010 ont rapporté également un développement complet du cycle de *C. hominis* en culture axénique. La culture *in vitro* de *Cryptosporidium* spp. est un outil intéressant pour l'étude de la biologie du pathogène et le développement ou l'évaluation de traitements antiparasitaires. Toutefois, elle reste d'un intérêt limité en raison des faibles rendements obtenus ainsi que de l'impossibilité de culture continue.

Le couplage des cultures cellulaires avec des méthodes de détection telles que la PCR ou les techniques d'IEA (*Enzyme ImmunoAssay*) permettent d'évaluer l'infectiosité des oocystes mais également de tester l'efficacité de molécules anti-cryptosporidiennes potentielles (Gargala et al., 1999 ; Shahiduzzaman et al., 2009b).

### **IV.3.2. Modèles d'étude de *Cryptosporidium* *in vivo***

Le modèle animal se présente comme un moyen complémentaire voire comme une alternative à la culture *in vitro*, pour l'étude de l'infection par *Cryptosporidium* spp. et pour la propagation du parasite. Toutefois, la difficulté de cet outil est liée à la relative spécificité d'hôte de certaines espèces.

#### **IV.3.2.1. Le modèle murin**

C'est le modèle le plus utilisé pour des raisons pratiques, de coût, de maintenance et d'entretien. Les souris peuvent être immunocompétentes ou immunodéprimées (génétiquement ou chimiquement).

Les souris immunocompétentes ne sont généralement sensibles à l'infection par *C. parvum* qu'au stade néonatal. Ceci a été rapporté notamment par Sherwood et *al.* en 1982 après avoir testé 8 lignées de souris (dont cinq immunocompétentes). Toutes ces lignées ont développé une infection lorsque le parasite leur a été administré avant l'âge de 4 jours. La sensibilité est toutefois limitée à partir de 21 jours même après injection de cyclophosphamide. Ces observations ont été confirmées après infection de souris BALB/c jusqu'à l'âge de 14 jours par Novak et Sterling, (1991) ou encore par d'autres équipes (Mirza-Qavami et Javid, 2011). D'autres lignées comme les souris «multi-mamate» (*Mastomys coucha*) ont également montré une sensibilité à l'infection par une autre espèce de *Cryptosporidium* : *C. andersoni* (Kváč et *al.*, 2007).

L'utilisation de ces modèles reste limitée car ils sont difficiles à manipuler et l'infection obtenue est transitoire, d'où l'intérêt d'utiliser des modèles adultes même si ces derniers sont peu sensibles à l'infection par *C. parvum*. Pourtant, des souris adultes BALB/c et CD-1, lorsqu'elles sont axéniques (élevées en dehors de tout contact microbien et dépourvues de germes) deviennent susceptibles à l'infection, ce qui suggère le rôle protecteur que pourrait avoir la flore intestinale. L'infection obtenue reste tout de même moins sévère que dans le modèle néonatal (Harp et *al.*, 1988). Des manifestations cliniques intestinales, sont également observées chez les souris C57BL/6 immunocompétentes (Costa et *al.*, 2012) suite à l'inoculation d'oocystes traités avec de l'eau acidifiée (Garza et *al.*, 2008). Les souris immunodéprimées peuvent l'être soit chimiquement soit génétiquement. L'immunosuppression chimique destinée à l'étude de la cryptosporidiose a été obtenue par l'action d'anticorps ou de corticoïdes. Ainsi l'administration d'anticorps monoclonaux anti CD4, anti-CD8, anti-IL2 ou anti-IFG, seuls ou en association (Ungar et *al.*, 1991) permet d'obtenir une infection durable mais dépendante de la durée du traitement (Ungar et *al.*, 1990 ; Ungar et *al.*, 1991). L'immunosuppression chimique, *via* les corticoïdes, permet également le développement d'une cryptosporidiose prolongée chez les souris adultes. La durée et l'intensité de l'infection chronique ainsi obtenue dépendent du fond génétique des souris, du mode d'administration du corticoïde (Dei-Cas et *al.*, 1998) et du type de drogue utilisée, la



dexaméthasone étant la plus communément utilisée (Certad, 2008). Les souris génétiquement modifiées ont également été utilisées : les souris nude (Heine et *al.*, 1984 ; Taylor et *al.*, 1999), les souris déficientes en CMH du type II (Aguirre et *al.*, 1994) mais également les souris SCID. Ces dernières sont déficientes en lymphocytes T et B et ont permis l'obtention d'une infection chronique pour des inocula de *C. parvum* allant de  $10^3$  à  $10^7$  oocystes (Mead et *al.*, 1994 ; Certad et *al.*, 2007 ; Garvey et *al.*, 2010).

### **IV.3.2.2. Le modèle souris SCID traitée à la dexaméthasone**

Certad et ses collaborateurs ont mis au point un modèle de souris SCID traitées ou non à la dexaméthasone (SCID-D, SCID) qui leur a permis d'obtenir une infection durable après l'inoculation de *C. parvum* et de *C. muris* (Certad et *al.*, 2007). Ces résultats se sont avérés être reproductibles. Cependant, le fait le plus marquant fut que les souris infectées avec *C. parvum* (traitées ou non à la dexaméthasone) ont développé des néoplasies intra épithéliales de haut grade au niveau de la région iléo-caecale dès 46 jours post infection (PI) qui progressaient en adénocarcinome intra-muqueux. Ces lésions ont également été observées au niveau de l'estomac (région antropylorique) et du duodénum (Certad et *al.*, 2007). De plus, ce phénomène ne semble pas dépendant de la souche. En effet deux souches de *C. parvum* ont été testées (IOWA et TUM1), toutes deux induisent le développement de néoplasies gastro-intestinales.

### **IV.3.2.3. Autres modèles d'animaux expérimentaux**

Plusieurs autres modèles animaux de cryptosporidiose sont rapportés dans la littérature :

- Le modèle rat immunodéprimé, artificiellement ou génétiquement (Fayer et Lindsay 1997),
- Le modèle hamster (sensible à *C. parvum* et *C. muris*) (Rossi et *al.*, 1990 ; Rasmussen et Healey, 1992 ; Rhee et *al.*, 1999),
- Le modèle gerbilles de Mongolie (*Meriones unguiculatus*) adultes et sensibles à *C. muris*, *C. hominis*, *C. parvum* et *C. andersoni* (Koudela et *al.*, 1998 ; Baishanbo et *al.*, 2005 ; Baishanbo et *al.*, 2006 ; Kváč et *al.*, 2007),
- Le modèle porcelet (Widmer et *al.*, 2000) ou le modèle veau nouveau-né axénique (Widmer et Sullivan, 2012) tous deux sensibles à *C. hominis*.

### **IV.3.3. Nouvelles méthodes pour étudier les interactions hôte-*Cryptosporidium***

La compréhension des interactions hôte-parasite dans les intestins des humains et des ruminants a longtemps été limitée par le manque de méthodes permettant la culture à long terme. La plupart des études ont donc été réalisées avec des lignées cellulaires transformées. De plus, ces lignées cellulaires ne supportent pas facilement l'infection à *Cryptosporidium* et le parasite subit une réplication incomplète (Karanis *et* Aldeyarbi, 2011). Des efforts considérables ont été déployés pour développer de nouvelles méthodes permettant de surmonter ces limitations. Les cellules épithéliales humaines ont été propagées avec succès *in vitro* et peuvent persister pendant au moins 60 jours, contribuant ainsi à l'infection à *C. parvum* (Castellanos-Gonzalez *et al.*, 2013). Un autre modèle a été établi avec des cultures 3D de cellules HCT-8 cultivées dans des fibres creuses qui imitent l'intestin en apportant des nutriments et de l'oxygène de la couche basale vers le haut (Morada *et al.*, 2016). L'infectivité des oocystes d'une culture de 6 semaines produite avec cette méthode a été confirmée dans un modèle murin immunodéprimé à la dexaméthasone. Un modèle 3D humain similaire, utilisant la protéine de soie comme biomatériaux d'échafaudage et une culture de support à long terme (> 17 jours), est également disponible (DeCicco RePass *et al.*, 2017). Le développement d'entérocytes humains et de souris, unités épithéliales intestinales fonctionnelles en culture 3D qui récapitulent les aspects intégraux de l'intestin, constitue également une avancée technologique majeure (Zachos *et al.*, 2016). En effet, ce système a été récemment utilisé comme modèles d'infections par *C. parvum* (Zhang *et al.*, 2016). Enfin, la technologie micro-fluidique «Gut-on-a-Chip», qui expose les cellules cultivées à des mouvements physiologiques semblables à un péristaltisme et à un écoulement liquide, peut être utilisée pour induire les cellules humaines Caco-2 à subir spontanément une morphogenèse robuste des villosités intestinales 3D (Huh *et al.*, 2013, Kim *et* Ingber, 2013). Ces modèles physiologiquement pertinents, qui imitent mieux la complexité intestinale, contribueront sans aucun doute à mieux déchiffrer les interactions *Cryptosporidium*-cellules épithéliales intestinales (Baydoun *et al.*, 2017).

Tout récemment, la découverte du COLO-680N comme plateforme de culture cellulaire pour la production de *C. parvum* fournira un changement radical en ce qui concerne la recherche sur *Cryptosporidium*. Il s'agit du premier système facile à manipuler qui permet la production durable à long terme d'oocystes infectieux à l'échelle du laboratoire. Les cultures de cellules infectées par *C. parvum* peuvent être congelées et stockées. Ce système de culture accélérera la recherche sur *Cryptosporidium* et le développement de médicaments anti-Cryptosporidiens (Miller *et al.*, 2018).

Tout récemment, la découverte du COLO-680N comme plateforme de culture cellulaire pour la production de *C. parvum* fournira un changement radical en ce qui concerne la recherche sur *Cryptosporidium*. Il s'agit du premier système facile à manipuler qui permet la production durable à long terme d'oocystes infectieux à l'échelle du laboratoire. Les cultures de cellules infectées par *C. parvum* peuvent être congelées et stockées. Ce système de culture accélérera les études de recherche sur *Cryptosporidium* et le développement de médicaments anti-Cryptosporidiens (Miller *et al.*, 2018).

### **CHAPITRE V : MOYENS DE LUTTE THERAPEUTIQUE ET CONTROLE DE LA CRYPTOSPORIDIOSE**

La cryptosporidiose est une maladie difficile à contrôler (en raison d'oocystes résistant dans l'environnement, d'une faible dose infectante et de taux élevés d'oocystes sporulés excrétés) et l'infection peut être transmise très rapidement à un groupe d'hôtes sensibles. Les oocystes résistent à de nombreux désinfectants (Chalmers *et* Gilles, 2010 ; Casemore *et* Watkins, 1998), il n'existe aucun vaccin commercial permettant de prévenir la maladie et les options de traitement disponibles sont limitées et reposent souvent sur un traitement de réhydratation (Megank *et al.*, 2014).

L'éradication du parasite dans l'organisme mais également dans l'environnement pose un important problème tant en santé humaine que vétérinaire. En effet, *Cryptosporidium* détient une position unique dans la cellule hôte puisque le parasite est intracellulaire mais extra-cytoplasmique. Cette place le protège de l'action de très nombreuses molécules et explique en partie la résistance de celui-ci aux traitements disponibles sur le marché. De plus, la maîtrise de la contamination de l'environnement est difficile en raison de la très grande résistance des oocystes en milieu naturel mais également en présence de désinfectants usuels.

Il apparaît ainsi que la lutte contre la cryptosporidiose doit se concentrer sur plusieurs axes. Avant toute investigation il faut établir des mesures préventives concernant tant l'hygiène des individus et des locaux que le traitement de l'eau et des aliments. Mettre en place un traitement symptomatique permettant de limiter les signes cliniques chez les malades, puis un traitement étiologique dans le but d'éradiquer le parasite de manière efficace (Shahiduzzaman *et* Dauschies, 2012).

### **V.1. Pratiques de gestion des exploitations agricoles**

Les oocystes de *C. parvum* sont très difficiles à éliminer de l'environnement, une mesure de contrôle consiste à essayer de réduire la contamination de l'environnement en premier lieu. L'élimination fréquente des matières fécales et de la litière contaminée des aires de mise bas et des étables, combinée au nettoyage à la vapeur et à la désinfection à l'aide d'un désinfectant approprié, tel que les désinfectants à base de peroxyde d'hydrogène, peut aider à réduire l'accumulation d'environnement. Un nettoyage en profondeur avec de l'eau très chaude suivie d'un séchage (Harp et Goff, 1998) peut également être efficace car les oocystes sont sensibles aux températures extrêmes (jusqu'à -20 °C et jusqu'à 60 °C) et à la dessiccation (Robertson et al., 1992).

### **V.2. Traitement symptomatique**

#### **V.2.1. Chez les ruminants**

Un traitement de soutien peut être entrepris chez les animaux. S'il est fréquent chez les bovins, il est rarement mis en place chez les ovins et les caprins en raison de la faible valeur économique des animaux à l'âge où ils développent la maladie. Préalablement à la mise en place de tout traitement, l'animal doit subir un examen clinique complet afin d'évaluer le degré de déshydratation, la présence ou l'absence d'acidose, d'une surinfection, d'une hypothermie, d'une hypoglycémie et d'une hyperkaliémie (Smith, 2008). Ainsi, tout animal présentant de la diarrhée associée à des symptômes systémiques, de la fièvre et de l'anorexie, devrait être traité (Constable, 2009).

La fluidothérapie vise à corriger l'hypovolémie, les pertes électrolytiques mais également l'état d'acidose de l'animal. La détermination du volume de fluide à administrer doit tenir compte de l'état de déshydratation du veau, de la nature et du volume de la diarrhée, mais également du fait que seuls 60 à 80% des fluides administrés par voie orale sont absorbés par l'animal. L'équation habituellement utilisée pour calculer les besoins en fluides nécessaires à la correction des pertes dues à la diarrhée est donnée ci-dessous :

$\text{Volume (L)} = \% \text{ de déshydratation} \times \text{Poids du veau (kg)}.$

Le pourcentage de déshydratation est déterminé par l'enfoncement des globes oculaires, la persistance du pli de la peau au niveau de l'encolure et la sécheresse des muqueuses ainsi que par le dosage des gaz sanguins.

L'administration des fluides peut être réalisée par voie orale si l'animal présente un réflexe de succion ou par voie parentérale s'il est léthargique ou déprimé. Dans le cas d'animaux hypothermiques, les fluides doivent être réchauffés avant leur administration afin d'éviter une diminution du débit cardiaque pouvant entraîner la mort de l'animal. Une large variété de réhydratants pour une utilisation par voie orale ou intraveineuse existe sur le marché. En ce qui concerne les veaux hypoglycémiques, une supplémentation en glucose peut être mise en place afin d'obtenir une concentration de 2,5 à 5% de glucose dans le fluide qui sera administré par voie parentérale. De son côté, l'hyperkaliémie tend à se réguler avec la correction de la déshydratation de l'animal : restauration de la perfusion rénale, dilution et redistribution du potassium dans les cellules.

### **V.2.2. Chez l'Homme**

A ce jour, il n'existe aucune molécule complètement efficace contre la cryptosporidiose. Bien que la maladie soit auto-résolutive chez les sujets immunocompétents, elle peut évoluer vers la chronicité et entraîner des signes cliniques graves chez les personnes ayant un système immunitaire défaillant.

Un traitement symptomatique peut être mis en place. Il vise notamment à corriger la déshydratation et les pertes en électrolytes à l'aide d'une fluidothérapie par voie intraveineuse et d'anti-diarrhéiques. L'apport d'un support nutritionnel adéquat est parfois nécessaire chez les individus atteints de la forme fulgurante de la cryptosporidiose. Enfin une antibiothérapie est conseillée lorsque l'infection persiste chez les personnes immunocompétentes (O'donoghue, 1995 et Griffiths, 1998).

Toutefois, chez les patients séropositifs, la restauration de la fonction immunitaire par le biais d'antirétroviraux est d'une importance capitale car elle réduit la sévérité de l'infection et peut aboutir à une guérison tant sur les plans cliniques que microbiologique et histologique (O'donoghue, 1995 ; Griffiths, 1998 ; Zardi *et al.*, 2005 ; Abubakar *et al.*, 2007). En revanche, dans les pays en voie de développement, les traitements antirétroviraux ne constituent pas une solution acceptable en raison de leur faible disponibilité et de leur coût (Abubakar *et al.*, 2007).

### **V.3. Thérapeutique spécifique**

À l'heure actuelle, peu de produits sont homologués pour le traitement ou la prévention de la cryptosporidiose chez les animaux de rente ou chez l'homme. Ceux qui sont disponibles ne

sont pas très efficaces et ne réduiront dans la plupart des cas que la durée de l'excrétion et n'auront que peu ou pas d'effet chez les patients immunodéprimés (Thomson et *al.*, 2017).

### **V.3.1. Antimicrobiens**

#### **V.3.1.1. Antibiotiques**

##### *a)Le sulfate de Paromomycine*

Le sulfate de paromomycine est un antibiotique de la famille des aminoglycosides, produit par des *Streptomyces*. Au niveau structural, elle possède une nature hétérosidique qui associe un radical azoté dérivé de l'inositol (la désoxystreptamine).

Dans le tractus gastro-intestinal, elle est absorbée en petites quantités le long de la membrane apicale des entérocytes garantissant ainsi une efficacité sur les formes intracellulaires du parasite. En revanche, elle se montre sans effet sur les formes extracellulaires (Griffiths, 1998; Tzipori, 1998). Cette faible absorption assure une forte concentration de la molécule localement et entraîne une quasi absence d'effets indésirables associés à son utilisation ainsi qu'un taux très réduit de résidus dans les viandes, ce qui est intéressant dans les filières des agneaux à viande ou des chevreux (Chartier et *al.*, 1996 ; Shahiduzzaman et Dauschies, 2012). La paromomycine se fixerait au site A (Aminoacyl) du ribosome perturbant alors la synthèse protéique qui est très importante pendant le développement asexué du parasite (Marshall et Flanigan, 1992 ; Shahiduzzaman et Dauschies, 2012).

La paromomycine permet une réduction de l'excrétion des oocystes et des signes cliniques chez de nombreuses espèces animales et à différentes doses. Sur les agneaux, l'administration de 100 mg/kg/jour pendant 3 jours consécutifs ou de 200 mg/kg/jour pendant 2 jours consécutifs s'avère efficace induit un arrêt de l'excrétion chez plus de 60% des agneaux traités après le 4<sup>ème</sup> jour de l'étude et 65% des animaux ne présentaient plus de diarrhée après la fin du traitement (Viu et *al.*, 2000). En ce qui concerne le gain de poids des animaux, aucun bénéfice n'a été rapporté et de fortes doses auraient des effets négatifs sur la croissance (Viu et *al.*, 2000 ; Wyatt et *al.*, 2010).

A l'heure actuelle, la paromomycine est commercialisée dans certains pays de l'Europe sous le nom de GABBROVET® en Belgique et de GABBROCOL® en Italie. En revanche, elle n'a pas d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en France pour traiter la cryptosporidiose. Cependant, elle est autorisée pour le traitement des colibacillooses chez les jeunes ruminants.

La paromomycine a démontré son efficacité dans le traitement de la cryptosporidiose chez un très grand nombre d'espèces y compris chez l'Homme. Elle est largement utilisée sur les autres continents chez les Ruminants et constitue la molécule de référence lors de l'évaluation de nouveaux composés anti-cryptosporidiens potentiels.

### *b) Azithromycine*

L'azithromycine est un antibiotique de la famille des macrolides, dérivé de l'érythromycine. Elle est rapidement absorbée par l'intestin et bien qu'incomplète son absorption demeure supérieure à celle de l'érythromycine (Elitok *et al.*, 2005). L'activité des macrolides est liée à l'inhibition de la synthèse protéique par fixation de l'antibiotique sur le site de transpeptidation de la grande sous-unité du ribosome. Elle concernerait les ribosomes du cytoplasme mais également ceux présents dans les mitochondries ou associés au génome extra-chromosomique contenus dans les plasmides des Apicomplexa (Giacometti *et al.*, 1996).

L'azithromycine est un agent anti-cryptosporidien potentiel d'une efficacité variable sur des cultures cellulaires, chez les animaux et les humains immunodéprimés (Griffiths, 1998 ; Shahiduzzaman et Dauschies, 2012).

D'un point de vue strictement thérapeutique, la molécule permettait une élimination de l'infection mais des rechutes étaient observées à l'arrêt du traitement. Ces rechutes pourraient être dues à la présence d'oocystes à paroi fine ayant servi de source de réinfection ou à l'existence d'une infection résiduelle dans les canaux pancréatiques ou biliaires (Rehg, 1991 ; Shahiduzzaman et Dauschies, 2012). Une étude menée par Elitok *et al.* (2005) sur des veaux a montré que l'azithromycine permettait une amélioration significative des signes cliniques, du gain moyen quotidien et une réduction du portage d'oocystes puisque 85% des veaux traités n'étaient plus excréteurs à la fin du traitement. Cette suppression du portage d'oocystes pourrait notamment avoir un effet significatif sur la réduction de la contamination de l'environnement par les oocystes de *C.parvum*. D'un point de vue économique, la dose d'azithromycine la plus efficace pour le traitement de la cryptosporidiose serait de 1500 mg/jour pendant 7 jours. Cependant son coût prohibitif dans de nombreux pays freine son utilisation dans les élevages (Wyatt *et al.*, 2010 ; Shahiduzzaman et Dauschies, 2012).

Plusieurs études, conduites chez les patients séropositifs, montrent la variabilité de l'efficacité de l'azithromycine en fonction de plusieurs facteurs (dose, période, association avec d'autres molécules...) (Giacometti *et al.*, 1999 ; Diaz *et al.*, 1999). La récurrence de l'infection après

la fin du traitement est un phénomène courant et requière donc une administration prolongée du médicament (Rehg, 1991).

### **V.3.1.2. Autres produits antimicrobiens**

#### *a) Le Lactate d'halofuginone*

Le lactate d'halofuginone est un antiprotozoaire du groupe des dérivés de la quinazolinone. Il possède un effet cryptosporidiostatique suggérant une possible résistance du parasite (Silverlas *et al.*, 2009). Commercialisé depuis 2009 sous le nom de HALOCUR®, c'est la seule molécule possédant une AMM dans toute l'Union Européenne et dans d'autres parties du monde pour la prévention et le traitement de la cryptosporidiose. La posologie recommandée est de 100 µg/kg/jour, l'administration devant commencer dès les premiers jours de vie et durer 7 jours consécutifs.

De très nombreuses études ont fait état de l'efficacité du lactate d'halofuginone de manière dose-dépendante (de 60 à 120 µg/kg/jour pendant 7 jours consécutifs) pour diminuer l'excrétion des oocystes chez les veaux. Cependant, son utilisation ne permet ni une prévention de l'excrétion à la fin du traitement ni une amélioration des performances de croissance des animaux (Villacorta *et al.*, 1991 ; Naciri *et al.*, 1993 ; Lefay *et al.*, 2001 ; Joachim *et al.*, 2003 ; Jarvie *et al.*, 2005 ; Lallemond *et al.*, 2006 ; Klein, 2008 ; Trotzwilliams *et al.*, 2011 ; Shahiduzzaman et Dauschies, 2012). De plus, son efficacité dans le traitement de la diarrhée et de ses signes associés est très controversée car des études suggèrent que la molécule diminuerait la sévérité de l'infection et la mortalité liée à la maladie (Lefay *et al.*, 2001 ; Joachim *et al.*, 2003 ; Constable, 2009 ; De waele *et al.*, 2010 ; Shahiduzzaman et Dauschies, 2012). Le traitement préventif à base de lactate d'halofuginone permettrait de retarder l'infection jusqu'à une période où les veaux sont moins sensibles aux déséquilibres acido-basiques et à la déshydratation (Klein, 2008). En outre, le lactate d'halofuginone aux doses indiquées entraîne le développement d'une réponse humorale spécifique faisant intervenir les IgA et les IgM (Peeters *et al.*, 1993).

L'association du lactate d'halofuginone avec une désinfection au Neopredisan à 3%, un produit à base de chlorocrésol, a permis de contrôler complètement la cryptosporidiose pendant les 2 premières semaines de vie des veaux, mais prolongerait la susceptibilité des animaux à l'infection à cause d'une stimulation insuffisante de l'immunité (Villacorta *et al.*, 1991 ; Keidel et Dauschies, 2013). L'activité anticryptosporidienne et le bénéfice clinique lié à l'utilisation du lactate d'halofuginone sont limités en présence de coinfections puisqu'il



entraîne seulement un allongement de la période prépatente (Almawly *et al.*, 2013). D'après De waele *et al.*, (2010), le lactate d'halofuginone devrait être associé à de bonnes pratiques d'élevage et à des mesures hygiéniques pour diminuer efficacement le risque de cryptosporidiose chez les veaux âgés de 7 à 13 jours.

En ce qui concerne les agneaux et les chevreaux, la dose de 0,1 mg/kg/jour pendant 7 jours consécutifs permet d'inhiber la reproduction du parasite et encourage le développement d'une immunité (Giadinis *et al.*, 2008 ; Shahiduzzaman et Dauschies, 2012). L'utilisation du lactate d'halofuginone prévient la diarrhée et la mortalité liées à la maladie chez les chevreaux mais demeure sans effet sur les animaux déshydratés ou acidotiques (Giadinis *et al.*, 2008).

Chez des veaux laitiers pré-sevrés ; l'étude comparative entre des traitements à l'halofuginone et des produits de fermentation de *Saccharomyces cerevisiae*, montrent un statut clinique et un gain de poids similaires (Vélez *et al.*, 2019).

Le lactate d'halofuginone possède des effets intéressants lors d'une utilisation en prévention de la cryptosporidiose chez les Ruminants. Il permet de différer l'infection à un moment où les veaux possèdent un système immunitaire plus performant pour combattre l'agent pathogène. Cependant, son utilisation chez des animaux déjà atteints par la maladie a montré des résultats controversés et parfois décevants.

### *b) Nitazoxanide*

Le nitazoxanide appartient à la famille des thiazolides possédant un large spectre d'activité contre les protozoaires intracellulaires et extracellulaires tels que les helminthes et les bactéries anaérobies. Il a été décrit pour la première fois en 1975 par Jean-François Rossignol (Tzipori, 1998 ; Fox et Saravolatz, 2005 ; Muller *et al.*, 2007 ; Shahiduzzaman et Dauschies, 2012). La molécule présente une excellente biodisponibilité dans le tractus gastro-intestinal car elle est rapidement absorbée et métabolisée en tizoxanide et tizoxanide glucuronide. Chez le veau, les deux métabolites atteignent des niveaux de détection maximaux dans le sang 2h et 8h respectivement après l'administration orale de nitazoxanide suggérant ainsi une durée optimale de 12h entre deux prises (Gargala *et al.*, 2000 ; Hemphill *et al.*, 2006 ; Schnyder *et al.*, 2009 ; Shahiduzzaman et Dauschies, 2012). Son mode d'action reposerait sur l'inhibition de la PFOR (Pyruvate Ferredoxin Oxidoreductase), une enzyme essentielle dans le métabolisme anaérobie, mais il ne s'agirait pas de l'unique voie à disposition de la molécule pour inhiber le développement des protozoaires. Le nitazoxanide est approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) dans le traitement de la diarrhée induite par *Cryptosporidium*

chez les enfants âgés de 1 à 11 ans depuis décembre 2002 et chez les adultes et les enfants de plus de 12 ans depuis juin 2005 (Fox et Saravolatz, 2005 ; Hemphill et *al.*, 2006).

Sur les cultures cellulaires, le nitazoxanide a montré une importante activité inhibitrice de la croissance de *C. parvum* associée à une faible toxicité : une concentration de 10 µg/mL induisait une inhibition de 90% du développement du parasite sur des cellules MDBK (Theodos et *al.*, 1998 ; Tzipori, 1998). Une étude de Gargala et *al.* (2000) sur des cellules HCT-8 rapporte que le nitazoxanide et son métabolite tizoxanide exercent des effets sur les sporozoïtes de *C. parvum* tandis que le nitazoxanide glucuronide agit sur les stades intracellulaires du cycle parasitaire.

### *c) Décoquinate*

Le décoquinate appartient à la famille des quinolones, c'est un coccidiostatique qui inhibe le transport des électrons via le cytochrome dans la mitochondrie (Lindsay et *al.*, 2000b ; Lallemond et *al.*, 2006 ; Constable, 2009 ; Shahiduzzaman et Dauschies, 2012).

*In vitro*, le décoquinate ne permet qu'une faible inhibition du développement de *C. parvum* (8% contre 81% pour la paromomycine) à une concentration de 100 µM (Lindsay et *al.*, 2000b ; Shahiduzzaman et Dauschies, 2012). Chez les souris, des doses de 2,5 et 5 mg/kg de décoquinate n'ont pas entraîné une diminution de l'excrétion des oocystes (Lindsay et *al.*, 2000b). Chez le veau, son administration à des doses de 2 mg/kg pendant 28 jours et 2,5 mg/kg pendant 7 jours se montre sans effet sur l'excrétion des oocystes, la sévérité et la durée de la diarrhée ainsi que ses signes associés et le taux de mortalité (Lindsay et *al.*, 2000b ; Moore et *al.*, 2003 ; Constable, 2009). Cependant, il permettrait une augmentation du gain moyen quotidien des animaux traités (Lallemond et *al.*, 2006 ; Shahiduzzaman et Dauschies, 2012). En ce qui concerne les caprins, l'utilisation du décoquinate à la dose de 2,5 mg/kg pendant 21 jours sur les chevreaux ou les femelles gestantes est associée à une amélioration clinique, une réduction de l'excrétion des oocystes en nombre et en durée et une diminution de la mortalité due à la maladie (Mancassola et *al.*, 1997 ; Ferre et *al.*, 2005 ; Shahiduzzaman et Dauschies, 2012). De plus, le traitement est bien toléré chez les chèvres suggérant son intérêt dans la prévention de la cryptosporidiose (Ferre et *al.*, 2005).

### **V.4. Molécules issues de la médecine traditionnelle et des plantes**

De nombreuses molécules ont été testées pour le traitement et la prévention de la cryptosporidiose mais, à ce jour, aucune ne s'est montrée totalement satisfaisante.

### **V.4.1. Charbon actif (ou charbon activé)**

Le charbon actif, connu entre autres pour ses propriétés adsorbantes, est largement utilisé en médecine humaine.

*In vitro*, le charbon mélangé aux acides organiques ont diminué le nombre d'oocystes suggérant ainsi qu'il contient des composés aux propriétés désinfectantes. Les acides organiques auraient eu une action directe sur la viabilité de *C.parvum*. Le Nekka-Rich pourrait être efficace dans la prévention de l'infection à *C.parvum* chez les veaux puisqu'il diminue la sévérité de la diarrhée, l'excrétion des oocystes et leur adhésion au niveau des cellules épithéliales intestinales (Watarai et al., 2008). Chez les chevreaux, son administration orale en deux ou trois prises quotidiennes (3,75 g/jour) de l'âge de 3 à 17 jours permet une réduction de l'excrétion des oocystes et une amélioration des signes cliniques (Paraud et al., 2011).

### **V.4.2. La grenade**

La grenade est le fruit du grenadier, *Punica granatum*, présent majoritairement en Asie Occidentale et en Asie Centrale. Ses utilisations, en plus de l'aspect nutritionnel, sont nombreuses : traitement des diarrhées, des infections parasitaires, des infections du tractus urinaire, des calculs rénaux... Elle permettrait de diminuer la croissance bactérienne et inhiberait les toxines produites par celles-ci. De plus le fruit, la peau et le jus seraient dotés d'un fort pouvoir antioxydant et anti-inflammatoire, suggérant un intérêt dans la prévention de maladies cardiovasculaires, de certains cancers et de la maladie d'Alzheimer.

L'activité anti-cryptosporidienne potentielle de la grenade a été testée chez des souris albinos infectés expérimentalement par *C.parvum*. Le traitement à base de peau de *Punica granatum* (3 g/kg) permettait une réduction de l'excrétion des oocystes et une amélioration des signes cliniques. Au niveau histologique, une diminution du nombre de trophozoïtes et de l'infiltration lymphocytaire ainsi qu'une restauration de l'architecture des villosités étaient observées. Aucun effet secondaire n'a été rapporté lors de l'étude (Al-mathal et Alsalem, 2012).

### **V.4.3. Ail**

Depuis des millénaires, l'ail, *Allium sativum*, est connu pour ses propriétés culinaires et médicinales. Il est utilisé depuis 5000 ans et apparaît dans les dessins de l'Égypte Antique, où il était très largement cultivé. Récemment, les scientifiques se sont intéressés à ses propriétés

antimicrobiennes, anticoagulantes, hypoglycémiantes, hypolipémiants, antioxydantes et antitumorales. L'ail posséderait également des effets anthelminthiques par baisse de la charge parasitaire. Son activité serait imputée à l'allicine (diallyl thiosulfinate), un composé organo-sulfuré responsable de ses propriétés antimicrobiennes mais aussi de son goût.

Chez les souris, l'administration orale de jus d'ail (50 mg/kg) pendant 13 ou 14 jours permet de réduire l'excrétion des oocystes et d'éradiquer *C.parvum* des sections intestinales lors d'examen post-mortem. L'activité de la MPO (MyéloPérOxydase), une enzyme associée à l'inflammation intestinale, est également diminuée lors de traitement à base d'ail. Il est cependant à noter que la diminution de celle-ci et de l'excrétion des oocystes est moins importante chez les animaux immunodéprimés.

L'efficacité de l'ail en prévention et en traitement de la cryptosporidiose peut être expliquée par plusieurs mécanismes : le blocage de la synthèse lipidique, la favorisation de la phagocytose avec une augmentation de l'activité des cellules Natural Killer qui renforce les mécanismes de défense pendant la durée du traitement, et la perturbation des fonctions physiologiques normales du parasite comme la mobilité, l'absorption de nourriture et la reproduction (Gaafar, 2012).

### **V.4.4 Curcuma**

Le curcuma est un composé polyphénolique naturel extrait de la plante *Curcuma longa*. Il est connu pour ses effets antioxydants et anti-inflammatoires et est utilisé depuis très longtemps dans la médecine ayurvédique indienne. Il posséderait également des activités antitumorales, immunostimulantes et antiprotozoaires.

Le curcuma a montré des effets prometteurs in vitro sur l'infectiosité et le développement de *C. parvum* : plus de 95% d'inhibition de la croissance du parasite était observée pour une exposition pendant plus de 12h des cellules infectées avec une concentration de curcuma de 50  $\mu$ M et l'invasion des cellules hôtes par les sporozoïtes était inhibée d'au moins 65% en présence de 200  $\mu$ M de curcuma. L'interruption de l'exposition après 24h n'a pas entraîné de résurgence du développement de *C.parvum*. Il inhiberait les phospholipases cellulaires des mammifères ce qui réduirait l'infectiosité des sporozoïtes de *C.parvum*. De même, l'inhibition d'une histone diacétylase pourrait être à l'origine de l'inhibition de la croissance du parasite en présence de curcuma (Shahiduzzaman et *al.*, 2009a ; Shahiduzzaman et Dausgchies, 2012).

En outre, dans des études récentes, l'activité anti-cryptosporidienne et anti-oxydante de la curcumine contre *C. parvum* a été encore confirmée. Cependant, il a été rapporté que ses effets étaient plus faibles comparés à la paromomycine (Asadpour, 2017 ; Asadpour *et al.*, 2018).

### **V.4.5. Acides ginkgoliques**

Le *Ginkgo biloba*, également appelé « arbre aux quarante écus » est utilisé dans la médecine traditionnelle chinoise depuis l'antiquité. Originaire d'Asie, le ginkgo possède des effets nombreux sur l'organisme : antioxydant, anti-tumoral, antimicrobien, molluscicide... Les acides ginkgoliques sont des acides carboxyliques aromatiques retrouvés dans la partie externe pulpeuse de l'ovule de *Ginkgo biloba*.

Wu *et al.* (2011) ont étudié l'activité anticryptosporidienne de ces acides sur des cellules HCT-8 : l'exposition à une dose de 5 µg/mL pendant 48h diminuait fortement le nombre de *C. andersoni* dans les cultures cellulaires ; une toxicité dose-dépendante a été rapportée. Ces résultats suggèrent l'intérêt que peuvent représenter les acides ginkgoliques dans le traitement de la cryptosporidiose.

### **V.4.6. Alcaloïde issu de *Sophora flavescens***

La matrine est un alcaloïde extrait de la plante *Sophora flavescens*, une plante médicinale chinoise. Cette molécule possède des activités potentielles antinéoplasiques, antifibrotiques, anti-inflammatoires et anti-tumorales.

Chen et Huang (2012) ont mené une étude visant à évaluer les effets de la matrine *in vitro* et *in vivo* sur l'infection à *C. parvum*. Une réduction de 54 à 63% du nombre d'oocystes chez les souris et une diminution de 28 à 58% du nombre de cellules infectées par *C. parvum* étaient observées. Les effets du traitement étaient maximaux pour des doses de 100 µg/mL *in vitro* et 10 mg/kg *in vivo* tandis que des doses de 200 µg/mL *in vitro* et 20 mg/kg *in vivo* étaient nécessaires pour obtenir des effets optimaux sur l'intégrité des membranes cellulaires et de la muqueuse. L'intégrité de la membrane cellulaire a été évaluée par la concentration en acide D-lactique.

### **V.4.7. Mangiférine**

La mangiférine est un C-glucosylxanthone issu des feuilles du manguier, *Mangifera indica*.

Une étude de Perrucci *et al.* (2006) sur des souriceaux rapporte que la mangiférine à la dose de 100 mg/kg possède une activité anticryptosporidienne comparable à celle de la

paromomycine à la même dose. Elle diminue la colonisation intestinale par *C. parvum* de plus de 80%.

### **V.4.8. Génistéine**

La génistéine est une *isoflavone*. Elle a été mise en évidence en 1918 par Valeur dans des extraits de genêt à balais (*Cytisusscoparius*). A des proportions moindres, la génistéine peut aussi être retrouvée dans certaines plantes comme le soja, fève, kiwi...Elle possède de nombreuses propriétés, ce qui en fait une molécule d'intérêt pour la recherche en pharmacologie (Wegrzyn *et al.*, 2010)

Cette molécule est notamment un inhibiteur des protéines kinases spécifiques de la tyrosine des récepteurs membranaires EGF (Epidermal Growth Factor) (Akiyama *et al.*, 1987 ; Shahiduzzaman et Dauschies, 2012).

La génistéine a montré une forte activité *in vitro* et *in vivo* contre l'infection à *Cryptosporidium spp.* (Stachulski *et al.*, 2006 ; Shahiduzzaman et Dauschies, 2012).

## **V.5. Molécules à activité anticryptosporidienne potentielle**

### **V.5.1. Molécules de nature saccharidique**

#### **V.5.1.1. Cyclodextrine**

Les cyclodextrines sont une famille d'oligosaccharides, ce sont des molécules cristallines, hydrosolubles, cycliques et non réductibles. Les familles  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  sont les plus utilisées. Elles sont considérées comme non-toxiques en raison d'une absence de diffusion au travers des membranes et d'absorption dans le tube digestif.

Dans l'industrie pharmaceutique, les cyclodextrines sont couramment utilisées comme excipient des médicaments permettant d'augmenter la solubilité et la stabilité de certains principes actifs.

Leur intérêt dans la prévention et le traitement de la Cryptosporidiose a été découvert de manière inopinée. Lors d'une étude menée sur des souris, Castro-Hermida *et al.*(2001) ont découvert que le niveau d'infection était significativement plus bas lors d'administration de  $\beta$ - cyclodextrine (34 mg/kg) que lors d'un traitement à base de furoate de diloxanide.

Chez les agneaux, son utilisation en prophylaxie ou en traitement à la dose de 500 mg/kg pendant 3 jours entraînait une diminution de la période patente et de la sévérité de la diarrhée

sans réinfection à la fin du traitement. En prévention, elle permettait également de réduire l'incidence de la Cryptosporidiose (Castro-Hermida *et al.*, 2001).

En ce qui concerne l' $\alpha$ -cyclodextrine, son administration à des chevreaux au début de l'infection (500 mg/kg pendant 6 jours) était associée à un allongement de la période pré-patente, une réduction de la période patente et une diminution de l'intensité de l'infection. Aucun bénéfice sur le gain de poids des chevreaux n'a été rapporté (Castro-hermida *et al.*, 2004).

### **V.5.1.2. Les polysaccharides naturels (Chitosans)**

Le chitosan, un biopolymère d'aminopolysaccharide, possède une structure chimique unique et complexe avec une densité de charge élevée, des groupes amino hydroxy réactifs ainsi qu'un important couplage hydrogène. Il présente une excellente biocompatibilité, une stabilité physique et une facilité de traitement. Le terme «chi-tosan» décrit un groupe hétérogène de polymères combinant un groupe de caractéristiques physicochimiques et biologiques, permettant une large gamme d'applications fascinantes et encore inexplorées. La prise de conscience croissante des potentialités et de la valeur industrielle de ce biopolymère a conduit à son utilisation dans de nombreuses applications d'intérêt technique, et de plus en plus dans le domaine biomédical. Bien que non utilisé principalement comme agent antimicrobien, son utilité en tant qu'ingrédient à la fois dans les formulations alimentaires et pharmaceutiques a récemment gagné plus d'intérêt, quand une compréhension scientifique d'au moins quelques-unes des activités pharmacologiques de ce glucide polyvalent a commencé à évoluer. Cependant, la compréhension des divers facteurs qui affectent son activité antimicrobienne est devenue un enjeu clé pour une utilisation plus simple et une optimisation plus efficace des formulations de chitosan. En outre, l'utilisation du chitosan devrait reposer sur une connaissance suffisante des mécanismes complexes de son mode d'action antimicrobien, ce qui va aider à mieux comprendre ce potentiel. Néanmoins, les sources, les aspects biochimiques, la structure et la modification chimique, les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles, ainsi que les applications du chitosan ont été étudiés de manière approfondie dans la littérature.

#### *a) Nature et sources*

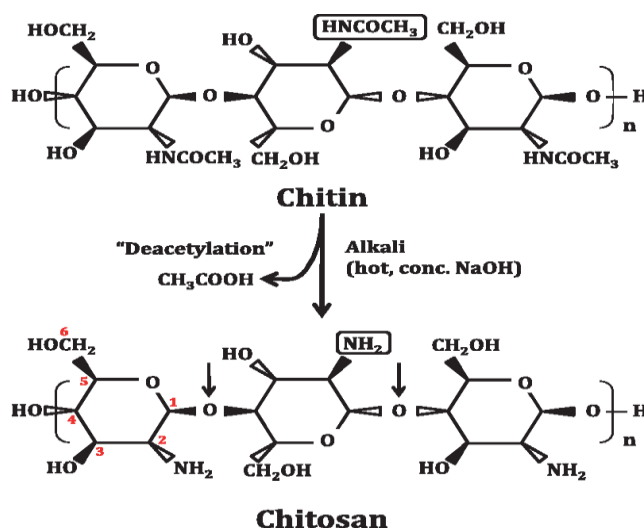
Le chitosan est principalement produit à partir de la chitine, largement distribuée dans la nature, principalement en tant que composant structurel des exosquelettes d'arthropodes (y compris les crustacés et les insectes), dans les diatomées et les algues marines, ainsi que dans

certaines parois cellulaires fongiques. Sur le plan structure, la chitine est un mucopolysaccharide insoluble et linaire (Figure 9) consistant en unités répétitives N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc), liées par des liaisons glycosidiques (Tharanathan et Kittur, 2003). Techniquement, la structure de la chitine est étroitement liée à celle de la cellulose (Suzuki, 2000). Sa production commerciale est généralement associée aux industries des fruits de mer, telles que la mise en conserve des crevettes, où la transformation des carapaces de crustacés (Kumar, 2000).

*b) Propriétés biologiques*

Le chitosan, un biopolymère hydrophile, est obtenu industriellement en hydrolysant les groupes aminoacétyle de la chitine. C'est un polysaccharide naturel, disponible en solution, en flocons, en poudre fine, en perles et en fibres.

Une grande partie de l'intérêt commercial récent pour les chitosans et ses dérivés découle du fait qu'ils combinent plusieurs caractéristiques biologiques favorables, y compris la biodégradabilité, biocompatibilité et non toxicité, ce qui le valorise dans le secteur pharmaceutique, biomédical comme applications industrielles.



**Figure 9 :** Structure chimique du chitosan et sa production à partir de la chitine par hydrolyse alcaline du Groupes N-acétyle. Le chitosan est : (1 → 4) 2-amino-2-désoxy-b-D-glucane.

*c) Domaines d'application*

La chitine a suscité un grand intérêt, non seulement en tant que ressource sous-utilisée, mais également en tant que nouveau matériau fonctionnel à fort potentiel dans divers domaines



(Kumar, 2000). Bien que ces importantes ressources aient été impliquées à la fois dans la recherche et développement de processus et d'applications pour le chitosan, seules les deux dernières décennies ont vu des développements sérieux dans une variété de technologies visant pour l'utilisation commerciale du chitosan et de ses dérivés. Chitosan, ses oligomères et un certain nombre de ses dérivés émergés en tant que nouveaux biomatériaux pour un certain nombre d'applications allant des produits pharmaceutiques, cosmétiques, médical, alimentaire et textile à des applications agricoles. Plusieurs dérivés de la chitine ont été préparés, mais ils n'étaient pas aussi étudiés à la fois sur le plan universitaire et sur le plan industriel. L'un des domaines d'activité de recherche intense a été l'utilisation de composés naturels, dont le chitosan, à des fins de conservation; il est né d'un besoin de contrôle plus sûr et plus économique de la stabilité microbienne des systèmes agroalimentaires et pharmaceutiques, qui est en train de devenir une nouvelle frontière de recherche (Roller, 2003).

Introduit sur le marché dans les années 1990, le chitosan a fait l'objet de nombreuses recherches concernant son potentiel comme excipient pharmaceutique utile et prometteur dans diverses formulations pharmaceutiques (Singla et Chawla, 2001).

En effet, certaines études ont montré que le chitosan, utilisé comme un adjuvant immunitaire, un agent d'administration de médicament ou une fibre alimentaire, pourrait efficacement promouvoir la réponse immunitaire locale et améliorer la présentation antigénique (Porporatto et al., 2005; Xie et al., 2007). De plus, le chitosan est impliqué en tant qu'agent antifongique en activant l'expression de certains gènes dans la cellule hôte, induisant ainsi la production de protéines associées aux agents pathogènes, telles que les chitinases et autres enzymes hydrolytiques. Ces enzymes peuvent hydrolyser la chitine dans les parois cellulaires des champignons, entraînant par conséquent l'inhibition de la croissance et / ou la mort du pathogènes (Doares et al., 1995; Mason et Davis, 1997). L'induction des chitosanases et les chitinases par génie génétique ont été également proposées (Cuero, 1999).

### *d) Aspects économiques et statut réglementaire*

Comme une grande partie de l'exosquelette de crustacés est facilement disponible en tant que sous-produit de l'industrie de la transformation des fruits de mer, la matière première pour la production de chitosan est relativement peu coûteuse, et par conséquent la production de chitosan à grande échelle de cette bio-ressource renouvelable est économiquement réalisable (Rabea et al., 2003). Le chitosan est un produit commercialisé dans différentes parties du monde (Amérique du Nord, Pologne, Italie, Russie, Norvège, Japon et Inde) à grande échelle.

### e) *Activité antimicrobienne*

L'ère moderne de la recherche sur le chitosan a été annoncée par publications dans les années 1990 décrivant le traitement antimicrobien potentiels du chitosan et de ses dérivés, qui présentent un large éventail d'activités contre les agents pathogènes humains comme organismes d'origine alimentaire (Muzzarelli et *al.*, 1990; No et *al.*, 2002; Savard et *al.*, 2002; Rabea et *al.*, 2003). , Jumaa et *al.* (2002) ont suggéré que le chitosan soit utilisé comme agent antimicrobien conservateur dans les formulations en émulsion pour muqueuse ainsi que pour les applications parentérales. De même, Sagoo et *al.* (2002) ont proposé de l'utiliser comme complément de la potentialisation de l'efficacité biocide des antimicrobiens.

La valeur potentielle du chitosan en tant qu'un antimicrobien ouvrirait une nouvelle voie pour l'utilisation de ce produit. Cependant, des paramètres détaillés de l'application doit être bien définis, afin d'éviter des interactions défavorables, ou la perte de son activité.

### f) *Effet des polysaccharides « chitosan » sur Cryptosporidium spp.*

Le chitosan a connu récemment les premières études où des essais ont été réalisés afin d'évaluer l'effet de ce produit sur le genre *Cryptosporidium* dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Ces investigations ont mis l'accent sur la capacité de ces polysaccharides à éliminer ou réduire l'excrétion du parasite. Les auteurs ont rapporté des résultats prometteurs quant à la réduction des oocystes ou une diminution de signes cliniques en utilisant des souches de références. En effet dans deux systèmes de culture *in vitro* (lignées cellulaires HCT-8 et Caco-2) pour l'infection à *C. parvum*. Mammeri et *al.* (2018) ont étudié à la fois la toxicité du chitosan et ses effets sur *C. parvum* (souche Iowa). Pour évaluer les effets du chitosan sur l'excrétion d'oocystes *in vivo*, des souris nouveau-nées CD-1 ont été inoculées par voie orale avec des oocystes de *C. parvum* (souche Iowa). Les résultats ont montré que le chitosan inhibe de manière significative la multiplication de *C. parvum* dans les lignées cellulaires HCT-8 et Caco-2 ( $P < 0,005$ ). *In vivo*, le traitement par chitosan a révélé une réduction significative de l'excrétion parasitaire chez les souris nouveau-nées infectées et traitées.

Dans une étude similaire, le chitosan sous forme de nanoparticules a été testé pour évaluer son effet sur *Cryptosporidium parvum* (souche de référence). Les expériences ont été effectuées *in vitro* à des concentrations en série et confirmées chez des souris avec un test d'infectivité *in*

*vivo*. Les résultats ont montré une diminution du nombre d'oocystes de *Cryptosporidium* et l'altération du parasite, en fonction de la dose de chitosan utilisée et du temps d'exposition. Toutefois, la dose létale minimale des oocystes détruits était de 3000 µg / ml (Ahmed et *al.*, 2019).

Aussi, au cours d'une expérimentation *in vivo* sur des agneaux, des modifications significatives ont été observées au niveau de l'excrétion des oocystes. En conséquence, chez les agneaux atteints de cryptosporidiose expérimentale, les oligosaccharides de chitosan ont présenté une amélioration des signes cliniques. En revanche, l'administration de la molécule chitosan à des doses de 100, 500 et 1000 mg / kg pendant 7 jours a considérablement réduit l'excrétion des oocystes mais pas assez pour éliminer complètement la cryptosporidiose (Coskun et *al.*, 2019).

### **V.5.2. Molécules de natures lipidiques, peptidiques ou autres**

La recherche de médicaments efficaces contre la cryptosporidiose s'est tournée vers plusieurs types de molécules avec plus ou moins de succès et de nombreuses pistes restent encore à explorer. Un nombre considérable de produits a été testé *in vitro* ou/et *in vivo* afin de déterminer l'effet de ces composés comme L-arginine, inhibiteur de protéase, Acide aurintricarboxylique... (Castro et *al.*, 2012 ; Zardi et *al.*, 2005).

## **V.6. Immunothérapie et prophylaxie**

### **V.6.1. Vaccination**

Le statut immunitaire de l'hôte joue un rôle essentiel dans la détermination de la sensibilité à l'infection par ce parasite, ainsi que dans l'évolution et la gravité de la cryptosporidiose. Par conséquent, comprendre les interactions hôte-parasite et les éléments essentiels de l'immunité à *Cryptosporidium spp.* sont essentiels au développement d'immunothérapies ou de vaccins efficaces (Mead, 2014). Une séquence complexe d'événements impliquant divers composants de la réponse innée et adaptative de l'hôte s'est révélée être importante dans le contrôle de l'infection à *Cryptosporidium* (Petry et *al.*, 2010; McDonald et *al.*, 2013). Cependant, la nature de ces réponses, en particulier chez l'homme, n'est pas complètement comprise (Borad et Ward, 2010). Cependant, comme ce parasite est largement localisé dans le tractus intestinal, un vaccin qui stimule les réponses immunitaires muqueuses sera probablement le plus bénéfique (Mead, 2014). Par exemple, les vaccins muqueux disponibles dans le commerce contre d'autres agents pathogènes entériques tels que les rotavirus, vivants et atténués, ont

remporté un succès considérable en matière de prévention et de contrôle des maladies chez les enfants des pays développés (Pasetti et *al.*, 2011), mais avec une protection moindre dans les pays en développement (Vesikari, 2012).

Chez les porcs, l'immunité spécifique de *C. hominis* était suffisante pour protéger complètement contre la contamination par la même espèce (Sheoran et *al.*, 2012). Dans un deuxième groupe de porcs, une primo-infection par *C. hominis* et une infection ultérieure par *C. parvum* ont entraîné une immunité protectrice croisée partielle avec des symptômes plus légers et une excrétion plus faible de l'oocyste que les témoins infectés uniquement par *C. parvum* (Sheoran et *al.*, 2012).

La mise au point d'un vaccin implique la sélection d'antigènes capables de produire une réponse cellulaire T protectrice contre la cryptosporidiose : oocystes atténués, fractions d'oocystes ou de sporozoïtes et protéines de surface recombinantes possédant un rôle dans la motilité et l'attachement du parasite. Idéalement, le vaccin contre la cryptosporidiose serait composé de plusieurs antigènes issus de *C. parvum* et *C. hominis* et permettrait une glycolysation (addition de glucides) des protéines afin d'augmenter leur immunogénicité (Boulter-Bitzer et *al.*, 2007 ; Mead, 2010).

En effet, les antigènes ancrés à la surface du parasite via le glycosylphosphatidylinositol (GPI) sont impliqués dans l'attachement et l'invasion des cellules hôtes et représentent des candidats vaccins prometteurs. Un essai a été réalisé chez des veaux et a permis la détection de la réaction d'anticorps spécifiques contre les antigènes, démontrant leur immunoréactivité et leur expression, ainsi que leur reconnaissance *in vivo* à un stade précoce de l'infection de l'hôte (Tomazik et *al.*, 2018).

### **V.6.2. Prophylaxie par le colostrum**

#### **V.6.2.1. Colostrum chez le bovin**

Dans une étude de Tzipori et collaborateurs sur des veaux diarrhéiques, la plupart des veaux étaient hypoglobulinémiques. On pourrait supposer que la prise de colostrum serait un facteur de protection face à *Cryptosporidium* (Tzipori et *al.*, 1983). En revanche, l'administration du colostrum frais plutôt que congelé diminue l'incidence de la maladie (Mohammed et *al.*, 1999). Toutefois, d'autres auteurs rapportent des résultats où le colostrum n'offre aucune protection face à la cryptosporidiose (Harp et *al.*, 1990 ; Quigley et *al.*, 1994). Cependant,

administrer un colostrum hyperimmun bovin permet de diminuer le temps d'excrétion et le nombre d'oocystes excrétés par rapport à un colostrum normal (Fayer et *al.*, 1989).

Un enfant âgé de 3 ans et 2 mois atteint de cryptosporidiose, présentant des vomissements et une diarrhée avec un retard de croissance et n'ayant pas répondu au traitement conventionnel, a reçu du colostrum bovin hyperimmun produit contre l'antigène parasitaire. Ses vomissements et sa diarrhée ont disparu après cinq jours de traitement (Tzipori et *al.*, 1986). Chez les patients séropositifs, l'administration de colostrum bovin hyperimmun à des doses comprises entre 20 et 40 g/jour a réduit le nombre d'oocystes retrouvés dans les selles sans pour autant améliorer le statut clinique des malades. A l'inverse, Abubakar et *al.* (2007) rapportent les conclusions d'une étude sur des patients séropositifs chez lesquels l'utilisation de colostrum bovin hyperimmun n'a réduit ni la quantité d'oocystes ni le volume des selles.

#### **V.6.2.2. Colostrum chez les ovins**

Des études antérieures ont montré que l'immunisation de brebis gestantes permettait de prévenir la cryptosporidiose chez les agneaux par le biais de la prise du colostrum (Naciri *et al.*, 1994). Des conclusions similaires ont été rapportées par Martin-Gomez et *al.* (2005) lors d'immunisation des femelles. En effet, chez les agneaux, le début de l'excrétion des oocystes était retardé (J5 contre J3 post-inoculation chez les agneaux du groupe contrôle), la période patente et la durée de la diarrhée étaient diminuées (7-8 jours contre 11 jours et 3 jours contre 8,6 jours respectivement) tandis que la quantité d'oocystes excrétés était réduite de 77%. Ces agneaux présentaient également de meilleures performances de croissance puisqu'ils affichaient un gain de poids vif supérieur de 2 kg par rapport aux agneaux du groupe contrôle. Mais seulement 3 individus furent utilisés pour cette étude ce qui n'était pas statistiquement significatif.

## **VI : CONCLUSION**

Le genre *Cryptosporidium* est un protozoaire parasite de l'embranchement des Apicomplexa infectant tous les groupes de vertébrés et notamment les humains (Fayer, 2010).

Il s'agit de l'agent étiologique de la cryptosporidiose, une diarrhée sévère voire létale pour les organismes immunodéprimés ou dont le système immunitaire n'est pas entièrement formé, comme les enfants. Originellement découvert sur une souris en 1907 (Tyzzer, 1907), il n'a été reconnu qu'au début des années 1980 comme étant un agent étiologique d'importance de maladies humaines suite à plusieurs cas de décès de personnes porteuses du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) et atteintes de cryptosporidiose.

Une forte prévalence des cas de Cryptosporidiose se situe dans les pays en développement en raison du manque d'hygiène, particulièrement pour les enfants, et du nombre plus important des personnes porteuses du VIH (Putignani et Menichella, 2010). Les épidémies liées à *Cryptosporidium* surviennent également dans les pays développés (Chalmers, 2012). La plus importante eut lieu en 1993, dans la ville de Milwaukee aux Etats-Unis, causant plus de 400 000 personnes malades et 69 décès (Mac Kenzie et al., 1994). Les travaux de Baldursson et Karanis ont ainsi montré que 60% des maladies parasitaires d'origine hydrique en Europe et aux Etats-Unis entre 2004 et 2010 ont pour origine le *Cryptosporidium* (Baldursson et Karanis, 2011).

La synthèse bibliographique a montré que de nombreuses données sur l'épidémiologie et la maîtrise de *Cryptosporidium spp.* sont disponibles chez les ruminants dans les pays développés alors que les informations manquent chez ces animaux dans les pays en voie de développement. En ce qui concerne l'Algérie, les données d'épidémiologie concernant la cryptosporidiose sont peu nombreuses.

La majorité des études épidémiologiques réalisées sur la cryptosporidiose des ruminants en Algérie, ont été menées uniquement à l'aide de la microscopie (Akam et al., 2002 ; Akam et al., 2009 ; Khelef et al., 2010 ; Ouchène et al., 2012 ; Hocine et al., 2016 ; Laatamna et al., 2018) et donc sans caractérisation basée sur les outils modernes de la biologie moléculaire.

Cinq études seulement, à ce jour, ont présenté des résultats de caractérisation moléculaire d'isolats de *Cryptosporidium sp.* chez les ruminants. Parmi ces études, trois uniquement ont rapporté des données en rapport avec les aspects zoonotiques de la maladie (Baroudi et al., 2017 ; Baroudi et al., 2018 ; Ouakli et al., 2018).

Cependant, dans le monde de nombreux travaux sont connus sur la cryptosporidiose animale. Chez les ruminants, l'âge semble grandement influencer la réceptivité et la sensibilité à l'infection. En effet les jeunes ruminants (< 2 mois d'âge) sont les plus sensibles et les plus excréteurs (100 à  $10^7$ - $10^8$  oocystes/ gramme de fèces) (Fayer *et al.*, 1998 ; Chartier, 2002 ; Geurden *et al.*, 2008 ; Paraud *et al.*, 2009). Cette notion d'âge serait essentiellement liée à l'état immunitaire des jeunes ruminants qui ne serait pas encore totalement fonctionnel pour lutter contre l'infection. Les oocystes de *Cryptosporidium spp.* excrétés massivement par les jeunes ruminants peuvent alors favoriser soit l'infection des animaux du même environnement soit favoriser l'infection des humains (en contact avec les animaux ou par consommation d'eau ou d'aliments contaminés par des oocystes excrétés par des animaux malades).

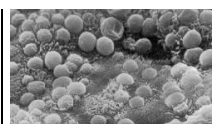
Du point de vue de ses spécificités, le *Cryptosporidium* présente une forte résistance aux traitements chimiques de l'eau tels que la chloration (Cacciò et Pozio, 2006) et est capable d'y persister sous sa forme infectieuse pendant plus de 13 mois (Chen *et al.*, 2007)

Par ailleurs, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement efficace contre l'infection au *Cryptosporidium*. Or, en plus des diarrhées mortelles qu'il peut engendrer, il a été montré que *Cryptosporidium parvum* induit un cancer dans un modèle de souris immunodéprimé (Certad *et al.*, 2007 ; Benamrouz *et al.*, 2012, 2014), soulevant la question du risque potentiel chez l'Homme. En raison des dangers réels et potentiels, il devient impératif de développer des systèmes capables de vérifier l'efficacité d'un traitement thérapeutique et de passer en revue un large spectre de molécules par criblage haut-débit. Enfin, de nombreux mécanismes concernant le cycle de vie du *Cryptosporidium* et sa relation avec les cellules-hôtes qu'il infecte demeure inconnus (Borowski *et al.*, 2010). Cette incompréhension rend notamment la culture en routine *in vitro* du parasite impossible pour l'instant (Arrowood, 2002), d'où une nécessité de développer des outils également dans cette optique.

Au niveau des instances décisionnaires, il est essentiel de pouvoir déterminer si un agent pathogène représente un risque pour la santé humaine ou animale. L'évaluation du risque se doit d'être au plus proche du danger réel représenté par cet agent. Ceci est d'autant plus vrai pour des parasites du genre *Cryptosporidium* du fait de leur forte résistance aux traitements chimiques de l'eau et de leur résilience aux conditions environnementales.

## ***PARTIE EXPERIMENTALE***

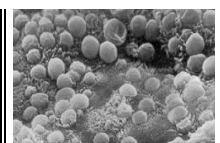
---





***PARTIE EXPERIMENTALE***

***CONTEXTE***



## CONTEXTE

### I. Lieu du travail et laboratoire d'accueil

Les travaux de thèse ont été faits dans le cadre de la collaboration avec le laboratoire d'accueil **(BIPAR /ENVA-ANSES-INRA) France**. Tous les essais et analyses réalisés durant ce projet de thèse, ont été effectués à l'Agence Nationale de Sécurité Alimentaire et Environnementale (ANSES), *via* ENV d'Alfort, précisément à l'unité mixte de recherche Biologie moléculaire et Immunologie Parasitaires (BIPAR) dans l'équipe PARALIM (parasites transmis par les aliments). Ce travail s'inscrit dans un travail de coopération entre l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire (ENSV) et l'Agence Nationale de Sécurité Alimentaire et Environnementale (ANSES) à travers une convention tripartite *via* Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort en France.

### II. Cadre du travail et financement

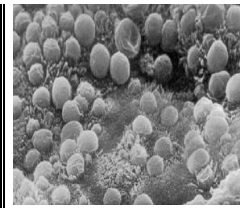
Cette thèse, réalisée à l'étranger, a été financée par le programme de bourses franco-algérien de formation supérieure PROFAS B+, qui vise à soutenir la mobilité des enseignants dans la réalisation de thèses de doctorat entre l'Algérie et la France.

Aussi, Campus France, a été choisi par les ministères algériens chargés de l'Enseignement supérieur et de la Recherche scientifique, des Affaires Etrangères et par l'Ambassade de France en Algérie du suivi et de l'avancée des travaux de recherches en France.

A titre d'information, nous avons bénéficié d'une bourse, avec un co-encadrement à l'étranger, suite à un concours sur dossier et un entretien au près d'une commission scientifique formée de membres Algériens et Français.

## ***PARTIE EXPERIMENTALE***

**1<sup>ère</sup> Partie : Caractérisation phénotypique et génotypique  
de *Cryptosporidium. spp*chez les ruminants.**





## **I. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS**

L'Algérie, à l'instar de la plupart des pays en développement, est très touchée par les parasitoses intestinales (Benouis *et al.*, 2013). Malgré la virulence intracellulaire de *Cryptosporidium*, son impact socio-économique et en santé publique non négligeables, peu d'informations sont à l'heure actuelle disponibles concernant la situation épidémiologique de la cryptosporidiose dans notre pays. Des prévalences de l'ordre de 0,4% ont été signalées par Benouis en 2013 dans la wilaya d'Oran et rien d'autre dans le reste du pays, alors que les premiers cas de cryptosporidiose humaine remontent à l'année 1992 où 3 individus immunocompétents et 2 individus immunodéprimés ont été diagnostiqués (Azzam-Bouчек, 1992). Les *Cryptosporidium spp.* sont rarement recherchés dans les laboratoires de parasitologie. La mise en place de bonnes mesures de prévention contre ces parasites nécessite une bonne compréhension de leurs distributions. Toutefois, une étude récente chez des sujets immunodéprimés ayant le syndrome d'immunodéficience acquise/infectés par le virus HIV, a révélé une prévalence de 9% de Cryptosporidiose chez ces malades (Semmani *et al.*, 2019 résultats non publiés).

En revanche, l'intérêt pour l'infection due à *Cryptosporidium* chez l'animal s'est intensifié à mesure que les cas d'infections animales ont augmenté, non seulement parce que les animaux ont été considérés comme des réservoirs, mais également parce que l'infection par ce protiste peut avoir des répercussions économiques chez les animaux de rente. En plus, le domaine de la chimiothérapie n'a pas encore connu un progrès réel quant au développement d'anti-cryptosporidiens et ceci est dû à plusieurs raisons liées étroitement à la biologie du parasite (Paoletti, 2002 ; Hijjawi *et al.*, 2004 ; Caccio et Pozio, 2006 ; Certad, 2008 ; Rossele et Latif, 2013).

A notre connaissance, peu d'études ont été réalisées dans notre pays en utilisant des outils de biologie moléculaire pour la recherche de *Cryptosporidium* chez les animaux. De ce fait, les données sur les espèces de *Cryptosporidium* existantes chez les ruminants en Algérie ne sont pas nombreuses. En outre, le niveau d'excrétion des parasites chez les ruminants a été peu ou pas rapporté. Par conséquent, il n'existe pas d'éléments d'information suffisants pour confirmer si réellement ces animaux sont la source de contamination de l'environnement ou *vice-versa*. Dans notre pays, la plupart des connaissances épidémiologiques acquises sur cette parasitose, sont fondées essentiellement sur des enquêtes et diagnostic phénotypique (données microscopiques).

Néanmoins, quelques études récentes d'épidémiologie et de caractérisation moléculaire ont été entreprises dans certaines régions de l'Algérie sur des populations animales chez les volailles (Baroudi et al, 2013), chez les équidés (Laatamna *et al.*, 2013) et chez les ruminants (Ouchene *et al.*, 2016 ; Benhouda *et al.*, 2017 ; Baroudi *et al.*, 2017 ; Baroudi *et al.*, 2018 ; Ouakli *et al.*, 2018).

Aujourd'hui les limites des méthodes conventionnelles sont bien connues. Le nombre d'études épidémiologiques sur le terrain est en augmentation significative ces dernières années. En revanche, la stratégie de recherche dans les pays développés a été d'étudier la diversité génétique des isolats de *Cryptosporidium*. En Algérie, à l'instar de la majorité des pays en développement, le travail s'est concentré sur des études épidémiologiques recherchant simplement la prévalence de la Cryptosporidiose.

En effet, l'identification moléculaire et typage génétique du parasite chez les ruminants semblent encore indispensable. Afin de répondre à cette problématique, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- 1- Caractérisation phénotypique et quantification du parasite par des méthodes microscopiques,
- 2- détection de *Cryptosporidium spp.* dans les isolats par l'application d'une PCR-ARNr 18S,
- 3- identification des différentes espèces de *Cryptosporidium spp.* par PCR-RFLP,
- 4- identification de sous-type de *C. parvum* par la PCR gp60,
- 5- estimation de l'aspect zoonotique par le séquençage du gène de la glycoprotéine de surface (gp60).

Cette première partie de notre travail est intitulée : « **Caractérisation phénotypique et génotypique de *Cryptosporidium spp.* chez les ruminants** ».

La caractérisation phénotypique et génotypique (identification moléculaire d'espèce et génotype) est le premier objectif de ce travail de thèse qui va nous permettre d'estimer la morphologie et le niveau d'excrétion du parasite par des méthodes microscopiques et d'évaluer la diversité et la structure génétique des populations de cryptosporidies circulant en Algérie chez les ruminants (bovins et ovins). Cette approche est universelle en raison des amorces qui sont génériques et permettent de détecter toutes les espèces du genre *Cryptosporidium*. De plus cette étape va nous permettre d'évaluer le potentiel zoonotique de ce parasite.

## **II. MATERIELS ET METHODES**

Le diagnostic de laboratoire reste le seul moyen pour montrer l'existence de cryptosporidies chez l'individu malade ou porteur de parasites et ceci chez les humains ou les animaux. Comme synthétisé dans la partie bibliographie, la mise en évidence du parasite repose sur de multiples techniques. Il n'existe pas de consensus autour des techniques standards pour la détection des oocystes (techniques de coloration et immunologiques, immunofluorescence avec concentration au préalable ou non), ou pour l'identification des espèces de *Cryptosporidium spp.* (PCR sur différents sites : 18S, HSP70, COWP...). Les techniques de biologie moléculaire ont permis de définir des espèces qui sont très spécifiques à l'hôte, ainsi que d'autres capables d'infecter de nombreux hôtes. *Cryptosporidium parvum* est considéré comme l'espèce la plus répandue dans le monde et également, comme un risque majeur de transmission zoonotique (Xiao, 2010). L'utilisation d'une approche moléculaire pour caractériser génétiquement *Cryptosporidium spp.* a facilité la compréhension de l'épidémiologie de la cryptosporidiose (Xiao, 2010). Afin de répondre aux différents objectifs de notre travail, nous avons utilisé les méthodes les plus adaptées à détecter et identifier les *Cryptosporidium. spp* à partir de la bibliographie.

Pour rechercher le parasite dans les matières fécales et quantifier le niveau d'excrétion en oocystes nous avons utilisé une technique immunologique. Au vu des résultats de spécificité et de sensibilité, le kit d'immunofluorescence Merifluor (*Merifluor Cryptosporidium/Giardia, Meridian*) a été utilisé. Ce kit présente une sensibilité comprise entre 96 et 100% et une spécificité comprise entre 99,8 et 100% (Kehl *et al.*, 1995 ; Garcia *et al.*, 1997 ; Johnston *et al.*, 2003 ; Geurden *et al.*, 2006a, 2008).

Afin d'identifier les espèces de *Cryptosporidium spp* et sous-types de *C. parvum* excrétés par les ruminants nous avons réalisé :

- L'amplification de la sous-unité de l'ARN ribosomal 18S (PCR 18S rRNA), du fait du grand nombre de copies de cette cible retrouvées dans le génome de *Cryptosporidium*. Nous avons utilisé les amorces génériques décrites par Xiao *et al.*, en 1999 et 2001 et Rieux *et al.*, en 2013 qui permettent la détection de toutes les espèces du genre *Cryptosporidium*,
- L'identification des différentes espèces de *Cryptosporidium spp.* par PCR-RFLP. L'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) a été effectuée avec les endonucléases *SspI*, *MboII* et *VspI* sur des produits de PCR 18S rRNA (Feng *et al.*, 2007),

- L'amplification de la glycoprotéine de surface gp60 a été réalisée avec les amorces décrites par Gatei *et al.*, (2007). Cette PCR nous permet, associée à un séquençage, d'identifier le sous-type présent de *C. parvum* et d'évaluer le potentiel zoonotique.

## **II.1. Type de l'étude**

Notre travail est descriptif.

## **II.2. Régions d'étude**

L'étude concerne plusieurs régions d'Algérie : Centre, Est, Ouest, Steppe répartie sur 8 wilayas ciblées (Figure 10 : Carte des différentes régions).

Au centre : Alger, Boumerdes, Tizi Ouzou

A l'Est : SoukAhras, Sétif

A l'Ouest : Sidi Belabbes

A la région Steppique : Djelfa et M'Sila



**Figure 10 : Les régions d'étude**  
(Algérie carte *d-maps.com*)

## **II.3. Population d'étude**

Les populations cibles sont les ruminants et les populations d'étude sont les jeunes animaux ovin et bovin avec ou sans signe clinique (présence ou absence de diarrhée) suite à un examen clinique. Le choix des sujets était basé sur l'âge puis sur le statut clinique des animaux. Les données concernant le plan d'échantillonnage et les caractéristiques des animaux sont consignés dans le chapitre dédié aux résultats.



#### **II.4. Période de l'étude**

A différentes saisons, nous avons collecté des prélèvements à partir d'animaux sains ou diarrhéiques. La période d'étude s'est étalée de l'automne de l'année 2015 jusqu'au printemps 2017, soit une durée de 20 mois.

#### **II.5. Modalités de prélèvement**

Au niveau des élevages, la récolte des prélèvements de fèces fraîches s'est faite sur de jeunes animaux, sains ou diarrhéiques, en présence du vétérinaire de subdivision ou du secteur privé.

##### **II.5.1. Nature des prélèvements**

Les échantillons de fèces provenant de jeunes ruminants ont été prélevés dans des pots en plastiques, immédiatement après leur émission par l'animal (Figure 11) (et cela par excitation de l'orifice anal à l'aide d'un thermomètre).



**Figure 11 :** Récolte des matières fécales directement au moment de leur émission

##### **II.5.2. Identification des prélèvements**

Les prélèvements ont été identifiés sur l'étiquette collée au flacon par numéro. Ce dernier est l'identifiant de l'échantillon qui est reporté sur une fiche commémorative où les informations suivantes sont mentionnées :

- Numéro d'identification de l'animal ;
- Région d'élevage ;
- Date du prélèvement ;
- Age de l'animal ;
- Sexe de l'animal ;

- Poids de l'animal ;
- Statut clinique de l'animal.

### **II.5.3. Transport et conservation des prélèvements**

Les selles récupérées sont recouvertes avec du bichromate de potassium ( $K_2Cr_2O_7$ ) à 2.5% afin d'éviter leur altération. Tous les échantillons sont ensuite acheminés au laboratoire de microbiologie à l'ENSV à Alger. Les prélèvements collectés d'Alger et des régions proches, ont été acheminés immédiatement ou dans un délai de 24h au laboratoire.

Les prélèvements récoltés dans les autres wilayas éloignées, ont été conservés par réfrigération et envoyés vers Alger dans une glacière. Les échantillons ainsi regroupés sont stockés au laboratoire à une température de +4°C jusqu'au moment de leur envoi en France, vers le laboratoire UMR BIPAR.

### **II.6. Réactifs et matériels de laboratoire**

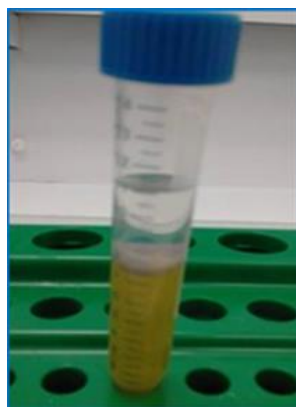
Le matériel et les réactifs, utilisés dans les techniques de biologie moléculaire et d'immunofluorescence sont décrits dans le chapitre méthodes d'analyses.

### **II.7. Méthodes d'analyses**

#### **II.7.1. Concentration des oocystes de *Cryptosporidium* par sédimentation au diéthyle**

Afin de purifier et concentrer les oocystes de *Cryptosporidium*, une prise d'essai de 1 gramme (g) de matière fécale a été mélangée à 10 mL de *Phosphate Buffered Saline (PBS, Gibco by Life technology)* à 1X dans un verre à pied conique avec un agitateur en verre. Après une décantation de 2 minutes, le mélange est filtré à travers une passoire couverte d'une compresse (*LCH Medical products, France*). 7 mL de ce bouillon sont récupérés et additionnés de 3 mL à 4 mL d'ether diéthylique (*Sigma-Aldrich*). Après agitation, cette solution est centrifugée pendant 5 min à 2000 g ce qui laisse apparaître trois phases nettes (Figure 12). Les déchets sont jetés et le culot qui contient les oocystes de *Cryptosporidies* est gardé (Castro-Hermida et al, 2005). Le culot ainsi obtenu est suspendu dans un 1 mL de PBS, puis est décontaminé avec une goutte d'eau de Javel à 1,75% pendant 7 minutes (Fayer et Xiao, 2008). 2 lavages avec 2ml d'eau distillée sont réalisés (centrifugation à 2000g, pendant 5min) et les oocystes sont re-suspendus dans 2 mL de PBS stérile + 10 µl/ ml d'ATB antimycotique (Sigma).

La manipulation de l'éther diéthylique est réalisée sous sorbonne (hotte pour la manipulation de produits chimiques toxiques et volatils selon les mesures de sécurité appliquées à l'ANSES).



**Figure 12 :** Concentration des oocystes à l'éthyle et apparition des trois phases  
(Une phase claire formée de l'éther diéthylique, une phase grise des matières grasses et gros déchets et la phase aqueuse trouble avec un dépôt contenant les oocystes)

### **II.7.2. Recherche et Quantification des oocystes de *Cryptosporidium* par immunofluorescence**

Le principe de ce test immunologique par « immunofluorescence » (IF) directe permet la détection des oocystes de *Cryptosporidium spp.* à l'aide d'anticorps dirigés contre les antigènes de paroi, couplés à la fluorescéine. Le marquage par Immunofluorescence (IF) directe et la quantification des oocystes de *Cryptosporidium* ont été réalisés avec le kit commercial *MerifluorCryptosporidium/Giardia* (Meridian Bioscience, Milano, Italy). Ce kit est décrit et utilisé dans la littérature (Xiao et Herd, 1993 ; Garcia et Shimizu, 1997 ; Johnsnton *et al.*, 2003 ; Geurden *et al.*, 2006). Dans notre étude, nous avons utilisé la méthode selon les étapes suivantes : 20  $\mu$ L échantillons concentrés et de témoins positif et négatif sont déposés sur une lame (slide) noire de 10 puits (Immuno-Cell Int., Dominique Dutscher) (Figure 13). Après un séchage de moins 30 min à température ambiante, les lames sont fixées à l'acétone pendant au moins 10 min. 20  $\mu$ L d'anticorps (monoclonal antibodies « *Detection Reagent* de *Merifluor* ») sont ensuite ajoutés par puits et les lames sont incubées 45min à température ambiante en chambre humide, à l'obscurité. Après un lavage avec la solution de lavage fournie, des lamelles sont déposées sur les lames après ajout d'une goutte de solution de montage (*Mounting Medium: Buffered glycerol containing formalin, an antiquencher and*

0,05% sodium azide). La lecture des lames se fait au moins 2 heures après montage sur des lignes verticales sur toute la lame par microscopie épifluorescence (Leica Microsystems, Suisse) au grossissement X 400. Le nombre d'oocystes de *Cryptosporidium* par gramme de fèces (opg) a été obtenu en multipliant le nombre total d'oocystes par le facteur de dilution.



**Figure 13:** Kit Mérifluor (a), Lame (Slide) noire de 10 puits (b1-b2) avec une lamelle (Coverslide) couvre objet (24 x 67 mm).

### **II.7.3. Détection et identification de *Cryptosporidium* spp. par méthode de biologie moléculaire**

#### **II.7.3.1. Extraction de l'ADN génomique de *Cryptosporidium***

Dans le but d'optimiser l'extraction d'ADN génomique à partir des oocystes, nous avons procédé à la rupture de la paroi de ce parasite par une étape préliminaire de choc thermique. Pour cela, 200  $\mu$ L d'oocystes concentrés sont soumis à 6 séries de chocs thermiques en alternant un traitement dans l'azote liquide (avec une tenue de protection Figure 14(a)) suivi par un bain de 5 min à 95°C.



**Figure 14 :** Matériel de protection pour l'étape de prétraitement avec l'azote (a) et kit d'extraction *QIAamp Mini Kit DNA*(b).

L'ADN total a été extrait par un Kit d'extraction *QIAamp Mini Kit DNA*(QIAGEN) (Figure 14). Cette extraction est réalisée selon les étapes suivantes :

200  $\mu$ L de la suspension prétraitée sont mélangés à 20  $\mu$ L de protéinase K et 200  $\mu$ L de tampon AL, puis le mélange est vortexé durant 15 secondes. Le microtube est incubé dans un bain-marie à 56°C pendant 10 minutes puis centrifugé à vitesse maximale (14 000 rpm) pendant 1 mn. Après ajout de 200  $\mu$ L d'éthanol (100%), l'ensemble est vortexé pendant 15 secondes. Le lysat obtenu est transféré dans une colonne Qiamp déjà insérée dans un tube collecteur de 2 mL et centrifugé à 8000 rpm durant 1 minute. Le filtrat obtenu est éliminé et la colonne transférée dans un nouveau tube collecteur de 2 mL. Un volume de 500  $\mu$ L de tampon AW1 est ajouté à la colonne et le tout a été centrifugé à 8000 rpm durant 1 minute. Cette étape est répétée une seconde fois mais avec un volume de 500  $\mu$ L de tampon AW2 et une centrifugation de 3 minutes à 14 000 rpm. La colonne transférée dans un nouveau tube collecteur de 2 mL est centrifugée à 14 000 rpm durant 1 minute. La colonne est déposée dans un microtube stérile de 1,5 mL et le filtrat est éliminé. 200  $\mu$ L de tampon AE est ajouté directement sur la membrane de la colonne. Après une incubation de 5 minutes à température ambiante une centrifugation pendant 1 minute à 8000 rpm est réalisée. L'éluât obtenu, contenant l'ADN de *Cryptosporidium*, a été ensuite conservé à -20°C.

### **II.7.3.2. Détection de *Cryptosporidium* par PCR nichée 18S**

Une PCR nichée a été effectuée pour amplifier un fragment du gène SSU rRNA de *Cryptosporidium* spp. d'après Xiao *et al.* (1999, 2001) et Rieux *et al.* (2013). Les amorces spécifiques utilisées sont : F2 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' et R2 5'-CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3' pour la première PCR (1<sup>er</sup>RUN) et F3 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3' et R3 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3' pour la seconde PCR (2<sup>ème</sup>RUN). Le Master Mix 2X (Promega), utilisé pour réaliser la PCR nichée, est composé de : MgCl<sub>2</sub> à 3mM, chaque dNTP 400µM et la taq-DNA polymérase à 50U/µl.

Les amorces ont été fournies par le laboratoire *Eurofins Genomics*. Les amplifications ont été effectuées dans un thermocycleur, *Thermal Cycler G(STORM)* avec les étapes suivantes (Figure 15) :

#### **a) Amplification d'ADN**

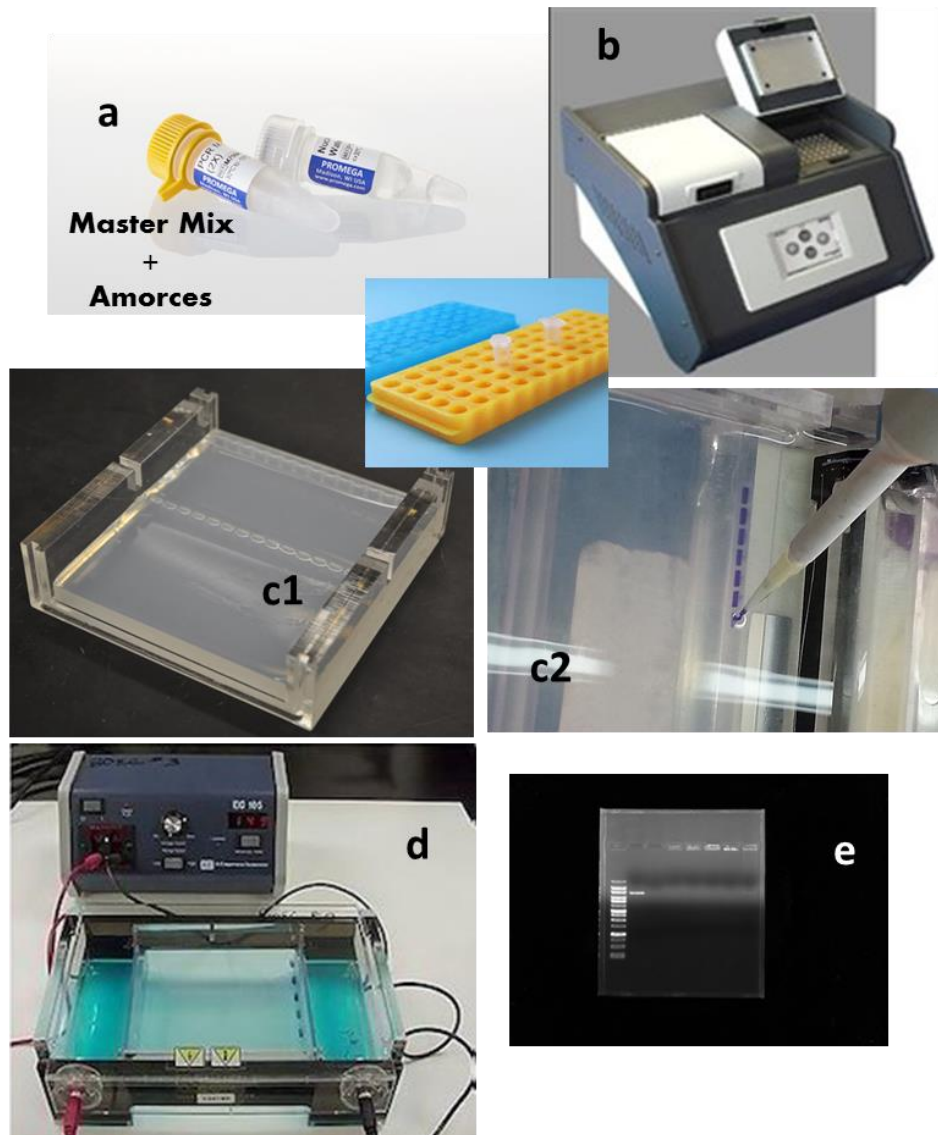
L'amplification est effectuée en deux tours (1<sup>er</sup>RUN et 2<sup>ème</sup>RUN) :

Un mix contenant 25µL de Master Mix, 16µL de Water et 0,5µL de chaque amorce est préparé pour chaque échantillon. Le couple d'amorces F2 et R2 sont utilisées pour le premier tour (1<sup>er</sup>RUN) tandis que le couple d'amorces F3 et R3 sont ajoutés pour le deuxième tour (2<sup>ème</sup>RUN). 8µL d'ADN des échantillons, extraits préalablement, sont ajoutés dans le tube contenant le mix avec le couple d'amorce F2 et R2 (1<sup>er</sup>RUN). Les tubes des échantillons et des témoins ainsi préparés sont placés dans le thermocycleur où le programme suivant est sélectionné : une dénaturation à 94°C pendant 45 secondes, une hybridation à 55°C pendant 45 secondes et une élongation à 72°C pendant 1 minute pendant 40 cycles. Après cette 1<sup>ère</sup> amplification, 5µL des produits de PCR sont ensuite déposés dans le tube contenant le mix avec le couple d'amorce F3 et R3 (2<sup>ème</sup>RUN). Ils sont ensuite amplifiés selon le même programme que le 1<sup>er</sup>RUN.

#### **b) Migration sur gel et lecture sous UV des bandes d'ADN**

10µL des produits d'amplification du 2<sup>ème</sup> RUN sont séparés par électrophorèse sur un gel à 2% d'agarose en TAE 1X. La migration s'effectue à voltage constant (100 V) et l'ADN est visualisé sous UV. La taille des fragments obtenus est déterminée par comparaison avec un marqueur de taille moléculaire (*DNA Ladder Promega*) de 100 paires de base.





**Figure 15:** Différente étape de la PCR nichée 18S  
Préparation avec le Master Mix (a), amplification dans le thermocycleur (b), dépôt  
des ADN dans le gel (c1, c2), migration des ADN en électrophorèse (d) et lecture du  
gel sous UV(e).

### **II.7.3.3. Identification des espèces de *Cryptosporidium* par PCR-RFLP**

Dans le but d'identifier les espèces de *Cryptosporidium* spp. isolées chez les ruminants, les produits d'amplification obtenus par PCR nichée 18S ont été digérés pendant différents temps par trois enzymes de restriction *SspI*, *MboII* et *VspI* (New England BioLabs, France).

Le protocole utilisé a été adapté à partir de ce qui a été décrit dans la littérature (Feng *et al.*, 2007 ; Fayer et Xiao, 2007 et Rieux *et al.*, 2013).

Pour cela, 10 µl de chaque produit amplifié est déposé dans un tube contenant 0,4µL de l'enzyme utilisé, 7,6 µl d'eau distillée stérile et 2µl de buffer (tampon servant de solvant pour l'enzyme). La digestion enzymatique s'effectue dans un bain Marie à 37°C. Le temps d'incubation est de 4 heures avec l'enzyme *VspI*, 2 h avec *SspI* et 1 h avec l'enzyme *MboII*.

Les fragments d'ADN obtenus sont séparés par électrophorèse sur un gel à 3% méthaphore d'agarose dans du TAE (1X). La migration s'effectue par comparaison avec un marqueur de taille moléculaire 100 paires de base (*DNA Ladder Promega100bp*) sous UV.

#### **II.7.3.4. Détection de *Cryptosporidium* par PCR nichée gp60**

Une PCR nichée gp60 est réalisée afin d'amplifier le fragment du gène de la glycoprotéine de surface, gp60 d'après Alves *et al.*(2003, 2006) ; Gatei *et al.*(2007) ; Xiao *et* Ryan(2008) ; Xiao (2010). Cette recherche permet d'apprécier le potentiel zoonotique de certains isolats. Afin de détecter ce gène, nous avons amplifié ce dernier et séparé les fragments d'ADN en présence de bandes témoin.

##### **a) Amplification d'ADN**

La réaction de polymérisation en chaine du gène codant pour la glycoprotéine 60 a été effectué par l'addition du *Master Mix* et les amorces spécifiques F1 et R1 (5'-ATA GTC TCC GCT GTA TTC-3' et 5' GGA AGG AAC GAT GTA TCT-3') pour la première PCR (1<sup>er</sup>*RUN*) ; F2 et R2 (5'-TCC GCT GTA TTC TCA GCC-3' et 5'GCA GAG CCA GCA TC-3') pour la deuxièmePCR (2<sup>ème</sup>*RUN*). Le mélange est centrifugé et distribué à raison de 42µL et 45µL dans des tubes de 0,2mL au nombre des échantillons d'ADN extraits préalablement. Dans le 1<sup>er</sup>*RUN*, un volume de 8µL de cette ADN est ajouté dans le tube contenant les 42µL de Master Mix (tubes tests) et dans le second *RUN*, 5µL des échantillons amplifiés au 1<sup>er</sup> tour sont ajouté dans les tubes de 45µL.

Il est important de préparer au même moment un témoin d'amplification (42µL de *MasterMix* et 8µL de *Water*)

Les tubes tests plus le tube témoin sont placés pour amplification dans le thermocycleur (*Thermal Cycler GSTORM*) où le programme gp60 suivant est sélectionné : une dénaturation à 94°Cpendant 45 secondes, une hybridation à 50°C pendant 45 secondes et une élongation à 72°Cpendant 1 minute pour 35 cycles.



**b) Migration sur gel et lecture sous UV des bandes d'ADN**

Comme décrite précédemment pour la PCR nichée 18S la migration des fragments gp60 se fait avec le même protocole : Après préparation d'un gel d'agarose à 2% (2g d'agarose dans 100 mL de TAE 1X), 10 $\mu$ L des produits d'amplification avec le tampon de charge 6X sont déposés dans des puits sur le gel d'agarose au BET et les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse. La migration s'effectue à voltage constant (100 V) et l'ADN est visualisé sous UV. La taille des fragments obtenus est déterminée par comparaison avec un marqueur de taille moléculaire (*DNA Lader Promega*) de 100 paires de base.

**II.7.3.5. Séquençage du gène de la glycoprotéine 60 chez *C. parvum***

Le séquençage est réalisé par la société *Genoscreen*. Les produits d'amplification de la PCR gp60 ainsi que nos amorces ont été envoyés au laboratoire de séquençage accompagné d'un formulaire de données informatisées où les échantillons ont été identifiés avec des numéros et avec la quantité envoyée. Les produits de PCR gp60 sont purifiés par filtration avec des concentrateurs. Les échantillons de *C. parvum* ont été sous-typés par analyse de séquence PCR du locus glycoprotéine de 60 kDa (gp60) dans les deux sens de lecture à l'aide d'un séquenceur automatisé.

Suite à ce traitement, les résultats des gènes séquencés ont été reçus sous forme de document informatisé. L'étude d'identité des séquences a été effectuée avec le logiciel Blast avec l'application de Bio Edit. Les séquences de consensus ont été obtenues à l'aide du logiciel BioEdit (version 5.0.6). Les sous-types de *C. parvum* ont été nommés à l'aide du système de nomenclature recommandé (Sulaiman *et al.*, 2005 ; Xiao, 2010).

**II.7.4. Analyses statistiques**

Les tests Kruskal-Wallis et Mann-Witney ont été utilisés pour analyser les données en comparant le niveau de l'infection avec l'âge de l'animal, le statut clinique et l'effet région. Les tests Khi\_deux ( $\chi^2$ ) et Fisher ont été utilisés pour estimer la présence du parasite et certains facteurs favorisant l'infection. Les résultats ont été jugés statistiquement significatifs lorsque la valeur de  $p$  était  $\leq 0,05$ .

### **III. RESULTAT**

#### **III.1. PLAN D'ANALYSE**

Au cours de notre étude, nous avons procédé à une description et une analyse de la population d'étude, en amont des résultats afin d'exploiter au mieux certains facteurs favorisant l'apparition du parasite. Les informations récoltées relatives à l'animal et l'élevage ont été enregistrées, saisies et gérées dans une base de données.

##### **III.1.1. Choix de la population animale**

Notre travail a été réalisé chez les jeunes animaux. Nous avons ciblé ces derniers car ils sont les plus sensibles aux diarrhées néonatales.

En effet, les *Cryptosporidium spp.* sont mentionnés parmi les agents étiologiques de ces affections chez les jeunes ruminants.

##### **III.1.2. Nombre d'animaux étudiés par région**

###### **III.1.2.1. Chez les bovins**

Les bovins étudiés sont issus d'un total de 12 élevages, répartis sur 5 wilayas, de deux régions d'Algérie : Centre (Alger, Boumerdès et Tizi Ouzou), Est (Sétif et Souk Ahras) (Tableau 7).

Notons que plus de la moitié des bovins étudiés sont issus de la région Centre et près de la moitié de la région Est. En effet, 3 wilayas sur les 5 étudiées appartiennent à la région Centre et deux wilayas appartiennent à la région Est. Ceci s'explique par le fait qu'au début du lancement des récoltes des prélèvements, nous avons ciblé les régions connues par l'abondance de l'élevage bovin vu les conditions favorables surtout le pâturage (disponibilité de l'aliment vert).


Les 5 wilayas des deux régions étudiées figurent parmi les premières wilayas en effectif bovins (Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et du Développement Rural, 2016).

En revanche, dans les wilayas de l'Ouest appartenant à une région ciblée, nous n'avons pas pu étudier des animaux, dus à la collaboration relative des vétérinaires pour prélever des animaux.


###### **III.1.2.2. Chez les ovins**

Les ovins étudiés sont issus d'un total de 14 élevages, répartis sur 4 wilayas, de trois régions d'Algérie : Centre steppique (Djelfa et M'sila), Est (Souk Ahras), Ouest (Sidi Belabbas) (Tableau 8).

**Tableau 7 : Nombre de bovins et d'élevages étudiés par région**

Régions	Wilayas	Nombre d'animaux	Nombre d'élevages
			
<b>Centre</b>	Alger	9	1
	Boumerdes	9	1
	Tizi Ouzou	16	3
<b>Total centre (%)</b>		<b>34 (52,30)</b>	<b>5 (41,66)</b>
<b>Est</b>	Sétif	20	6
	Souk Ahras	11	1
<b>Total Est (%)</b>		<b>31 (47,69)</b>	<b>7 (58,33)</b>
<b>Total des 2 régions</b>		<b>65 (100)</b>	<b>12 (100)</b>

**Tableau 8 : Nombre d'ovins et d'élevages étudiés par région**

Régions	Wilayas	Nombre d'animaux	Nombre d'élevages
			
<b>Centre steppique</b>	Djelfa	24	3
	M'sila	17	3
<b>Total centre steppique (%)</b>		<b>41 (49,39)</b>	<b>6 (42,85)</b>
<b>Est</b>	Soukahras	5	1
<b>Total Est (%)</b>		<b>5 (6,02)</b>	<b>1 (7,14)</b>
<b>Ouest</b>	Sidi Belabbas	37	7
<b>Total Ouest (%)</b>		<b>37 (44,57)</b>	<b>7 (50)</b>
<b>Total des 3 régions (%)</b>		<b>83 (100)</b>	<b>14 (100)</b>

Pour l'effectif ovin, notons que la moitié des animaux étudiés sont issus de la région Steppique et près de l'autre moitié appartiennent à la région Ouest. Ces régions ont été ciblées du fait de l'expansion de l'élevage ovin. En effet, les wilayas où les prélèvements ont été collectés figurent parmi les wilayas les plus peuplées en espèce ovine (Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et du Développement Rural, 2016).

En revanche, dans certaines wilayas ciblées appartenant à la région Est, peu d'animaux ont été étudiés.

### **III.1.3. Nombre et type d'élevages étudiés par région**

#### **III.1.3.1. Chez les grands ruminants**

Dans les régions étudiées, la plupart des élevages sont de type extensif où les animaux sont libres en pâturage le jour, et à l'étable la nuit.

Les bovins étudiés au cours de ce travail proviennent en totalité d'élevages laitiers avec une majorité de type extensif, semi-extensif et une minorité d'élevages intensifs. Parmi les douze élevages étudiés, 9 étaient extensifs ou semi-extensifs et 3 élevages étaient intensifs dont deux situés dans la wilaya de Sétif et un localisé dans la wilaya de Tizi Ouzou (Tableau 9).

#### **III.1.3.2. Chez les petits ruminants**

Les élevages étudiés sont en majorité de nature extensif où les animaux sont libres en pâturage le jour, et sont en bergerie la nuit.

Les quatorze (14) élevages des petits ruminants concernés sont représentés essentiellement par des fermes d'élevage extensif et semi-extensif que d'élevage intensif. Parmi les 14 fermes des ovins, 9 élevages étaient de type extensif et 5 élevages de type intensif (Tableau 10).

**Tableau 9 :** Les différents types d'élevages étudiés chez les grands ruminants

Régions	Wilayas	Nombre d'élevages	Nature d'élevages	
			Extensif Semi-extensif	Intensif
Centre	Alger	1	E8 N=1	0
	Tizi Ouzou	3	E9, F10 N=2	E11 N=1
	Boumerdès	1	E12 N=1	0
Est	Sétif	6	E1, E4, E5, E6 N=4	E2, E3 N=2
	Soukahrass	1	E7 N=1	0
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>3</b>

-E : élevage ; -N : nombre

**Tableau 10 :** Les différents types d'élevages étudiés chez les petits ruminants.

Régions	Wilayas	Nombre d'élevages	Nature d'élevages	
			Extensif Semi-extensif	Intensif
Ouest	Sidi-Belabbes	7	E3, E4, E5, E6, E7, E8 N=6	E2 N=1
Centre steppique	Djelfa	3	E9 N=1	E10, E11 N=2
	M'sila	3	E12 N=1	E13, E14 N=2
Est	Souk-Ahras	1	E1 N=1	0
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>14</b>	<b>9</b>	<b>5</b>

-E : élevage ; -N : nombre

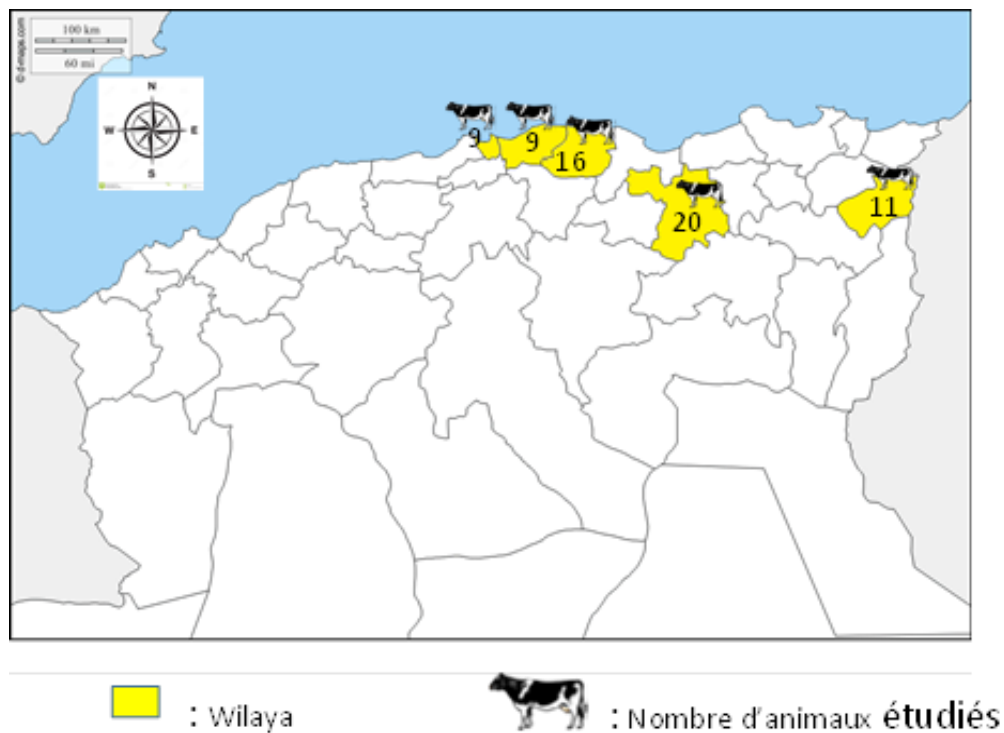
### **III.1.4. Nombre des ruminants étudiés par wilaya**

#### **III.1.4.1. Chez les bovins**

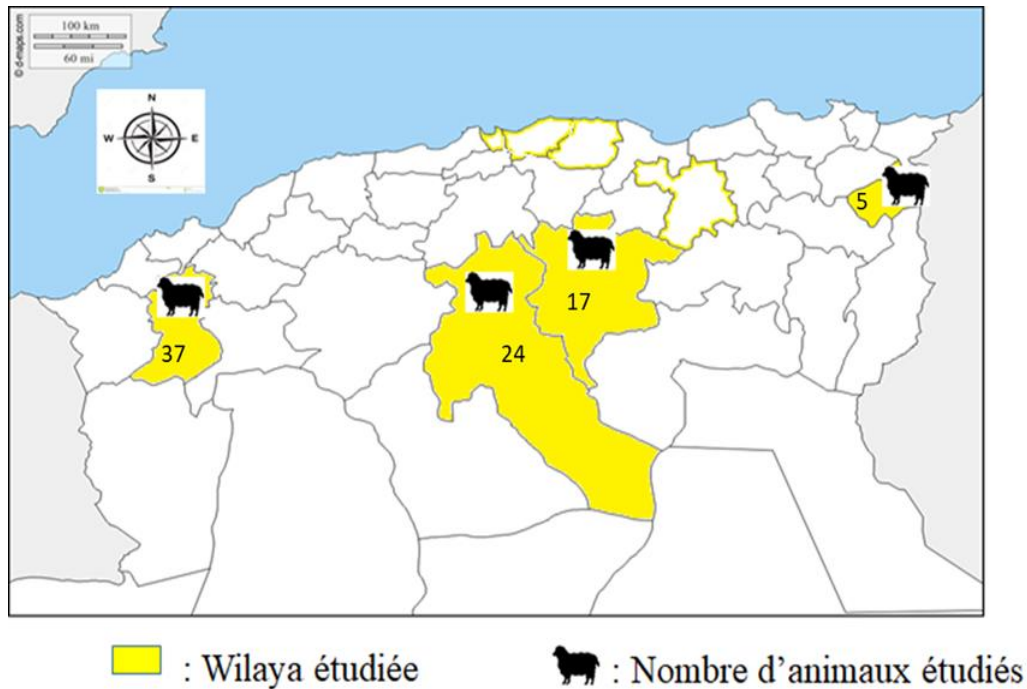
Un total de 65 veaux a été examiné et leurs matières fécales prélevées, le nombre d'échantillons par wilaya est présenté dans la Figure 16.

#### **III.1.4.2. Chez les ovins**

Un total de 83 agneaux a été examiné et leurs matières fécales prélevées. Le nombre d'échantillon par wilaya est présenté dans la Figure 17.



**Figure 16 :** Distribution du nombre de bovins étudiés par wilaya



**Figure 17 :** Distribution du nombre d'ovins étudiés par wilaya.

### **III.1.5. Age des animaux étudiés**

#### **III.1.5.1 Chez le veau**

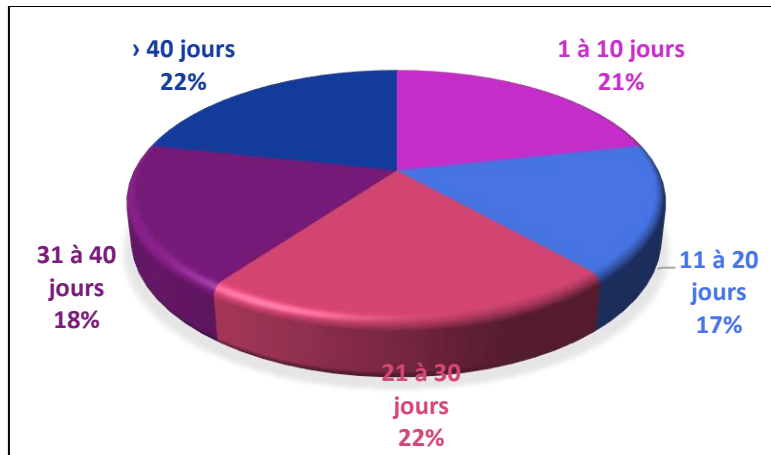
Les jeunes bovins étudiés sont âgés entre 3 jours et 180 jours, dont la majorité (78%) se situe dans la tranche d'âge de 3 à 40 jours. Près de la moitié des veaux sont âgés entre 21 et 40 jours. Ceci s'explique par le fait que nous avons ciblé les jeunes animaux. Dans les élevages de rente, les maladies digestives (diarrhées néo-natales) affectent surtout les jeunes veaux. *Cryptosporidium spp.* sont considérées comme l'un des entéropathogènes majeurs responsables de ces maladies néonatales.

Néanmoins, un quart des animaux sont âgés de plus de 40 jours. Au fait dans cette tranche d'âge, il nous était possible de connaître les espèces du parasite qui circulaient chez les animaux aux delà d'un mois (Figure 18).

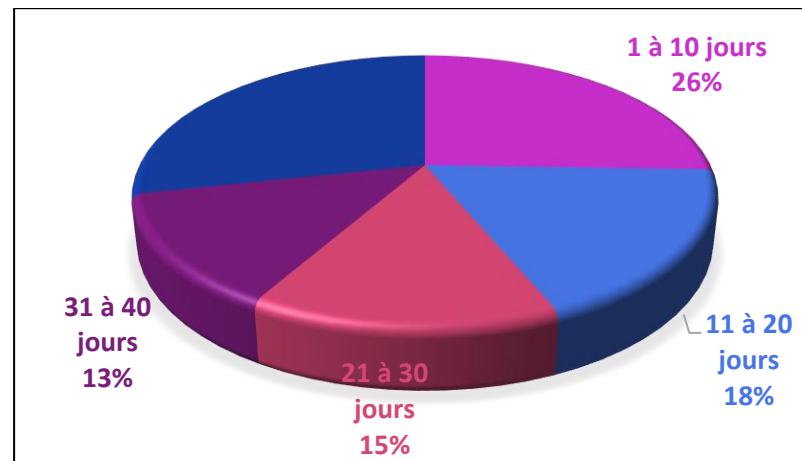
#### **III.1.5.2. Chez l'agneau**

Il est à noter la même observation, les jeunes ovins étudiés sont âgés entre de 3 et 180 jours, dont la majorité (72%) se situe dans la tranche d'âge de 3 à 40 jours. La moitié des agneaux sont âgés de 3 à 20 jours, plus d'un quart de 21 jours à 40 jours. Cette tranche d'âge laisse l'animal plus sensible au parasite et donc à la maladie.

Nous constatons dans notre échantillon, un nombre de plus du quart des animaux sont âgés entre 40 et 90 jours (Figure 19).



**Figure 18 :** Répartition des effectifs bovins étudiés selon l'âge.



**Figure 19 :** Répartition de l'effectif des ovins étudiés selon l'âge.

### **III.1.6. Race des animaux étudiés**

Les bovins étudiés appartiennent aux différentes races existantes en Algérie. Dans notre échantillon, plus d'un quart des bovins sont de race *Holstein* (69%), suivi des bovins de la population locale (25%), en troisième position des bovins croisés et des bovins de la race *Montbéliarde*.

Les ovins étudiés appartiennent en majorité à la race d'Oueld-Djellal (64%), et la race *Hamra* (36%).

### **III.1.7. Statut clinique des animaux**

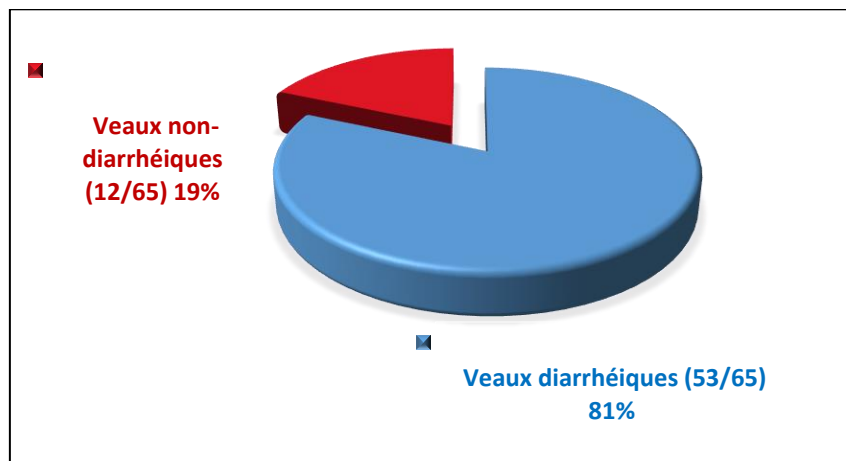
#### **III.1.7.1. Chez le bovin**

Sur 65 bovins examinés, 53 veaux présentaient un syndrome diarrhéique. Les résultats mentionnés dans la Figure 20 indiquent qu'un peu plus de 81% des veaux concernés par le prélèvement étaient diarrhéiques contre 19% qui ne l'étaient pas.

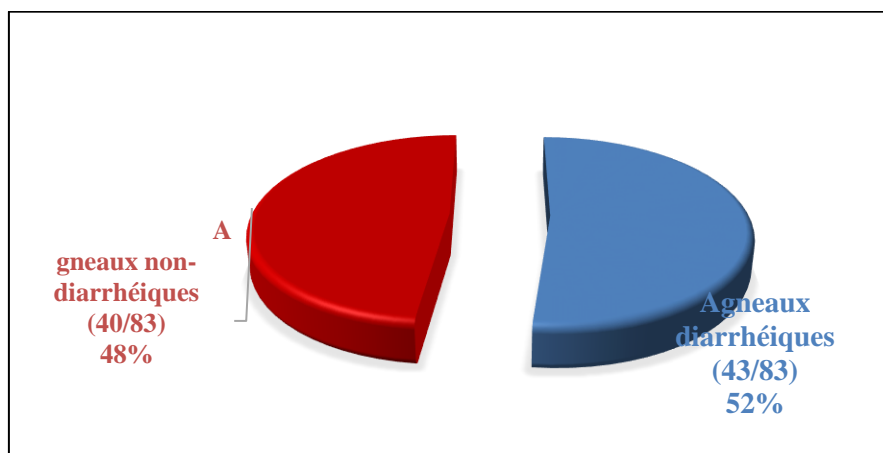


### **III.1.7.2. Chez l'ovin**

Pareillement, chez les 83 ovins examinés, la plupart des animaux présentés un syndrome diarrhéique. Un nombre de 43/83, un peu plus que la moitié (52%) des matières fécales prélevées chez les ovins étaient diarrhéiques, alors que moins de la moitié (40/83) étaient cliniquement sains (Figure 21).



**Figure 20 :** Statut clinique des bovins étudiés.



**Figure 21 :** Statut clinique des ovins étudiés.

En conclusion, les deux paramètres les plus incriminés et favorisant l'apparition de la cryptosporidiose étaient présents dans l'effectif des bovins et des ovins étudiés. En effet, selon cette analyse les veaux sevrés étudiés étaient âgés tous de trois jours et plus, dont 78% des cas de moins de 40 jours. Ils étaient en majorité diarrhéiques avec un taux de 81% contre 19% cliniquement sains. De même les agneaux étaient âgés dans 72% des cas de moins de 40 jours. Ils présentaient un syndrome diarrhéique chez 52% des animaux.

## III.2. RESULTATS DE LA CARACTERISATION PHENOTYPIQUE ET GENOTYPIQUE DE *CRYPTOSPORIDIUM* CHEZ LE BOVIN

### III.2.1. CARACTERISATION PHENOTYPIQUE

#### III.2.1.1. Elevages bovins positifs à l'analyse par immunofluorescence

Le tableau (11) montre que tous les élevages (12/12) étudiés sont infectés par *Cryptosporidium spp.* Un taux positif de 100% du parasite a été retrouvé au niveau élevage. Comme précédemment le taux le plus élevé était pour les élevages extensifs avec 75% (9/12) et 25% (3/12) était positifs pour les élevages intensifs.

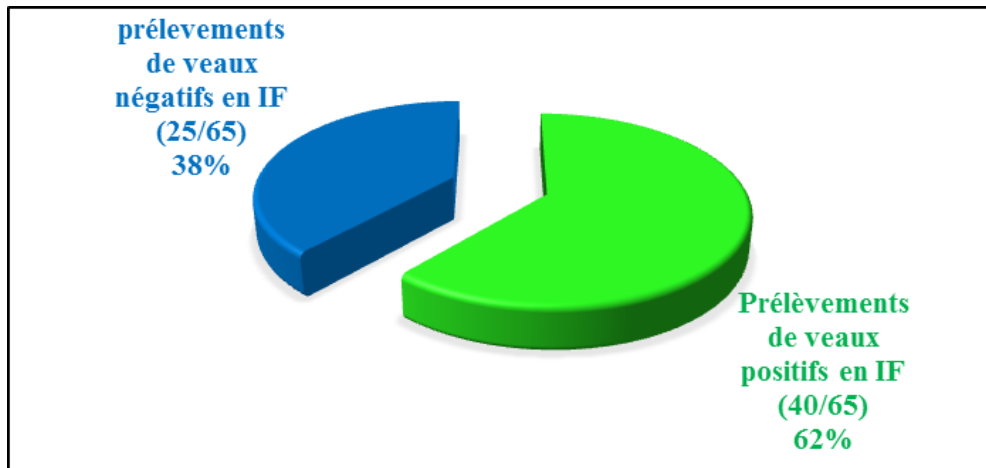
**Tableau 11 :** Nombre d'élevage bovins positifs déterminés à l'immunofluorescence.

Wilaya N=5	Elevage N=12	Elevage Extensi f N=9	Elevage intensif N=3	Elevages positives en IF		
				Total N=12	Extensif N=9	Intensif N=3
SETIF	6	E1, E4, E5, E6, N=4	E2, E3 N=2	6	E1, E4 E5, E6 N=4	E2, E3 N=2
TIZI OUZOU	3	E9, E10 N=2	E11 N=1	3	E9, E10 N=2	E11 N=1
SOUK-AHRAS	1	E7 N=1	0	1	E7 N=1	0
ALGER	1	E8 N=1	0	1	E8 N=1	0
BOUMERDES	1	E12 N=1	0	1	E12 N=1	0
<b>Total</b>	12	9	3	12	9	3
<b>(%)</b>	(100)	(75)	(25)	(100)	(75)	(25)

-N : nombre ; -E : élevage ; IF : analyse à l'immunofluorescence

#### III.2.1.2. Nombre de bovins positifs à *Cryptosporidium spp.* analysés par IF

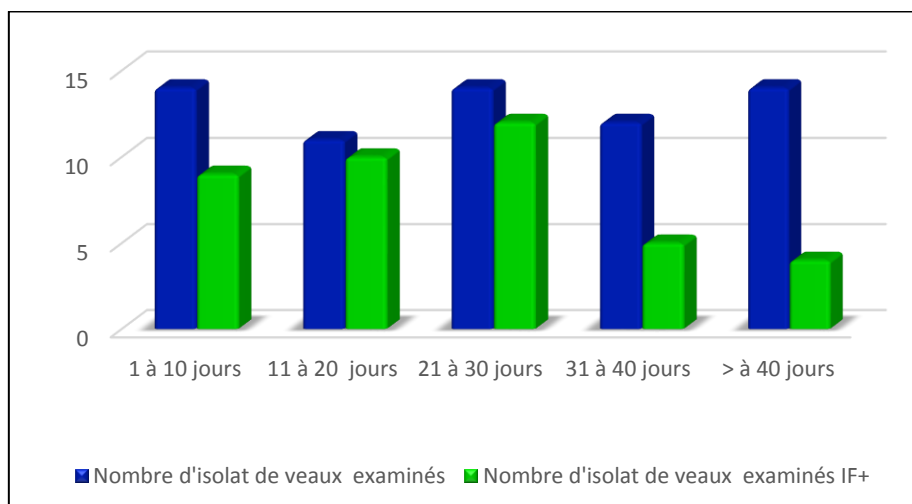
Suite à l'analyse par immunofluorescence (IF), l'examen microscopique a révélé la présence d'oocystes de *Cryptosporidium spp.* dans 61,53% des échantillons prélevés chez les veaux (40/65) (Figure 22).



**Figure 22 :** Prévalence de la cryptosporidiose dans les matières fécales des veaux analysées par immunofluorescence.

**a) Nombre de bovins positifs détecté par (IF) en fonction de l'âge**

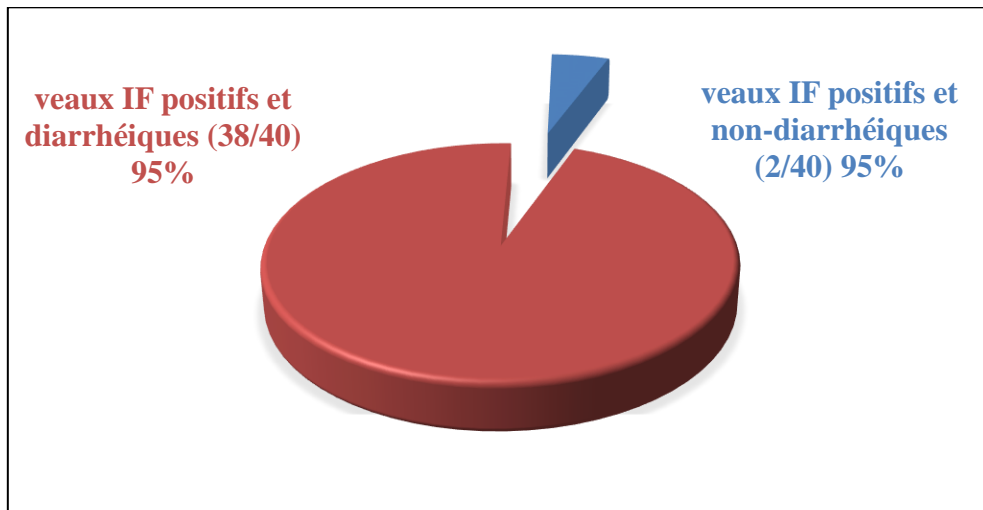
La présence du parasite était observée chez les animaux dans toutes les tranches d'âge. Néanmoins, le nombre d'animaux positifs variait en fonction de leur âge (Figure 23). *Cryptosporidium* a été détecté chez 9/14 (64,28%), 10/11 (90,9%), 12/14 (85,7%), 5/12 (41,66) et 4/14 (28,5%) des animaux échantillonnés au cours de (1 à 10 jours), de (11 à 20 jours), de (21 à 30 jours), de (31 à 40 jours) et de (> 40 jours). Le test de Fisher fait apparaître une corrélation positive et très significative ( $p=0,003$ ) entre l'âge des animaux et la présence du parasite. Les résultats montrent que les animaux les plus infectés sont âgés de moins d'un mois, et les taux les plus élevés sont enregistrés chez les animaux âgés entre 3 et 4 semaines (Figure 23). Toutefois, les animaux autour de 5 semaines étaient infectés à raison de 41,66%.



**Figure 23 :** Détection des isolats de veaux infectés (nombre) par immunofluorescence en fonction de l'âge (jours).

**b) Bovins positifs analysés par immunofluorescence en fonction du statut clinique**

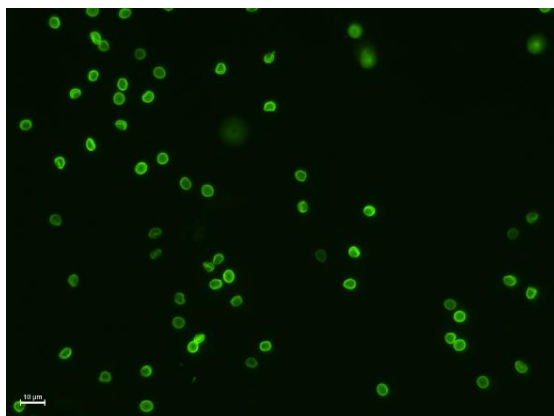
L'examen microscopique à l'immunofluorescence a montré que 95% des veaux infectés sont diarrhéiques (38/40). Néanmoins, (2/40 soit 5%) étaient positifs asymptomatiques (Figure 24). Le test de khi-deux nous a permis de confirmer une relation positive et hautement significative ( $p=0,00000002$ ) entre la présence du parasite et les sujets cliniquement malades.



**Figure 24 :** Détection des veaux infectés (nombre) analysés par immunofluorescence en fonction du statut clinique

**III.2.1.3. Quantification et analyse du niveau d'excrétion chez les veaux**

L'examen au microscope a permis d'abord l'identification morphologique de *Cryptosporidium spp.* (Figure 25) et d'autre part, de donner une orientation sur l'espèce parasitaire. En effet, les oocystes observés possédaient une taille de  $5\ \mu\text{m} \times 4,5\ \mu\text{m}$  avec une forme sphérique. Les mesures retrouvées se positionnent en majorité sur l'espèce de *C. parvum*. Par ailleurs, étant donné que les bovins adultes sont infectés par plusieurs espèces, la morphométrie ne peut pas permettre l'identification des espèces de ce parasite chez ces animaux. Néanmoins, chez les plus jeunes l'espèce *C. parvum* est la plus rapportée (OIE, 2008 ; 2018).



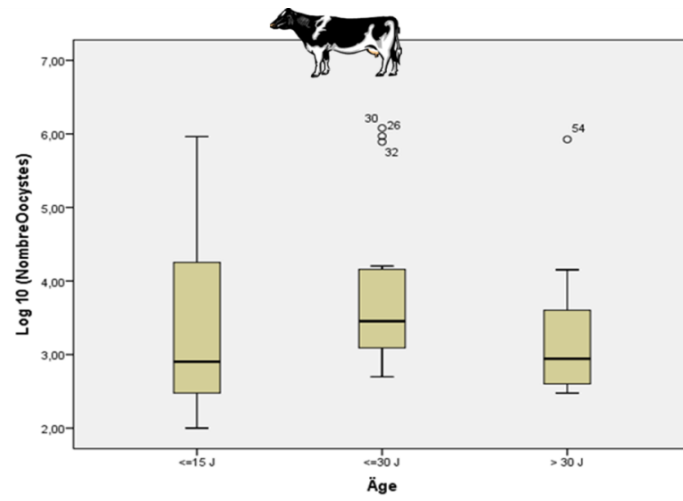
**Figure 25 :** *Cryptosporidium spp.* observés à l'immunofluorescence dans les matières fécales après concentration chez les bovins X40 (UMR BIPAR, 2017 Photo personnelle)

Sur les 65 échantillons examinés au microscope par l'immunofluorescence, 40 (62%) des échantillons fécaux étaient positifs pour la recherche d'oocystes de *Cryptosporidium spp.*, indiqué déjà précédemment. Les niveaux d'excrétion variaient de  $10^2$  à  $10^6$  opg. La moitié avait un niveau d'excrétion entre  $10^3$  et  $10^4$  opg (20/40). Et plus du quart des échantillons ont montré un nombre de  $10^4$  à  $10^6$  (11/40) d'oocystes dans un gramme de matières fécales. En revanche, plus de  $\frac{1}{4}$  (15/40) des matières fécales examinées, leur niveau d'excrétion n'excédait pas  $10^2$  opg.

Pour compléter cette approche phénotypique, une analyse descriptive a été réalisée afin de mettre en relief quelques facteurs de risque de l'apparition de ce parasite. Nous avons tenté de mettre en évidence certaines corrélations entre les taux d'excrétion des oocystes et les paramètres favorisant l'infection chez l'animal.

#### ***a) Excrétion des oocystes chez le bovin en fonction de l'âge***

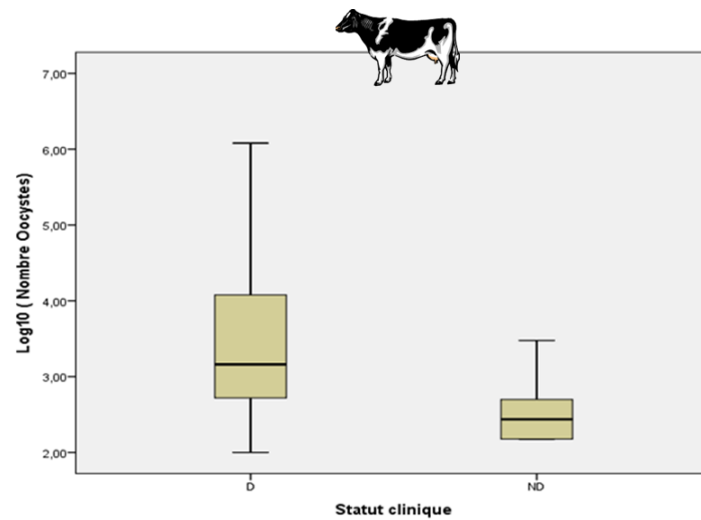
La présence des Cryptosporidies est relevée dans toutes les tranches d'âge des ruminants étudiés. Cependant, le niveau le plus élevé d'excrétion était marqué pour les veaux âgés d'un mois. Une relation a été étudiée entre le niveau d'excrétion (nombre d'oocystes) chez les veaux en fonction de l'âge (15 jours, 30 jours et  $> 30$  jours) successivement. Les moyennes ( $A = 3,38 \pm 0,3$  ;  $B = 3,86 \pm 0,28$  et  $C = 3,35 \pm 0,33$ ) ont été obtenues. Ceci n'a révélé aucune différence significative avec  $p = 0,263$ . Ce résultat a mis en évidence l'absence de corrélation entre l'âge du veau et le niveau de l'excrétion (Figure 26).



**Figure 26 :** Excrétion des oocystes (nombre) chez les bovins en fonction de l'âge (jour).

***b) Excrétion des oocystes chez le veau en fonction du statut clinique***

Concernant le niveau d'excrétion des oocystes en fonction du statut clinique des veaux, une corrélation positive et significative a été révélée ( $p = 0,036$ ). Les veaux cliniquement malades montraient des matières fécales avec un nombre plus élevé d'oocystes par rapport aux animaux asymptomatiques (Figure 27).

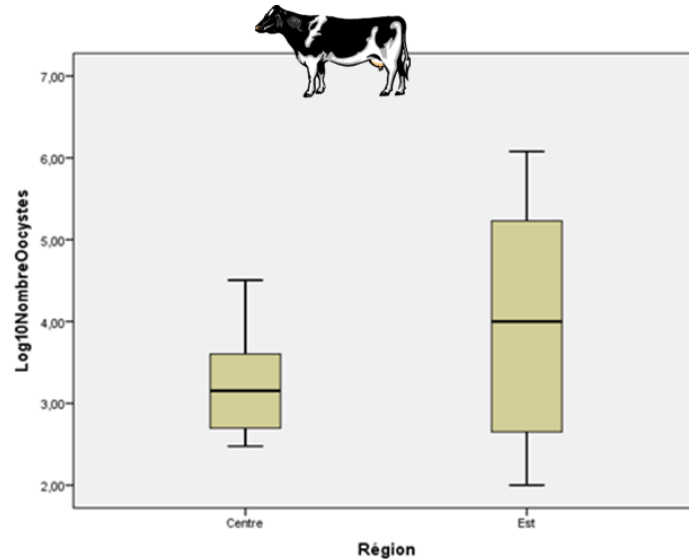


**Figure 27 :** Excrétion des oocystes (nombre) chez les bovins en fonction du statut clinique.

***c) Excrétion des oocystes chez le veau en fonction des régions de récolte***

Nos résultats n'ont montré aucune relation quant au niveau d'excrétion des oocystes chez l'animal et la localisation géographique des élevages. En effet, la différence entre région était

non significative ( $p = 0,619$ ) avec les moyennes de  $3,98 \pm 0,12$  et  $3,21 \pm 0,33$  dans les régions Est et Centre respectivement. Les animaux avaient un niveau d'excrétion d'oocystes similaire dans les deux régions étudiées (Figure 28).



**Figure 28 :** Excrétion des oocystes (nombre) chez les bovins en fonction des régions d'étude (Centre et Est)

### III.2.2 CARACTERISATION MOLECULAIRE

#### III.2.2.1. Elevages positifs caractérisés par PCR nichée ARNr 18S

Le tableau 12 montre que près de la totalité des élevages étudiés (11/12) sont infectés par *Cryptosporidium spp.*, ce qui représente une prévalence de 91,66% identifiée par PCR nichée ARNr18S.

Comme précédemment avec l'analyse microscopique, le pourcentage le plus élevé était retrouvé dans les élevages extensifs avec 82% (9/11) et 18% (2/11) était positifs pour les élevages intensifs.

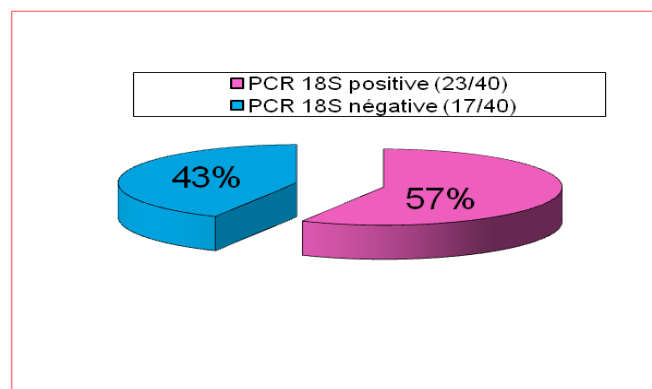
#### III.2.2.2. Isolats de veaux positifs caractérisés par PCR nichée ARNr18S

Parmi les 40 veaux diarrhéiques et sains identifiés par immunofluorescence, 23 se sont révélés positifs par PCR nichée de la SSU ARNr 18S, soit 57%. Par contre, 17 veaux étaient négatifs l'équivalent de 43% (Figure 29).

**Tableau 12 :** Nombre d'élevage bovins positif identifiés par PCR 18S

Wilaya N=5	Ferme N=12	Elevage Extensif N=9	Elevage intensif N=3	Elevages positifs en PCR		
				Total N=12	Extensif N_9	Intensif N_3
SETIF	6	E1, E4, F5, F6, N=4	E2, E3 N=2	5	E1, E4 E5, E6 N=4	E3 N=1
TIZI OUZOU	3	E9, F10 N=2	E11 N=1	3	E9, E10 N=2	E11 N=1
SOUK- AHRAS	1	E7 N=1	0	1	E7 N=1	0
ALGER	1	E8 N=1	0	1	E8 N=1	0
BOUMERDES	1	E12 N_1	0	1	E12 N_1	0
<b>Total</b>	12	9	3	11	9	2
<b>(%)</b>	(100)	(75)	(25)	(91,66)	(81,81)	(18,1)

N : nombre ; E : élevage



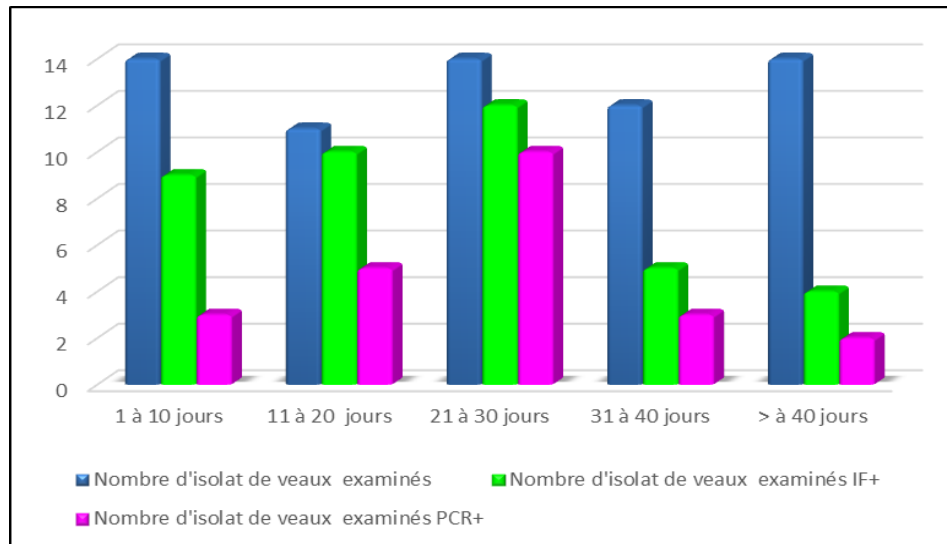
**Figure 29 :** Prévalence de *Cryptosporidium spp.* chez les isolats bovins détectées par PCR nichée ARNr 18S.

#### a) Nombre d'animaux par tranche d'âge

Selon la caractérisation moléculaire, le parasite apparaît chez les animaux dans toutes les tranches d'âge. Cependant, la présence du parasite était observée surtout chez les veaux ayant



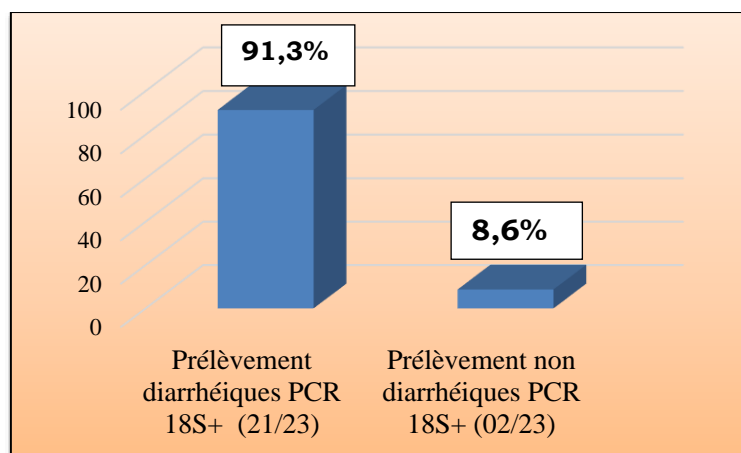
moins d'un mois, dont le taux le plus élevé avec 83% (10/12) a été observé chez les jeunes veaux entre 21 et 30 jours, le test de Fisher laisse apparaître une relation positive et très significative où  $p= 0.003$  (Figure 30).



**Figure 30 :** Répartition des isolats de veaux (nombre) positifs à *Cryptosporidium spp* en fonction de l'âge (jours).

#### b) Veaux positifs en fonction du statut clinique

La figure 31 montre un taux de 91% (21/23) de prélèvements diarrhéiques positifs à l'identification par PCR-ARNr 18S contre seulement deux animaux (2/23) étaient positifs asymptomatiques. Le test khi-deux d'homogénéité nous a permis de montrer une relation positive et hautement significative avec  $p<0,00007$  (Figure 31).

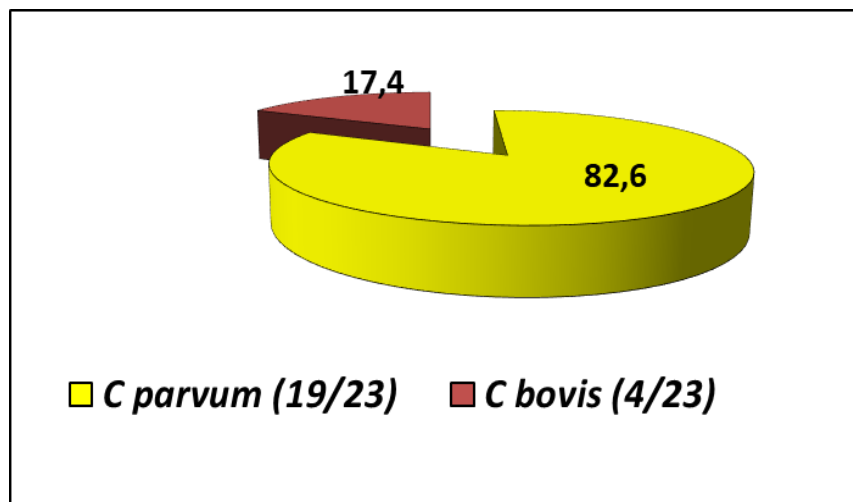


**Figure 31 :** Répartition du nombre des isolats de veaux positifs à *Cryptosporidium spp* identifiés par PCR en fonction du statut clinique.

### **III.2.2.3. Identification des espèces de *Cryptosporidium* par PCR-RFLP**

Les séquences obtenues par PCR nichée ARNr 18S ont été identifiées par PCR-RFLP. Les résultats de cette analyse ont montré la présence de 2 espèces de *Cryptosporidium* (*Cryptosporidium parvum* et *Cryptosporidium bovis*).

La présence de l'espèce *C. parvum* était dominante avec un taux élevé de 82,6% (19/23) suivie par l'espèce *C. bovis* avec 17,4% (4/23) (Figure 32).



**Figure 32 :** Répartition des espèces *Cryptosporidium spp* chez les bovins.

#### **a) Présence des espèces de *Cryptosporidium spp.* en fonction de l'âge**

Selon les résultats obtenus par PCR-RFLP, l'infection par *C. parvum* est observée surtout chez les veaux ayant moins d'un mois, âgés entre 2 et 4 semaines, dont le taux le plus élevé est présent chez les sujets de 3 semaines. Cependant, *C. bovis* infecte les animaux âgés entre 2 et 4 semaines (Tableau 13).

#### **b) Présence des espèces de *Cryptosporidium spp.* en fonction du statut clinique**

L'infection par *C. parvum* était présente chez les veaux cliniquement malades alors que *C. bovis* était présente chez les animaux diarrhéiques et les non-diarrhéiques (Tableau 13).

**Tableau 13 :** Nombre de bovins infectés par *C. parvum* et *C. bovis* en fonction de l'âge et du statut clinique

Age Semaine	Espèces	
	<i>C. parvum</i>	<i>C. bovis</i>
1 <sup>ère</sup>	1	0
2 <sup>ème</sup>	4	1*
3 <sup>ème</sup>	7	2 dont 1*
4 <sup>ème</sup>	4	1
5 <sup>ème</sup>	3	0
	19	4
<b>Total</b>	23	

(\*) : Non-diarrhéique

#### III.2.2.4. Recherche du gène de la gp60 et son séquençage dans les isolats bovins infectés par l'espèce *C. parvum*

La recherche, du gène de la glycoprotéine 60 de l'espèce *C. parvum*, effectuée sur les 19 isolats bovins positifs montrent la présence de ce gène dans 15 isolats soit 79% contre 04 isolats négatifs.

Le séquençage du gène de la gp60 de l'espèce *C. parvum*, dans les 15 isolats, montre l'existence de deux familles de sous-types IIa et IIb : IIaA16G2R1 (n = 8), IIaA15G2R1 (n = 1) et IIbA16G1 (n = 4). *Ces deux derniers apparaissent pour la première fois en Algérie.*

Toutefois, deux isolats présentaient une quantité insuffisante ne permettant pas leur séquençage.

Le tableau 14 indique le résultat global de cette caractérisation chez les bovins étudiés. La caractérisation phénotypique des 65 prélèvements, dont 53 individus diarrhéiques et 12 étaient sains, a révélé la présence de *Cryptosporidium spp.* par la technique d'immunofluorescence (IF) dans 62% (40/83) des échantillons et dont 57% (23/40) ont généré des ARNr-PCR 18S positifs. La majorité des échantillons positifs provenaient de veaux présentant une diarrhée 91% (21/23) et le pourcentage le plus élevé était chez les animaux âgés de 3 semaines à 1 mois. Des individus asymptomatiques étaient présents dans cette étude (02/21) près de 9% étaient porteurs sains.

L'analyse PCR de la séquence RFLP a confirmé la présence de deux espèces de *Cryptosporidium* chez les veaux, incluant *C. parvum* dans 19/23 échantillons (82,6%) de toutes les régions étudiées Est et Centre de l'Algérie et *C. bovis* chez 4/23 (17,4%) au centre de l'Algérie (tableau 14).

Trois sous-types de *C. parvum* ont été identifiés par analyse du gène codant pour la glycoprotéine gp60 suivi d'un séquençage du gène amplifié (tableau 14) :

- Huit souches de *C. parvum* appartenaient au sous-type IIaA16G2R1 (n = 8),
- Trois souches de *C. parvum* appartenaient au sous-type IIaA15G2R1 (n = 1).
- Une souche était du sous-type IIdA16G1 (n = 4)



### III. 3.CARACTERISATION PHENOTYPIQUE ET GENOTYPIQUE DE *CRYPTOSPORIDIUM* CHEZ LES OVINS

#### III.3.1. Caractérisation phénotypique

##### III.3.1.1. Nombre d'élevages ovins positifs à l'analyse par (IF)

Nos résultats montrent que dans la majorité des élevages il y a au moins un prélèvement positif pour la recherche et dénombrement des oocystes du parasite. En effet, 12/14 élevages (85,71%) sont positifs pour la recherche de *Cryptosporidium. sp.*

Ceci indique clairement la présence du parasite dans les bergeries surtout de type extensif (Tableau 15). En effets, 66,66% (8/12) sont des élevages extensifs positifs contre 33,33% (4/12) sont intensifs positifs. L'absence du parasite dans les deux fermes (F3, F13) 2/14 représente un taux de 14,28% (Tableau 15).

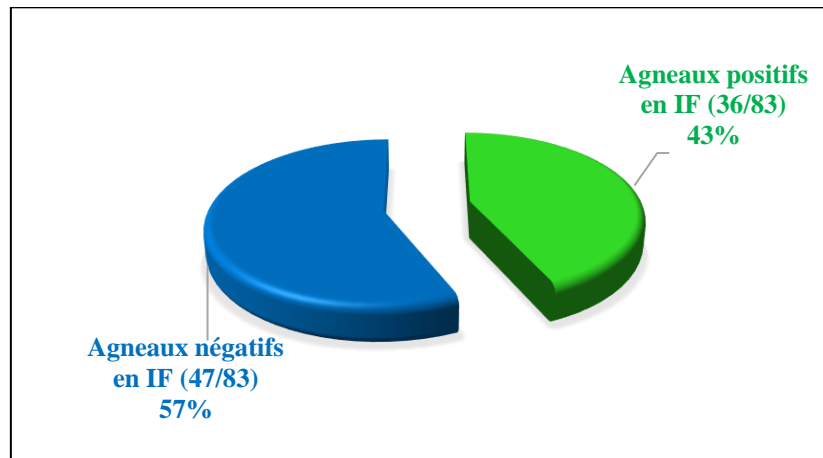
**Tableau 15 :** Elevages ovins positifs par analyse à l'immunofluorescence

Wilaya	Nombre d'élevages	Elevages Extensifs	Elevages intensifs	Elevages positifs IF		
				Total	Extensif	Intensif
N=4	N=14	N=9	N=5	N=12	N=9	N=5
<b>SIDI-BELABBES</b>	7	E3, E4, E5, E6, E7, E8	E2	6	E4, E5, E6, E7, E8	E2
		N=6	N=1		N=5	N=1
<b>DJELFA</b>	3	E9 N=1	E10, E11 N=2	3	E9 N=1	E10, E11 N=2
<b>M'SILA</b>	3	E12 N=1	E13, E14 N=2	2	E12 N=1	E14 N=1
<b>SOUK-AHRAS</b>	1	E1 N=1	0	1	E1 N=1	0
<b>Total (%)</b>	14 (100)	9 (64,28)	5 (35,71)	12 (85,7)	8 (66,66)	4 (33,33)

**E :** Elevage ; **N :** Nombre ; **IF :** analyse par immunofluorescence

**III.3.1.2. Nombre d'ovins positifs aux *Cryptosporidium* spp. analysés par immunofluorescence**

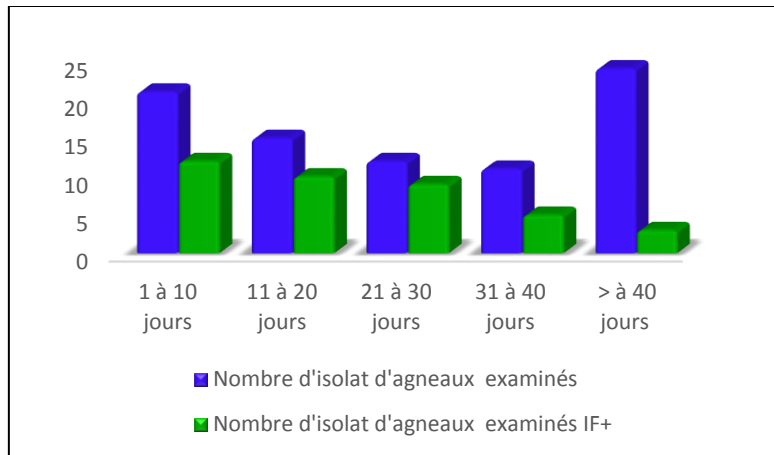
Suite à l'analyse par immunofluorescence (IF) l'examen microscopique a révélé la présence d'oocystes de *Cryptosporidium* sp. dans 43,37% des prélèvements chez les agneaux (36/83) (Figure 33).



**Figure 33 :** Prévalence de la cryptosporidiose chez les agneaux déterminée par immunofluorescence.

**a) Ovins positifs à l'analyse par immunofluorescence en fonction de l'âge**

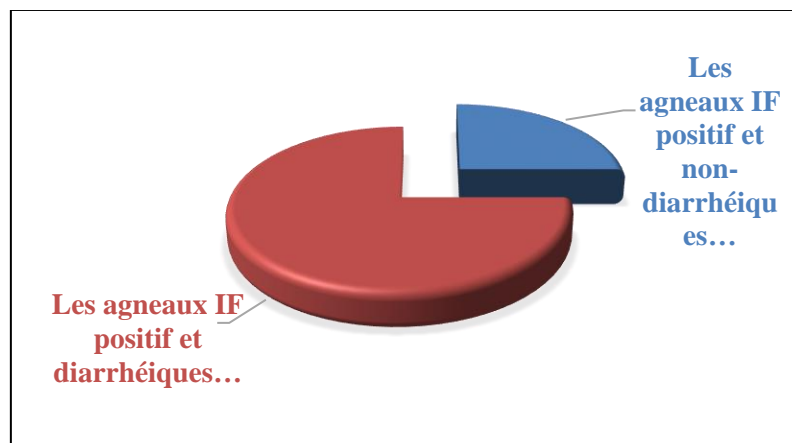
Comme chez les bovins, la présence du parasite était observée chez les animaux dans toutes les tranches d'âge. Néanmoins, le nombre d'animaux positifs variait en fonction de leur âge. *Cryptosporidium* a été détecté chez 12/21 (57,1%), 10/15 (66,66%), 9/12 (75%), 2/11 (18,18) et 3/24 (12,5%) respectivement chez des animaux examinés à l'âge de (1 à 10 jours), de (11 à 20 jours), de (21 à 30 jours), de (31 à 40 jours) et de (> 40 jours). Avec le test du Khi-deux, il apparaît une corrélation positive et très significative ( $p=0,002$ ), entre la présence du parasite et l'âge jeune des animaux. Ces résultats montrent que les animaux les plus infectés sont dans la tranche d'âges inférieure à 1 mois spécifiquement chez les animaux âgés entre 21 et 30 jours (Figure 34).



**Figure 34 :** Excrétion d'oocystes (nombre) examinée par immunofluorescence en fonction de l'âge (jours) des agneaux.

**b) Ovins positifs à l'analyse par immunofluorescence en fonction du statut clinique**

L'examen microscopique à l'immunofluorescence a montré que les agneaux infectés étaient diarrhéiques en grand nombre (27/36) soit 75%. Cependant, (9/36) étaient positifs asymptomatiques l'équivalent de 25%, l'application du khi-deux a révélé une nette corrélation positive et très significative ( $p= 0,0027$ ) entre le statut clinique et la présence du parasite chez les agneaux (Figure 35).



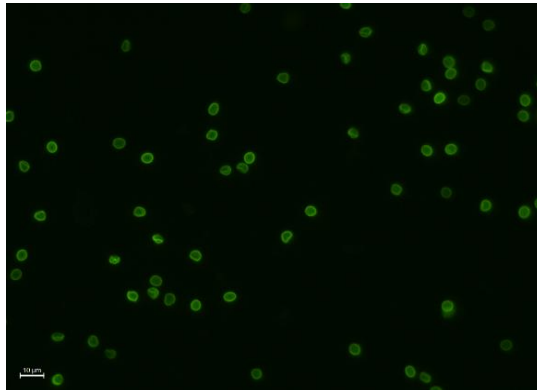
**Figure 35 :** Détection d'agneaux infectés (nombre) analysés par immunofluorescence en fonction du statut clinique

**III.3.1.3. Quantification et analyse du niveau d'excrétion des oocystes chez les agneaux**

L'examen au microscope des matières fécales des ovins a permis d'abord l'identification morphologique de *Cryptosporidium.spp* (Figure 36) et d'autre part, de donner une orientation



sur l'espèce parasitaire. En effet, les oocystes observés possédaient une taille de  $5\mu\text{m} \times 4,5\mu\text{m}$  avec une forme sphérique. Les mesures retrouvées se positionnent en majorité sur l'espèce de *C. parvum*.



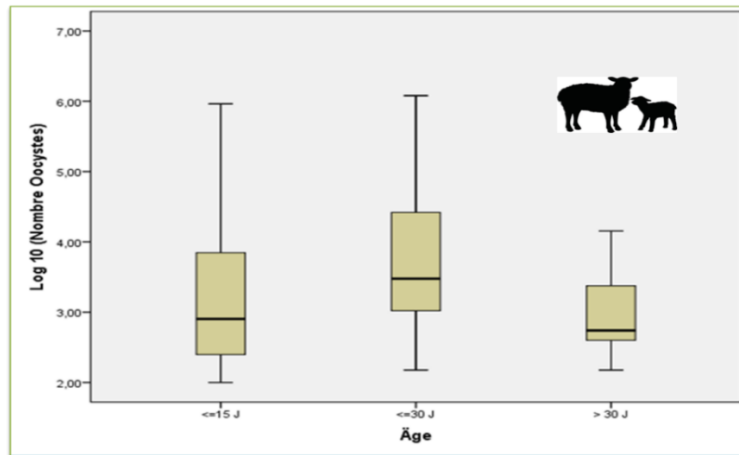
**Figure 36 :** *Cryptosporidium spp.* observées à l'immunofluorescence dans les matières fécales après concentration chez les ovins X40 (UMR BIPAR, 2017 photo personnelle)

Parmi les 83 échantillons ovins inclus dans cette étude, l'examen microscopique a révélé la présence d'oocystes de *Cryptosporidium* dans 36 (43,37%) prélèvements des matières fécales comme signalé précédemment. Les niveaux d'excrétion variaient de  $10^2$  à près de  $10^6$  opg. Quinze (15/36) avaient un niveau d'excrétion bas de ( $1,5 \cdot 10^2$  à  $6 \cdot 10^2$ ) et quatorze (14/36) excrétaient le parasite entre ( $1,02 \cdot 10^3$  et  $7 \cdot 10^3$ ) opg. Seulement 7 agneaux avaient un niveau d'excrétion moyennement élevé avec 5 agneaux ayant de ( $1,10 \cdot 10^4$  à  $6,30 \cdot 10^4$ ) et 2 agneaux avec ( $6 \cdot 10^5$  et  $9,75 \cdot 10^5$ ).

Pour compléter cette approche phénotypique, une analyse descriptive a été réalisée afin de mettre en relief quelques facteurs de risque de l'apparition et la contamination de l'environnement par ce parasite, par la mise en évidence de corrélations entre les niveaux d'excrétion des oocystes et les paramètres favorisant l'infection chez l'animal.

#### **a) Excrétion des oocystes chez le bovin en fonction de l'âge**

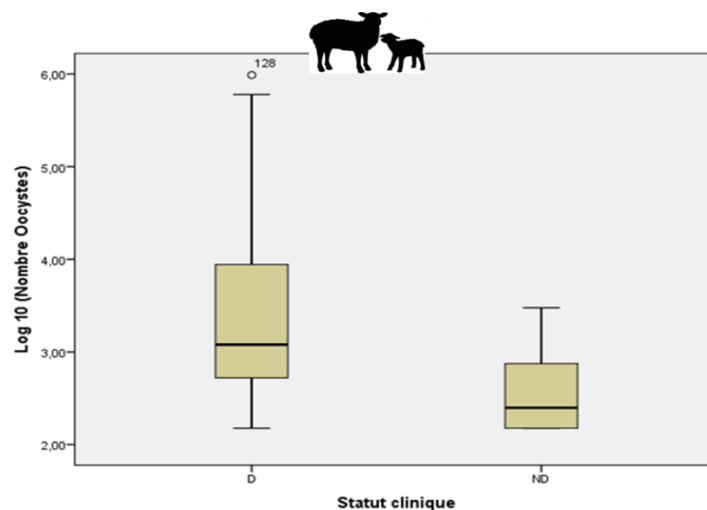
La présence des cryptosporidies est relevée dans toutes les tranches d'âge des animaux étudiés. Cependant, le niveau le plus élevé d'excrétion était marqué chez les agneaux les plus jeunes, âgés d'un mois. L'analyse statistique montre une corrélation positive et significative ( $p = 0,026$ ) entre le niveau d'excrétion (nombre d'oocystes) chez les agneaux et de leur jeune âge (15 jours, 30 jours et  $> 30$  jours). En outre, le niveau le plus élevé d'excrétion des oocystes est aux alentours d'un mois (moyenne = 3,85). Cependant, après cet âge une baisse de l'excrétion chez l'animal est constatée (moyenne = 2,62) (Figure 37).



**Figure 37 :** Niveau d'excrétion (nombre d'oocystes) chez les ovins en fonction de l'âge.

***b) Excrétion des oocystes chez le veau en fonction du statut clinique***

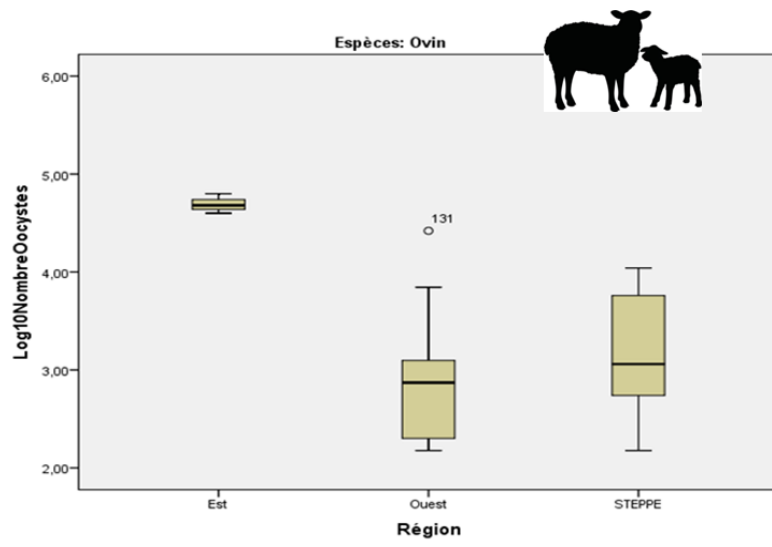
Le taux d'excrétion était en relation étroite avec le statut clinique des animaux. Nos résultats montrent une corrélation positive et significative ( $p < 0,034$ ) entre le nombre d'oocystes excrété par les animaux et leur statut clinique. Les agneaux cliniquement malades ont montré des matières fécales avec un nombre élevé d'oocystes par rapport aux animaux asymptomatiques (Figure 38).



**Figure 38 :** Excrétion des oocystes (nombre) chez les ovins en fonction du statut clinique

***c) Excrétion des oocystes chez l'agneau en fonction des régions de récolte***

Nos résultats ont montré une relation quant au niveau d'excrétion des oocystes chez l'animal et la localisation géographique des élevages. En effet, la différence entre région était significative où  $p= 0,019$  avec les moyennes de  $4,69 \pm 0,057$  ;  $3,50 \pm 0,38$  et ;  $2,86 \pm 0,13$  dans les régions Est, Steppe et Ouest respectivement. Les animaux excrètent un nombre élevé d'oocystes dans la région Est suivi de la région Steppique puis la région Ouest (Figure 39).



**Figure 39 :** Excrétion des oocystes chez les ovins en fonction de la région

**III.3.2. RESULTATS DE LA CARACTERISATION MOLECULAIRE CHEZ LES OVINS**

**III.3.2.1. Elevages positifs caractérisés par PCR nichée d'ARNr18S**

L'amplification par PCR nichée d'ARNr18S a permis au niveau des élevages d'identifier 10 sur 12 élevages qui avaient au moins un échantillon positif par PCR nichée (Tableau 16), suggérant un taux de 83,33% au niveau d'élevage.

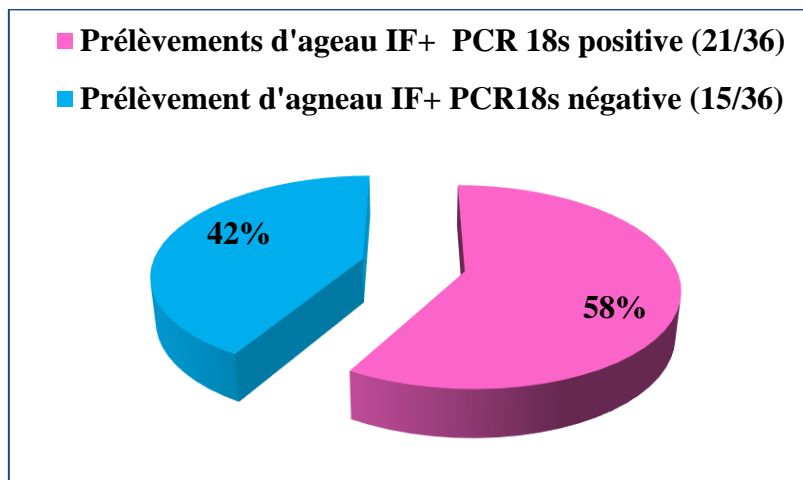
**Tableau 16 :** Elevages ovins caractérisés par PCR nichée ARNr 18S

Wilayas	Elevages	Elevages extensifs	Elevages intensifs	Total	Elevages extensifs	Elevages intensifs
N=4	N=14	N=9	N=5		N=9	N=5
PCR nichée ARNr18S						
<b>SIDI-BELABBES</b>	7	E3, E4, E5, E6, E7, E8 N=6	E2 N=1	5	E4, E5, E6, E7, E8 N=5	0
<b>DJELFA</b>	3	E9 N_1	E10, E11 N_2	2	E9 N=1	E10 N=1
<b>M'SILA</b>	3	E12 N=1	E13, E14 N=2	2	E12 N=1	E14 N=1
<b>SOUK-AHRAS</b>	1	E1 N=1	0	1	E1 N=1	0
<b>Total (%)</b>	14 (100)	9 (64,28)	5 (35,71)	10 (83,33)	8 (66,66)	2 (16,66)

E : Elevage ; N : Nombre

### III.3.2.2.Caractérisation des isolats par PCR nichée ARNr18S

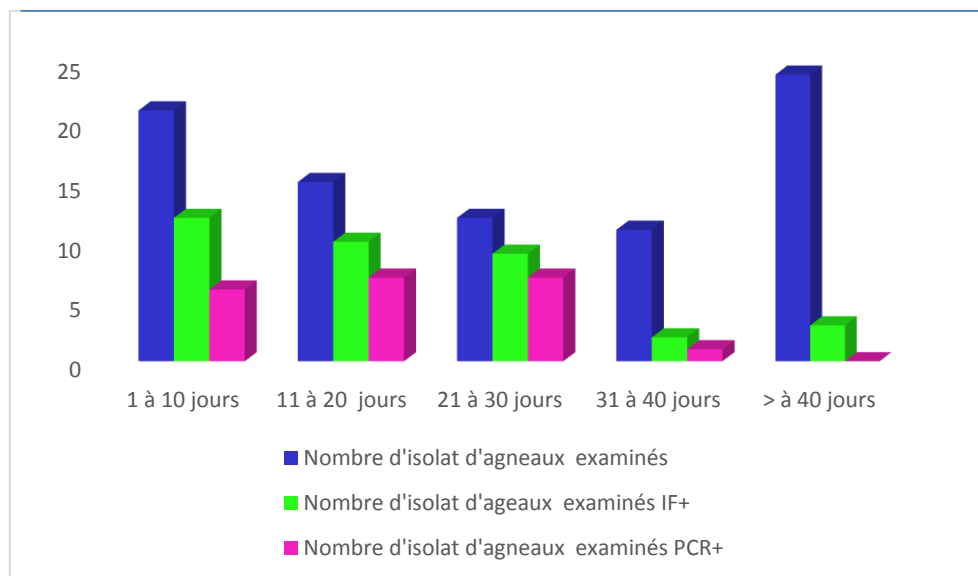
L'analyse moléculaire des prélèvements identifiés par IF a montré les résultats suivants : Au niveau animal un taux de 58% (21/36) s'est révélé positif par PCR-ARNr18S, contre un taux de 42% (15/36) qui s'est révélé négatif (Figure 40).



**Figure 40 :** Prévalence de *Cryptosporidium spp.* chez les isolats ovins détectées par PCR nichée ARNr 18S.

**a) Nombre d'animaux positifs en fonction de l'âge**

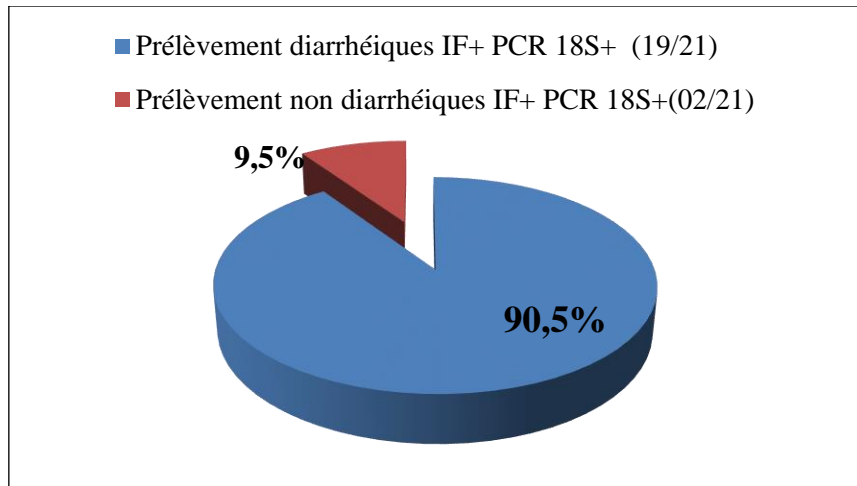
La présence du parasite était observée chez les animaux dont l'âge est inférieur à 40 jours. Cependant, les taux d'identification de *Cryptosporidium spp.* les plus élevés étaient présents chez les ovins ayant moins d'un mois. Dont 70% âgés entre 11 et 20 jours et 78% entre 21 et 30 jours. L'analyse statistique (test de Fisher) révèle encore un effet positif et hautement significatif ( $p=0,006$ ) entre le jeune âge des animaux et la présence du parasite surtout entre 3 et 4 semaines (Figure 41).



**Figure 41 :** Répartition des isolats de agneaux positifs à *Cryptosporidium spp* en fonction de leur l'âge.

**b) Nombre d'animaux positifs en fonction du statut clinique**

Les résultats montrent que la plupart des échantillons positifs pour *Cryptosporidium* provenaient d'animaux diarrhéiques. Parmi les 21 animaux positifs en PCR nichée, 19 présentaient un syndrome diarrhéique ce qui représente 90,5% et seulement 2 individus étaient porteurs sains ou asymptomatiques soit 9,5%. Il apparait de ce résultat une relation positive et hautement significative ( $p<0,0002$ ) entre la présence du parasite et le statut clinique des agneaux (Figure 42).



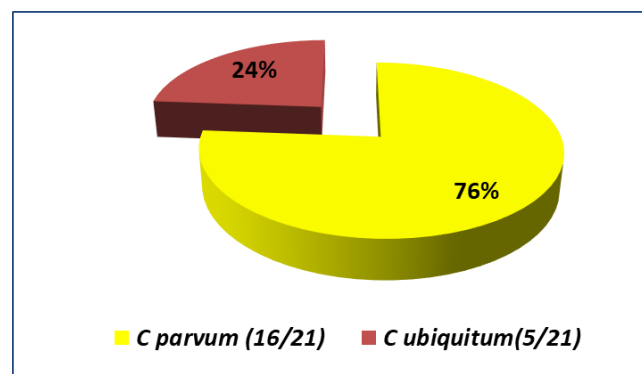
**Figure 42 :** Répartition des isolats d'agneaux positifs à *Cryptosporidium spp* en fonction du statut clinique.

### III.3.2.3. Identification des espèces de *Cryptosporidium spp.* par PCR RFLP

L'analyse des séquences (obtenues lors de la première PCR nichée) par PCR-RFLP a identifié deux espèces : *Cryptosporidium parvum* (n=16) avec un taux dominant de 76% et *Cryptosporidium ubiquitum* (n=5) avec un taux de 24% (Figure 43).

#### a) Répartition des espèces de *Cryptosporidium spp.* chez l'ovin en fonction de l'âge

Selon les résultats obtenus par PCR-RFLP, l'infection par *C. parvum* était observée surtout chez les agneaux ayant moins d'un mois, dont le taux le plus élevé est présent chez les animaux de 3 semaines. Cependant, *C. ubiquitum* infectait les animaux âgés entre 2 et 4 semaines (Tableau 17).



**Figure 43 :** Répartition des espèces *Cryptosporidium spp* chez les ovins étudiés.

**Tableau 17 :**Nombre d'agneaux infectés par *C. parvum* et *C. ubiquitum* en fonction de l'âge

Age Semaine	Espèces	
	<i>C. parvum</i>	<i>C. ubiquitum</i>
1 <sup>ère</sup>	3	0
2 <sup>ème</sup>	3	2 dont 1*
3 <sup>ème</sup>	8	1
4 <sup>ème</sup>	1*	1
5 <sup>ème</sup>	1	0
	16	5
Total	21	
(*) : Non-diarrhéique		

**b) Répartition des espèces de *Cryptosporidium spp.* chez les ovins en fonction du statut clinique**

L'infection par *C. parvum* était présente chez les veaux cliniquement malades, néanmoins, un agneau asymptomatique était infecté par cette espèce. Aussi, *C.ubiquitum* était présente chez les animaux diarrhéiques et les non-diarrhéiques (Tableau 17).

**III.3.5. Recherche et séquençage du gène de la gp60 dans les isolats de *C. parvum***

La recherche, du gène de la glycoprotéine 60 de l'espèce *C. parvum*, effectuée sur les 16 isolats ovins positifs montrent la présence de ce gène dans l'ensemble des isolats soit un taux de 100%.

Le séquençage du gène de la gp60 de l'espèce *C. parvum*, dans les 15 isolats, a montré l'existence de deux familles de sous-types IIa et II d : IIaA13G2R1 (n = 1), IIaA21G2R1 (n = 3), et II dA16G1 (n = 11). ***Ces deux derniers apparaissent pour la première fois en Algérie.*** Toutefois, un isolat n'a pas pu être séquençé.

(Voir Tableau 18).

Chez les ovins la caractérisation phénotypique des 83 prélèvements, dont 43 individus diarrhéiques et 40 étaient sains, a révélé la présence de *Cryptosporidium spp.* par la technique d'immunofluorescence (IF) dans 43,3% (36/83) des échantillons et dont 58% (21/36) ont généré des ARNr-PCR ribosomiques positifs. La majorité des échantillons positifs provenaient d'agneaux présentant une diarrhée (19/21) et âgés moins d'un mois. Des individus asymptomatiques étaient présents dans cette étude (02/21).

L'analyse PCR de la séquence RFLP a confirmé la présence de 2 espèces de *Cryptosporidium* chez les agneaux, incluant *C. parvum* dans 16/21 échantillons (76%) de toutes les régions étudiées du nord de l'Algérie et *C. ubiquitum* chez 5/21 (24%) du Nord-Ouest de l'Algérie. Sidi Bel Abbès uniquement (voir Tableau 18).

Trois sous-types de *C. parvum* ont été identifiés par analyse du gène codant pour la glycoprotéine gp60 suivi d'un séquençage du gène amplifié :

Onze souches de *C. parvum* appartenaient au sous-type IIIdA16G1 (n = 11),

Trois souches de *C. parvum* appartenaient au sous-type IIaA21G2R1 (n = 3).

Une souche était de sous-type IIaA13G2R1 (n = 1)

Une souche n'a pas pu être séquencée.





## **IV. DISCUSSION**

### **IV.1. La caractérisation phénotypique et génotypique de *Cryptosporidium* spp. chez les bovins**

Les infections à *Cryptosporidium* chez les bovins ont été signalées dans de nombreux pays du monde (Santín et Trout, 2008 ; Robertson *et al.*, 2014). En Afrique, la cryptosporidiose est courante chez diverses espèces animales domestiques et sauvages. En effet, *Cryptosporidium* a été signalé chez plusieurs espèces animales domestiques, notamment les bovins, les ovins, les caprins, les chevaux, la volaille... Cependant, la majorité des recherches ont été menées chez les bovins. Des prévalences allant de moins de 1% à supérieure à 86% ont été signalées chez les veaux quant à la présence de *Cryptosporidium* (Squire et Ryan, 2017). En outre, dans le continent africain de nombreuses études chez l'humain ont mis en évidence un potentiel zoonotique (Essid *et al.*, 2008 ; Molloy *et al.*, 2010 ; Inim-Bidoo *et al.*, Adamu *et al.*, 2014 ; 2015 ; Eibach *et al.*, 2015 ; Ojuomi *et al.*, 2016 ; Naghib *et al.*, 2018). Néanmoins, les études moléculaires sur la cryptosporidiose humaine et animale dans les pays « Nord-africains » sont encore rares.

Dans la présente étude, la fréquence globale de 62% de *Cryptosporidium* chez les veaux est plus élevée par rapport à des études antérieures dans le Centre et l'Est du pays qui avaient indiqué des taux de prévalence faibles de 13,7%, 17%, 22,6%, 22%, 36,4%, 36,7%, 50,8% et 52,2% (Baroudi *et al.*, 2017; Khelef *et al.*, 2007 ; Akam *et al.*, 2009 ; Ouchene *et al.*, 2012 ; Benhouda *et al.*, 2017 ; Laatamnaa *et al.*, 2018 ; Ouchene *et al.*, 2014 ; Ouakli *et al.*, 2018). En général, chez les bovins, la prévalence dépasse souvent 50-60% et parfois elle avoisine les 100% (Santín *et al.*, 2008). Effectivement, 92 à 100% des infections par *Cryptosporidium* chez les veaux ont été signalées à l'aide de DFA (*direct fluorescenc antigen*) (Rieux *et al.*, 2014 ; Mammeri *et al.*, 2019). Une présence mondiale de *Cryptosporidium* allant de 3,4 à 96,6% a déjà été rapportée chez des veaux précédemment examinés (Thomson *et al.*, 2017). Cette variation extraordinairement large de la fréquence des infections à *Cryptosporidium* et de ses similitudes peut varier selon les pays. Elle peut aussi concerner la répartition géographique (localisation des exploitations à l'étude), les conditions climatiques et les différentes pratiques de gestion des exploitations agricoles, saison de collecte des échantillons, méthode de diagnostic utilisée, etc.). Certains de ces facteurs peuvent également influencer sur la transmission de *Cryptosporidium* entre animaux (Mohammed *et al.*,

1999 ;Causapé *et al.*, 2002 ; Bamaïyi et Redhuan, 2016; Maurya *et al.*, 2013 ; Ranjbar et Fattahi, 2017).

En outre, le parasite était présent dans tous les élevages bovins visités (100%), nos résultats sont similaires à ceux décrits par Ouakli *et al.*, en 2018 avec un taux de 100% dans 10 élevages bovins dans les régions Centre et Est du pays. Alors que d'autres auteurs signalent des taux allant de 6% à 100% de fermes positives dans l'Est de l'Algérie (Ouchene *et al.*, 2016). Dans d'autres pays du monde ce taux d'infection des troupeaux peut être aussi élevé comme par exemple en France, Razakandrainibe *et al.*, en 2018 ont trouvé 66% d'élevages positifs dans 5 régions étudiées.

Par ailleurs, les niveaux d'excrétion variaient de  $10^2$  à  $10^6$  opg. Et plus de  $\frac{1}{4}$  des échantillons ont montré un nombre de  $10^4$  à  $10^6$  (11/40) d'oocystes dans un gramme de matières fécales. En revanche, pratiquement les  $\frac{3}{4}$  des animaux infectés excrétaient à très faibles niveaux le parasite (excrétions moyennes entre  $10^2$  et  $10^3$  opg). Parmi les rares études des niveaux d'excrétion de *Cryptosporidium* chez les bovins en Algérie, il a été indiqué des taux allant de  $10^2$  à  $10^4$  dans l'Est du pays (Ouchène *et al.*, 2016). Ces données sont également en accord avec ce qui est décrit dans la littérature chez les ruminants après sevrage (niveaux variant de 100 à 1000 opg) (Fayer *et al.*, 2006, 2007 ; Kvá *et al.*, 2006 ; Castro-Hermida *et al.*, 2007 ; Santín *et al.*, 2008). Ces faibles niveaux d'excrétion peuvent constituer une limite dans la détection du parasite. En outre, la limite de détection théorique de la technique d'IFA est estimée à 100 opg ceci peut expliquer que des animaux excrétaient le parasite à des niveaux équivalents ou inférieurs à 100 ou 10 opg ne soient pas détectés positifs (Fayer *et al.*, 2000).

De plus, il est possible que des oocystes aient été perdus suite à la réalisation de la technique de concentration (Weber *et al.*, 1991 ; Fayer *et al.*, 2000 b). Récemment, dans une étude comparative sur de jeunes veaux où la méthode *Direct Fluorescence Antigen* (DFA) a été utilisée avec et sans concentration des oocystes, une perte d'oocystes est observée dans 65,5% des échantillons (Mammeri *et al.*, 2019). En effet, les oocystes, après les étapes de broyage et filtration, peuvent être retenus sur la gaze ou bien ne pas être répartis dans la zone du gradient récupérée pour l'expérience. Cette perte impossible à évaluer, a des conséquences importantes lorsque des matières fécales provenant d'animaux sevrés, généralement très peu chargées en oocystes, sont utilisées. Dans notre travail, il existe un facteur supplémentaire qui peut être en relation avec cette perte c'est la période de conservation avant l'examen de certains échantillons qui a dépassé 6 mois.

Malgré l'identification microscopique positive des oocystes dans les échantillons, les gènes cibles analysés par la PCR nichée ARNr 18S et de la PCR gp60 n'étaient positifs que dans 58% et 79% des échantillons, respectivement. Bien que la méthode de PCR nichée ait été décrite comme très sensible et spécifique (Bhat *et al.*, 2014). Ceci a été déjà signalé auparavant dans des études d'identification moléculaire de *Cryptosporidium spp.* chez différentes espèces animales (Laatamna *et al.*, 2013 ; Mammeri *et al.*, 2019 ; Adam *et al.*, 2019). Ces résultats de PCR faussement négatifs pourraient s'expliquer par de nombreux facteurs : faibles nombres des oocystes dans certains échantillons, présence d'inhibiteurs de la PCR dans les échantillons fécaux (hémoglobine, bilirubine et acides biliaries), échec des procédures d'extraction, échec de la lyse des oocystes, insuffisance d'ADN collecté, dégradation de l'acide nucléique (Johnson *et al.*, 1995 ; Lantz *et al.*, 1997 ; McLauchlin *et al.*, 1999 ; Yu *et al.*, 2009). Jusqu'à présent, 4 espèces communes de *Cryptosporidium* ont été identifiées chez les bovins : *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* et *C. andersoni*, mais seul *C. parvum* est associé à une maladie clinique chez les veaux nouveau-nés, les animaux plus âgés (> 6 semaines) présentent des excréments asymptomatiques d'oocystes (Silverlås *et al.*, 2013). L'observation récente de *C. hominis* chez des veaux symptomatiques et asymptomatiques en Europe (France) (Razakandrainibe *et al.*, 2018) et en Afrique (Ouganda) (Gift Witto *et al.*, 2019) souligne l'importance d'identifier les espèces de *Cryptosporidium* transmis par les veaux.

Les veaux examinés dans cette partie d'étude avaient tous moins de 90 jours. Deux espèces de *Cryptosporidium* ont été détectées chez ces animaux, incluant *C. parvum* et *C. bovis*. Cependant, en Algérie, en Afrique ainsi que dans d'autres continents les quatre espèces sont le plus souvent détectées (Benhouda *et al.*, 2017 ; Baroudi *et al.*, 2017 ; Ouakli *et al.*, 2018 ; Zhong *et al.*, 2018 ; Feng *et al.*, 2019). Toutefois, ce taux d'infection de 76% des animaux par *C. parvum* via PCR-RFLP à base de gène 18SrRNA était similaire à des études antérieures en Algérie (Ouakli *et al.*, 2018), ainsi que dans d'autres régions du monde démontrant une forte présence de *C. parvum* chez des veaux pré-sevrés (Mammeri *et al.*, 2019 ; Kvác *et al.*, 2006 ; Santín *et al.*, 2004). La présence de *C. bovis* a été révélée dans cette étude avec un faible taux (24%). En revanche, cette espèce a été identifiée par plusieurs scientifiques en Algérie (Ouchene *et al.*, 2016 ; Baroudi *et al.*, 2017 ; Benhouda *et al.*, 2017 ; Ouakli *et al.*, 2018).

Contrairement à des rapports antérieurs en Algérie et dans d'autres pays (Feng *et al.*, 2019 ; Baroudi *et al.*, 2017 ; Björkman *et al.*, 2015), aucune infection mixte n'a été détectée dans la présente étude, ce qui pourrait être attribué à la présence significative de *C. parvum* par

opposition à d'autres espèces de *Cryptosporidium* pouvant représenter des sous-populations plus petites. La PCR multiplex spécifique ou la PCR en temps réel pourrait être utilisée pour détecter toute infection de bas niveau (Tanriverdi *et al.*, 2003 ; travaillé *et al.*, 2016). Les lignes directrices actuelles suggèrent que la caractérisation génétique des isolats de *Cryptosporidium* devrait être basée sur deux locus génétiques et inclure au moins un gène de 18SrRNA conservé. Ainsi, dans notre étude, les gènes 18SrRNA et gp60 ont été ciblés (Cacciò *et al.*, 2005).

L'analyse du gène de la séquence gp60 a montré l'existence de deux familles des sous-types de *C. parvum* : Ila (9) et IId (4). La première famille Ila inclue : le sous-type IlaA15G2R1(1) et IlaA16G2R1(8). La deuxième famille IId inclue : IIdA16G1 (4). L'identification de ces deux familles a été indiquée dans de multiples travaux dans le monde et en Afrique (Squire et Ryan, 2017). Ces résultats concordent avec ceux d'autres études démontrant que *C. parvum* Ila est une famille de sous-types commune chez l'homme et le veau. Ainsi, cette famille de sous-types est considérée comme potentiellement zoonotique et transmissible par le bétail (Xiao, 2010). Le sous-type IlaA15G2R1 a déjà été signalé comme étant le plus répandu chez les veaux et les humains dans de nombreux pays (Alves *et al.*, 2006 ; SobaandLogar, 2008; Walinga *et al.*, 2008; Molloy *et al.*, 2010 ; Xiao, 2010 ; Díaz *et al.*, 2013; Walinga *et al.*, 2014; Aita *et al.*, 2015; Mawly *et al.*, 2015; Danišová *et al.*, 2016;), y compris en France (Follet *et al.*, 2011; Rieux *et al.*, 2013a, 2013c, 2014 ; Mammeri *et al.*, 2019), soulignant ainsi le potentiel zoonotique des veaux comme réservoirs. En revanche, il n'a jamais été identifié en Algérie. Il semble que le sous-type IlaA15G2R1 *C. parvum* soit hyper-transmissible, ce qui peut expliquer sa prédominance (Feng *et al.*, 2018).

Le génotypage a permis aussi d'identifier les sous-types (IIdA16G1 et IlaA16G2R1). Contrairement aux résultats obtenus en Chine (Cai *et al.*, 2017 ; Feng et Xiao, 2017), la présence du groupe familial zoonotique IId chez les veaux est rare et semble se propager depuis l'Asie occidentale vers d'autres régions du monde, dont la France (Wang *et al.*, 2014). Ces deux familles ont été décrites dans des pays d'Afrique du Nord. En effet, en Égypte les veaux sont principalement infectés par les sous-types de *C. parvum* des familles Ila et IId (Amer *et al.*, 2010), que l'on retrouve également chez l'homme dans ce pays (Ibrahim *et al.*, 2016 ; Naguib *et al.*, 2018). En Tunisie, les sous-types de *C. parvum* IlaA15G2R1 et IIdA16G1 ont été identifiés chez des veaux et des enfants d'une zone rurale du nord du pays (Rahmouni *et al.*, 2014). Par conséquent, les espèces zoonotiques et anthroponotiques sont impliquées dans la cryptosporidiose humaine dans ces régions. Ces informations viennent

compléter les données précédentes sur l'identité génétique des espèces de *Cryptosporidium* chez les jeunes veaux (< 3 mois) élevés en Algérie. Nos données montrent que les veaux âgés de 1 à 3 mois sont principalement infectés par *Cryptosporidium parvum*, alors que peu d'animaux ont été infectés par *C. bovis*. Ceci est en accord avec le schéma dominant de *C. parvum* chez les jeunes veaux (Robertson *et al.*, 2014), mais ne concorde pas avec les données de systèmes de gestion moins intensifs dans différentes parties du monde (Budu-Amako *et al.*, 2012 ; Silverlås *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2011) où *C. bovis* est l'espèce dominante. Toutefois, sur les trois élevages intensifs étudiés dans notre travail, l'espèce *C. bovis* était présente dans un seul uniquement. La présente étude est la première à identifier le sous-type IId chez les veaux Algériens. Il semble que cette famille de sous-types ne se limite pas à quelques fermes, mais pourrait être facilement transmise à d'autres animaux (principalement des jeunes ruminants) ou à des humains (Wangetal., 2014; Xiao, 2010). Ce fait peut expliquer le taux de 100% de contamination de nos élevages étudiés. Dans notre travail, des infections mixtes de sous-types de *C. parvum* n'ont pas été rapportées avec ce nombre d'échantillons peu élevé. En fait, il est possible qu'une gamme de sous-types de *C. parvum* circulait dans la même ferme, mais n'est pas détectée lorsqu'un seul échantillonnage a été effectué chez chaque animal (Mawly *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2007). Des études similaires sur une plus grande échelle géographique, avec un plus grand nombre d'échantillons sont nécessaires pour améliorer notre compréhension de la dynamique de transmission de la cryptosporidiose chez les veaux en Algérie.

**Ce travail nous a permis de constater que les veaux laitiers, diarrhéiques et non diarrhéiques, de moins de trois mois d'âge pouvaient excréter l'espèce *C. parvum* mais également d'autres espèces de *Cryptosporidium spp.* Comme décrit dans la littérature, *C. parvum* est l'agent étiologique majeur des diarrhées néonatales chez les ruminants.**

**Le séquençage du géotype *C. parvum* a présenté un résultat original avec l'identification de trois sous-types de *C. parvum* : IIaA16G2R1, IIaA15G2R1, IIdA16G1, où la famille IId est décrite pour la première fois ainsi que le sous-type IIaA15G2R1 en Algérie.**

#### **IV.2. La caractérisation phénotypique et génotypique de *Cryptosporidium* spp. chez les ovins**

Actuellement, la Cryptosporidiose ovine est décrite dans le monde entier. En effet, dans les pays industrialisés plusieurs travaux de recherches indiquent des taux d'infection à *Cryptosporidium* allant de 5,1 à 82,0% (Quílez *et al.*, 2008 ; Diaz *et al.*, 2010 et 2015 ; Kaupke *et al.*, 2017 ; Causapé 2002 ; Yang *et al.*, 2014). Peu de données comparables sont disponibles auprès de pays en développement, néanmoins, plusieurs pays en Asie et en Amérique du Sud ont signalé une cryptosporidiose ovine respectivement en Chine, au Bangladesh, en Iran, en Argentine et au Mexique avec des taux variables (Peng *et al.*, 2016 ; Romero *et al.*, 2016 ; Mi *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2016). En Afrique, la cryptosporidiose ovine est présente en Égypte, en Tanzanie, en Tunisie et en Zambie, avec une prévalence de 2,5%, 22,2%, 11,2% et 12,5% (Mahfouz *et al.*, 2014 ; Parsons *et al.*, 2015 ; Soltane *et al.*, 2007 ; Goma *et al.*, 2007). En Algérie peu de données sont connues sur la cryptosporidiose ovine. Cependant, Dahmani *et al.* (2017), Laatamna *et al.* (2018) et Baroudi *et al.* (2018) ont rapporté respectivement les premières données sur la cryptosporidiose ovine dans la région steppique (Aïn Oussera), les hauts plateaux et dans la région nord du pays avec des prévalences respectives de 14,6%, 7%, 22% et 14,5%. Notre étude a révélé une plus grande fréquence de *Cryptosporidium* spp. chez les agneaux 43,37% (36/83). Aussi, au niveau élevage les taux de 85% et 83% étaient positifs pour la recherche de *Cryptosporidium* spp. par immunofluorescence et PCR-ARNr 18S respectivement. Nos résultats sont proches de ceux rapportés par Laatamna *et al.*, (2018) où un taux de 80% de fermes positives pour Cryptosporidies a été retrouvé en région steppique et Hauts plateaux. Par contre, Baroudi *et al.*, (2018) mentionnent dans leurs travaux des taux n'excédant pas 44,4% au nord de l'Algérie. Les variations des taux d'infection entre les études pourraient être attribuées à plusieurs facteurs : différences d'âge, de méthodes de diagnostic, de tailles d'échantillons, de gestion des animaux, de régions d'étude. En effet, nos résultats ont montré chez les agneaux des degrés d'infections (niveau d'excrétion d'oocystes) différents en fonction de leur âge, le statut clinique et les régions d'études. Une corrélation très significative a été révélée entre la région étudiée et le niveau d'excrétion ( $p = 0,019$ ). Dans la région Est les animaux excrètent le parasite avec un niveau élevé suivi de la région Steppique puis la région Ouest. On peut considérer la région Est comme présentant un foyer de Cryptosporidiose.

A l'examen microscopique lors de notre étude, 27 échantillons parmi les 36 positifs étaient prélevés chez des animaux diarrhéiques (27/36). Cela pourrait être dû au fait que



*Cryptosporidium* est un agent de la diarrhée néonatale. Par contre, dans une étude récente en Algérie l'excrétion de *Cryptosporidium spp.* chez les moutons n'était pas liée à un syndrome diarrhéique (Laatamna *et al.*, 2018). En revanche, il a été déclaré par d'autres chercheurs dans d'autre continents que ce protozoaire (*C. parvum*) faisait partie des agents pathogènes les plus importants associés aux maladies diarrhéiques et à la mortalité chez les agneaux nouveau-nés (Causapé *et al.*, 2002 ; De Graaf *et al.*, 1999 ; Quílez *et al.*, 2008 ; Imre *et al.*, 2013). Ahamed *et al.*, (2013) ont rapporté que la prévalence chez les agneaux diarrhéiques était significativement plus élevée (54,4%) que chez les agneaux non diarrhéiques (34,6%), les résultats de notre travail étaient similaires avec 75% des animaux positifs diarrhéiques et 25% de animaux positifs non-diarrhéiques. En outre, nos résultats étaient comparables à d'autres travaux sur le terrain algérien avec des taux d'infection chez les agneaux diarrhéiques atteignant 61,5% (8/13), contre 2,0% (1/49) chez les non-diarrhéiques (Baroudi *et al.*, 2018). Cependant, il faut noter que la diarrhée néonatale n'est pas nécessairement due à la présence de *Cryptosporidium*, car il existe d'autres agents pathogènes responsables de la diarrhée (salmonelles, virus, coccidies...).

Dans le même contexte, notre étude indique une grande relation entre le syndrome diarrhéique et le niveau d'excrétion du parasite. Cette observation détectée par immunofluorescence chez les individus présentait une différence hautement significative ( $p < 0,034$ ). Nous avons signalé une forte corrélation entre le niveau de consistance fécale et l'intensité de l'infection. Ce résultat est similaire aux études précédentes qui ont rapporté une forte corrélation entre l'excrétion d'oocystes de *Cryptosporidium* et la présence de diarrhée (Xiao *et al.*, 2004 ; Castro-Hermida *et al.*, 2005).

En outre, une différence significative apparaît dans notre étude quant à l'âge des agneaux et le dénombrement des oocystes, où le niveau d'excrétion du parasite est élevé chez les jeunes agneaux âgés de moins d'un mois avec  $p < 0,026$ . Nos résultats sont comparables à plusieurs travaux sur le terrain algérien ou autres (Baroudi *et al.*, 2018 ; Imre *et al.*, 2013).

Par ailleurs, l'analyse moléculaire a révélé une diversité d'espèces de *Cryptosporidium* chez ces animaux d'élevage. Des PCR faussement négatives se sont produites, indiquant que la sensibilité de la PCR était potentiellement réduite, ce qui pourrait être dû aux inhibiteurs de la PCR naturellement présents dans les échantillons des matières fécales (Yu *et al.*, 2009). En outre, certaines études ont révélé que des méthodes microscopiques telle que l'immunofluorescence sont plus sensibles que les méthodes moléculaires dans les échantillons contenant un faible nombre d'oocystes (Castro-Hermida *et al.*, 2007 ; Díaz *et al.*, 2013). Les



espèces *Cryptosporidium* sont des agents pathogènes bien connus des animaux de ferme et des animaux domestiques et constituent donc une menace importante pour la santé publique. Cependant, les espèces de *Cryptosporidium* chez les petits ruminants sont mal connues en Algérie. Dans cette partie de caractérisation moléculaire de *Cryptosporidium spp.* chez les agneaux algériens, nous avons identifié deux espèces de *Cryptosporidium* (*C. parvum* et *C. ubiquitum*) qui ont déjà été signalées chez les petits ruminants en Algérie (Baroudi et al., 2018) et d'autres pays (Paraud et Chartier, 2012). Dans ce travail, *C. parvum* était l'espèce dominante 16/21, le rôle de *C. parvum* dans l'étiologie des épidémies diarrhéiques après l'agnelage est bien établi et de nombreuses études ont conclu qu'il s'agissait d'une espèce majeure, voire unique, de *Cryptosporidium* identifiée chez les agneaux et les chevreux diarrhéiques. *C. ubiquitum* avec 5/21 était minoritaire, ce qui est comparable aux données précédentes sur les petits ruminants (McLauchlin et al., 2000; Goma et al., 2007; Geurden et al., 2008; Mueller-Doblies et al., 2008; Pritchard et al., 2007; Quílez et al., 2008; Drumo et al., 2012 ; Maurya et al., 2013 ; Imre et al., 2013 ; Tzanidakis et al., 2014). Dans cette étude, l'espèce *C. xiaoi* n'était pas identifiée chez les agneaux bien qu'elle ait récemment été signalée comme étant présente chez les petits ruminants en Algérie (Baroudi et al., 2018) et dans d'autres localisations (pays africains, pays asiatiques et certains pays européens comme en Norvège et en Pologne) (Kaupke et al., 2017 ; Parsons et al., 2015 ; Peng et al., 2016 ; Robertson, 2009). Dans cette étude, le sous-type dominant de l'isolat de *C. parvum* présent chez les agneaux était IIdA16G1 (n = 11/16), tandis que les sous-types IIaA21G2R1 (n = 3/16) et IIaA13G2R1 (n = 1/16) étaient signalés à des taux inférieurs. Nos résultats sont cohérents avec de nombreuses autres études où la famille des sous-types de *C. parvum* IId est dominante dans des pays tels que l'Espagne, la Roumanie et l'Australie (Díaz et al., 2015 ; Imre et al., 2013 ; Quílez et al., 2008 ; Yang et al., 2014). Cependant, dans d'autres pays (Royaume-Uni, Pologne, Nouvelle-Guinée), les familles de sous-types IIa sont dominantes (Connelly et al., 2013 ; Kaupke et al., 2017 ; Koinari et al., 2014). Les sous-types identifiés représentent un risque réel pour la santé publique, le sous-type IIdA16G1 et *C. parvum* ayant récemment été identifié chez des veaux et des enfants des régions rurales du nord de la Tunisie, proches des frontières algériennes (Rahmouni et al., 2014), ainsi que des infections à *Cryptosporidium* humain, notamment sous-type IIaA13G2R1 ont été rapportés chez des sujets immunodéprimés de Malaisie et d'Éthiopie (Adamu et al., 2014; Iqbal et al., 2012).

Les sous-types zoonotiques pathogènes de *C. parvum* seraient fréquents chez les veaux laitiers dans plusieurs régions en Algérie (Baroudi et al., 2017). Nos résultats suggèrent que les

agneaux pourraient aussi constituer un important réservoir de *C. parvum* en Algérie. Des investigations complémentaires sont nécessaires pour déterminer si cette observation est vraie dans d'autres régions du pays, de préférence avec des échantillons de plus grande taille, afin de mieux comprendre l'épidémiologie de la cryptosporidiose chez les agneaux.

**Ce travail nous a permis de constater que les agneaux, diarrhéiques et non diarrhéiques, de moins de trois mois d'âge pouvaient excréter l'espèce *C. parvum* mais également d'autres espèces de *Cryptosporidium spp.* Comme décrit dans la littérature, *C. parvum* est l'agent étiologique majeur des diarrhées néonatales chez les ruminants.**

**Le séquençage du génotype *C. parvum* a présenté un résultat original avec l'identification de trois sous-types de *C. parvum* chez les ovins: IIaA13G2R1, IIaA21G2R1, IIdA16G1, où la famille IId est décrite pour la première fois ainsi que le sous-type IIaA21G2R1 en Algérie. Vu l'importance du cheptel national, cette observation suggère que les agneaux, peuvent être un important réservoir de *Cryptosporidium spp.* en Algérie.**

## **V. CONCLUSION**

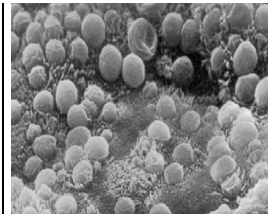
Les ruminants algériens sont infectés par de nombreuses espèces de *Cryptosporidium*, y compris les espèces et sous-types zoonotiques ; *C. parvum*, *C. ubiquitum*, *C. xiaoi*, *C. bovis* et *C. andersoni*. Bien qu'il existe plus d'études disponibles sur les veaux que sur les petits ruminants en Algérie, la prévalence de la cryptosporidiose reste non négligeable dans les cas de cryptosporidiose symptomatique et asymptomatique. Les données de notre étude révèlent que *Cryptosporidium spp.* sont généralement plus impliqués dans l'étiologie de la diarrhée dans les élevages bovins et ovins avec un système de gestion traditionnel (extensif) et soutient le rôle des jeunes ruminants en tant que source de contamination environnementale par des espèces et des sous-types zoonotiques de *Cryptosporidium*. En effet, la fréquence élevée d'infections zoonotiques du sous-type *C. parvum* (IIa, IIc) chez ces animaux, en Algérie, doit être considérée comme un réservoir zoonotique potentiel pour l'homme. Par conséquent, des études moléculaires dans d'autres régions chez les veaux et les petits ruminants, sont nécessaires pour mieux comprendre l'épidémiologie moléculaire de la cryptosporidiose en Algérie. Ces méthodes d'investigation facilitent l'identification des sources de contamination, ainsi que le potentiel zoonotique des différents isolats. De plus, de telles études génèrent des données précieuses sur la dynamique de transmission et la diversité des espèces dans les exploitations infectées, permettant ainsi d'identifier les facteurs de risque d'infection et de mettre en œuvre des mesures efficaces de gestion de la réduction de la contamination.

Nos résultats ont montré également que la population de *Cryptosporidium* détectée en Algérie est plus diverse que ne le suggéraient les études précédentes. Ce travail s'inscrit au titre d'un rapport à propos de *Cryptosporidium spp.* chez les ruminants algériens et pourrait servir de données de base pour des investigations ultérieures visant à mieux comprendre l'épidémiologie de la cryptosporidiose en Algérie.

## ***PARTIE EXPERIMENTALE***

**2<sup>ème</sup> Partie : Etude de l'infectiosité du parasite et  
évaluation du potentiel « anti-cryptosporidien » de  
chitosan et de la paromomycine sur les isolats de  
terrain *in vitro* et *in vivo***

---



## **I. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS**

La synthèse bibliographique ainsi que notre 1<sup>ère</sup> partie expérimentale ont montré que *Cryptosporidium spp.* est un protozoaire parasite qui infecte les cellules épithéliales de l'intestin grêle et provoque une maladie diarrhéique chez les ruminants et l'homme. *Cryptosporidium* a une distribution mondiale et est considéré comme une zoonose émergente. Malgré des efforts intenses pour développer des modèles expérimentaux exploitables et l'évaluation de plus de 200 agents chimio-thérapeutiques, les traitements adéquats pour éliminer l'hôte de ces parasites font encore défaut. Les raisons du manque d'efficacité du médicament sont probablement multiples et peuvent inclure l'emplacement inhabituel du parasite dans la cellule hôte, composition structurelle et biochimique distincte, ou sa capacité rapide à bloquer la pénétration ou à l'éliminer des molécules de médicament. Comprendre certains mécanismes fondamentaux par lesquels les médicaments sont transportés vers le parasite et identifier des cibles uniques est une première étape dans la mise au point d'agents thérapeutiques efficaces.

Le développement des recherches sur les ruminants s'inscrit dans l'amélioration des performances de la filière et la réduction des risques sanitaires que peuvent représenter les ruminants ayant la cryptosporidiose pour la santé publique et vétérinaire. La recherche d'un traitement efficace contre la cryptosporidiose dans les élevages des ruminants répond donc aux deux missions principales à savoir : limiter les pertes économiques en élevage et atténuer la contamination de l'environnement (l'eau en particulier) par les fèces chargées en parasites chez les animaux infectés.

Notre deuxième partie est intitulée : « **Etude de l'infectiosité des isolats de terrain *in vitro* et *in vivo* et évaluation du potentiel anti-cryptosporidien des chitosans et paromomycine** ». Elle est effectuée *in vitro* sur deux modèles de culture cellulaire (HCT-8 et Caco-2) et *in vivo* sur un modèle de souris nouveau-nés. Ces essais expérimentaux visent à atteindre l'approche appliquée thérapeutique avec l'étude du pouvoir d'infectiosité des isolats du terrain et d'estimer l'effet des chitosans et de la paromomycine sur les isolats naturels isolés et identifiés dans la première partie de la thèse.

La présentation de cet essai thérapeutique prend référence de la littérature sur la cryptosporidiose et les pistes thérapeutiques actuelles.

La recherche de nouvelles molécules thérapeutiques est plus que nécessaire. Nous rapportons ici l'adaptation d'une infection de deux modèles cellulaires (HCT-8 et Caco-2) par *C. parvum* et un modèle *in vivo* dans le but de réaliser l'estimation de l'infectiosité des souches de terrain

(isolat bovin et isolat ovin) et des évaluations thérapeutiques de polysaccharides naturels (chitosans) et de la molécules de sulfate de paromomycine.

Les essais thérapeutiques montrent un intérêt évident qui permet d'apporter une solution de sécurité contre cette parasitose. Notre approche comprend :

- 1- L'étude de l'infectiosité des isolats bovins et ovins avec un modèle cellulaire,
- 2- l'étude *in vivo* de l'infectiosité des isolats bovins et ovins sur un modèle de souris,
- 3- l'évaluation de l'effet anti-cryptosporidien des polysccharides naturels « chitosan » et la paromomycine sur les isolats de *Cryptosporidium* isolées chez les bovins et les ovins et cultivées sur un modèle de cellules HCT8 et CaCo2,
- 4- l'évaluation de l'effet anti-cryptosporidien des polysccharides naturels « chitosans » et de la paromomycine sur les isolats de *Cryptosporidium* isolés chez le bovin sur un modèle de souris.

## **II. MATERIELS ET METHODES**

Afin de répondre aux différents objectifs de la deuxième partie de notre travail, deux modèles expérimentaux ont été utilisés (*in vitro* et *in vivo*).

### **II.1. Laboratoire de culture cellulaire et équipements**

La pièce de culture cellulaire obéit à des mesures de sécurité microbiologique où le manipulateur doit obligatoirement passer par un sas. Le laboratoire est équipé d'un poste de sécurité microbiologique (PSM) qui est une hotte à flux laminaire possédant une lampe à UV sous laquelle toutes les manipulations des cultures cellulaires doivent avoir lieu. Le matériel utilisé dans cette salle doit être en totalité stérile.

### **II.2. Modèle *in vitro* « la culture cellulaire »**

#### **II.2.1. Les cellules (tapis cellulaire)**

Les modèles de culture *in vitro* (Upton *et al.*, 1994, 1995 ; Arrowood, 2002 ; Keegan, 2003) sont appliqués pour estimer au plus proche l'effet réel du parasite après son ingestion, de tester l'activité pharmacologique potentielle de différentes molécules sur les *Cryptosporidium spp.* Deux modèles de lignées cellulaires ont été utilisées (Figure 46) :

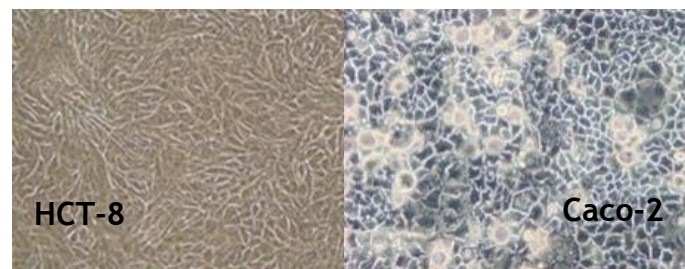
##### **▪ HCT-8 (*Human colonic tumor cells*)**

Les cellules choisies sont des cellules issues d'un adénocarcinome iléo-caecal humain, car elles s'avèrent très sensibles au développement du parasite de l'espèce *C. parvum* (Upton et

*al.*, 1994). Cette lignée donne également les meilleurs résultats de rendement parasitaire, et supporte également la plus longue durée de culture de 25 jours (Hijawi *et al.*, 2001).

▪ **Caco-2 (*Human colonic adenocarcinoma cells*)**

Malgré sa croissance lente, cette lignée est utilisée pour son expression des caractéristiques épithéliales typiques et notamment les microvillosités.



**Figure 46:** Tapis cellulaires observés au microscope photonique x10  
(UMR BIPAR ENVA, 2017)

### **II.2.2. Milieux de culture**

Tous les milieux de culture cellulaire utilisés proviennent des laboratoires Gibco (USA).

#### **II.2.2.1. Milieu de culture des HCT-8**

Les HCT-8 (ATCC CCL-244, Rockville, MD, U.S.A.) sont maintenues en culture dans le milieu Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640) supplémenté de 10% de SVF, 1mM de L-glutamine, 20 mM d'HEPES, 1mM de pyruvate de sodium, 100 UI/mL de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine.

#### **II.2.2.2. Milieu de culture des Caco-2**

Les cellules Caco-2 (ATCC HTB-37, Rockville, MD, U.S.A.) sont maintenues en culture dans un milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) supplémenté de 25mM bicarbonate de sodium, 1% d'acides aminés non-essentiels, 20% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF), 1mM de pyruvate de sodium, 100 UI/mL de pénicilline et 100µg /mL de streptomycine par et 2 mM de L-glutamine.

### **II.3. Le Modèle *in vivo***

Le modèle de souris CD-1 (Finch *et al.*, 1993) est un modèle de souris non sevrés (1 à 6 jours d'âge), qui selon les souches de souris, est très réceptif et sensible à l'infection par *C. parvum*. Le modèle est simple à l'utilisation, très reproductible et présente une infection

asymptomatique et auto-résolutive mais cependant les souriceaux excrètent des oocystes pendant 10 à 14 jours (Fayer et Xiao, 2008).

Ces souris non consanguines présentant une prolificité importante. Leur coût est relativement faible. Le modèle, déjà mis en place au sein du laboratoire, a été utilisé pour évaluer l'effet anti-cryptosporidien de molécules naturelles contre *C. parvum* (Iowa) (Mammeri *et al.*, 2018).

## **II.4. Parasites utilisés**

### **II.4.1. Souche de référence (Iowa)**

La souche utilisée comme référence et témoin positif sur le modèle de culture *in vitro* est une souche commerciale utilisée dans de nombreuses études portant sur *Cryptosporidium parvum*. Il s'agit de la souche Iowa (Waterborne Inc., Nouvelle-Orléans, Louisiane, USA). Cette souche est entretenue par infection expérimentale de veaux nouveaux nés. Le parasite est purifié et stocké à +4 °C dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) jusqu'à son utilisation. Les oocystes ont été utilisés dans les 4 mois suivant leur purification.

### **II.4.2. Isolats naturels testés**

#### **II.4.2.1. « Isolats bovins » testés**

Suite à notre travail de caractérisation phénotypique et génotypique, 4 souches de *C. parvum* ont été testées expérimentalement *in vitro* pour évaluer leur infectiosité et l'effet de certaines molécules anti-cryptosporidiennes. Quatre isolats de *C. parvum* d'origine bovine ont été sélectionnés en fonction du niveau d'excrétion. Ces isolats ont été expérimentés *in vitro*. Par contre, un seul isolat a été retenu pour le test *in vivo*.

#### **II.4.2.2. « Isolats ovins » testés**

Au même titre que les isolats bovins, 3 isolats d'origine ovine ont été testés *in vitro* pour estimer leur infectiosité et l'effet de certains anti-cryptosporidiens sur leur viabilité. Des isolats d'espèces de *C. parvum* et *C. ubiquitum* ont été retenus.

## **II.5. Molécules anti-cryptosporidiennes utilisées**

### **II.5.1. Sulfate de Paromomycine**

Le sulfate de paromomycine, composé chimique pur à 100 % et soluble, a été fourni par la société Olon S.P.A. (Milano, Italie). Il est considéré comme la molécule chimique de



référence pour son action anti-cryptosporidienne. Une solution à 100mg/ml dans le milieu de culture spécifique pour chaque lignée cellulaire utilisée est préparée.

### **II.5.2. Polysaccharides naturels (Chitosans)**

Le Chitosan est la forme désacétylée alcaline de la chitine, principale composante structurelle des exosquelettes d'invertébrés (insectes) et des parois cellulaires de champignons (zygomycetes). Il se compose d'unités de N-acétyl- $\beta$ -D-glucosamine (unité désacétylée), reliées par des liaisons glycosidiques (1- 4) avec de la  $\beta$ -D-glucosamine (unité acétylée) (Raafat et Sahl, 2009).

Pour étudier les effets anti-cryptosporidiens, un polymère et un monomère de chitosan purs ont été utilisés :

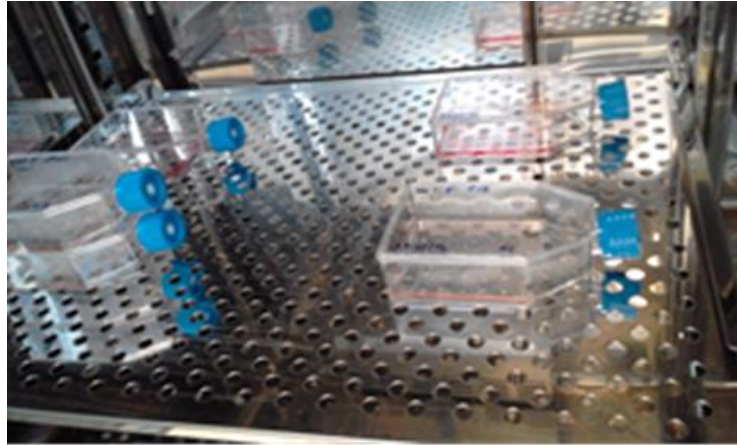
- Le **chitosan MIX** qui est un mélange de plus de 90 % de désacétylation. C'est une poudre de polymère naturel insoluble mais dispersible dérivé d'un crustacé *Homarus locusta* (Federal Laboratories Corp., USA).
- Le **N-acétyl-D-glucosamine (chitosan NAG)** un chitosan monomère soluble (Kraeber et Co GMBH, Allemagne).

## **II.6. Protocole expérimental *in vitro***

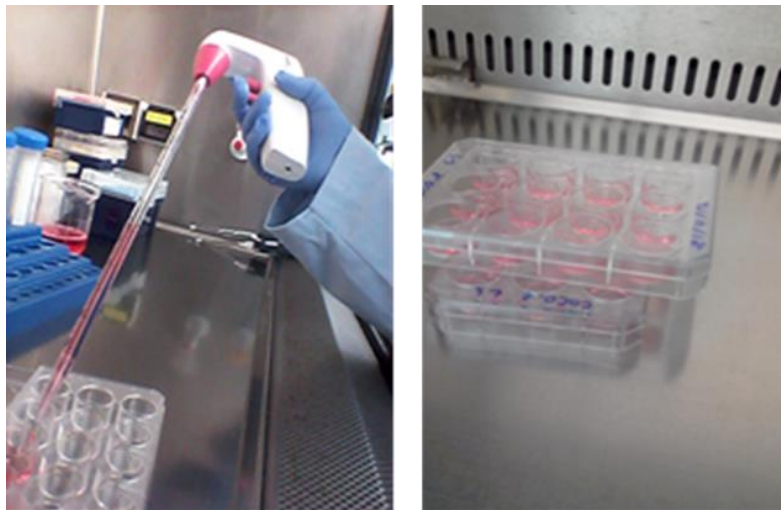
### **II.6.1. Préparation des cultures cellulaires**

Les tapis cellulaires cultivés au préalable dans des plaques (flasques) (Figure 47) sont repiqués dans des plaques de 12 puits (Nunc, Danemark) contenant des lamelles de 18 mm (Marienfeld, Allemagne) sensibilisées avec une solution de collagène à 0,1mg/ml issus de placenta humain (Sigma, France) (Figure 48). Cette sensibilisation permet un meilleur attachement des cellules à leur support (Rochelle *et al.*, 1997).

Les plaques contenant les cellules sont à leur tour incubées à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub> et 80% d'humidité. Les milieux de cultures sont changés toutes les 48 heures. Quand le tapis cellulaire arrive à une confluence de 70%, les milieux de culture sont remplacés par des milieux de culture à 2% de SVF pour ralentir la croissance cellulaire.



**Figure 47 : Culture cellulaire en flasque**



**Figure 48 : Préparation des tapis cellulaires sur lamelles dans les plaques**

## **II.6.2 Etude de l'infectiosité des isolats de terrain d'origine bovine et ovine**

### **II.6.2.1. Infestation des tapis cellulaires**

Chaque puits des plaques contenant les tapis cellulaires ayant une confluence de 70% sont infectés par  $10^4$  oocystes issus de nos souches bovines, ovines ainsi que par la souche de référence (*Iowa*). La même quantité d'oocystes servant à l'infestation est utilisée pour tous les isolats afin d'observer et d'évaluer le développement du parasite de façon constante d'une expérimentation à l'autre.

Les cellules sont ensuite incubées pendant 48h (37°C, étuve humide, 5% de CO<sub>2</sub>). Chaque expérience est réalisée 3 fois (n=3).

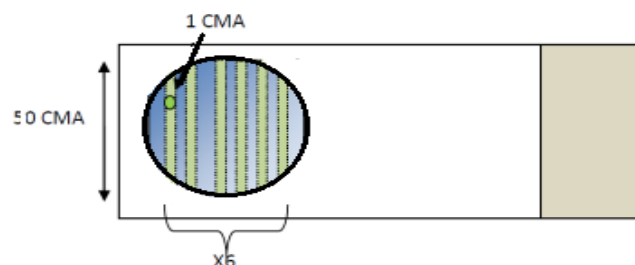
### **II.6.2.2. Mise en évidence des formes intracellulaires du parasite dans les lignés cellulaires**

L'intensité de l'infection est réalisée par un marquage immunofluorescent des formes intracellulaires. 48h après infection, les tapis cellulaires sont fixés avec du méthanol (*Fisher Scientific*, UK) pendant 10 min à température ambiante. Après l'élimination du méthanol et le séchage des lamelles, 1 ml/puits de solution de blocage est ajoutée. Cette solution contient 100 ml de PBS stériles (*Sigma*, France), 0,002 % (vol/vol) Tween 20 (*Montanox*, Seppic, France) et 1 % (poids/vol) de BSA (*Sigma*, France). Les plaques sont incubées pendant 30 minutes à température ambiante. Après 2 lavages au PBS, 150 µl de solution de marquage préparée extemporanément sont ajoutés dans chaque puits. Cette solution a été réalisée à partir d'anticorps polyclonal spécifique conjugué à la fluorescéine (*Sporo-Glo*™, Waterborne Inc., New Orleans, LA, USA). Cette coloration à la fluorescéine permet la visualisation *in vitro* de différents stades de vie intracellulaires de *Cryptosporidium*.

Après une incubation de 45 minutes dans une chambre humide, à l'obscurité et température ambiante, suivie de deux lavages au PBS, chaque lamelle est retirée du puits et montée avec le kit *ProLong Antifade* sur une lame de microscope (*Life Technologies*, USA) conformément aux instructions du fabricant (*Superfrost*, France).

Les lames ont été analysées au microscope (Leica) à épifluorescence (excitation à 450-480 nm avec émission 515nm). Les formes parasitaires intracellulaires ont été comptées dans 300 champs microscopiques aléatoires (6 x 50 champs microscopiques aléatoires (CMA) (Figure 49).

Le nombre moyen de formes intracellulaires des 3 puits ( $n = 3$ ) a été utilisé pour déterminer l'intensité de l'infection. Les puits contenant les oocystes à tester ont été comparés aux puits témoins positifs (souche *Iowa*).



**Figure 49:**Schéma représentatif de la méthode de numération par IF.

### **II.6.3. Etude de l'effet des « anti-cryptosporidiens » polysaccharides naturels (chitosan) sur les isolats de terrain d'origine bovine et ovine**

Les isolats qui ont montré un pouvoir d'infectiosité important par rapport au témoin (souche de référence *Iowa*) ont été testés avec les molécules de polysaccharides proposées.

#### **II.6.3. 1. Préparation de la solution mère des molécules à tester**

La solution mère à 100 mg/ml de molécules de **Chitosan Nag** et **Chitosane Mix** (*Phileo, Lesaffre Animal Care*, France) ainsi que la molécule de sulfate de paromomycine (*Olon S.P.A.*, Italie) ont été préparées dans de l'eau distillée stérile et filtrée à travers des filtres de 0,22 µm.

#### **II.6.3.2. Infestation et dépôt des molécules à tester sur les tapis cellulaires**

Pour évaluer l'effet anti-cryptosporidien des polysaccharides sur les isolats de terrain d'origine bovine et ovine *in vitro*, les cellules cultivées en plaque (dans les mêmes conditions citées précédemment) sont inoculées à raison de 10<sup>4</sup> oocystes par puits.

Après 48h d'incubation, les milieux de culture sont remplacés par un milieu de culture à 2% de SVF. Les produits (NAG, MIX et paromomycine) sont déposés à une concentration finale de 500 µg/mL par puits.

L'intensité de l'infection a été évaluée après 48h d'incubation à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub> en chambre humide (80%).

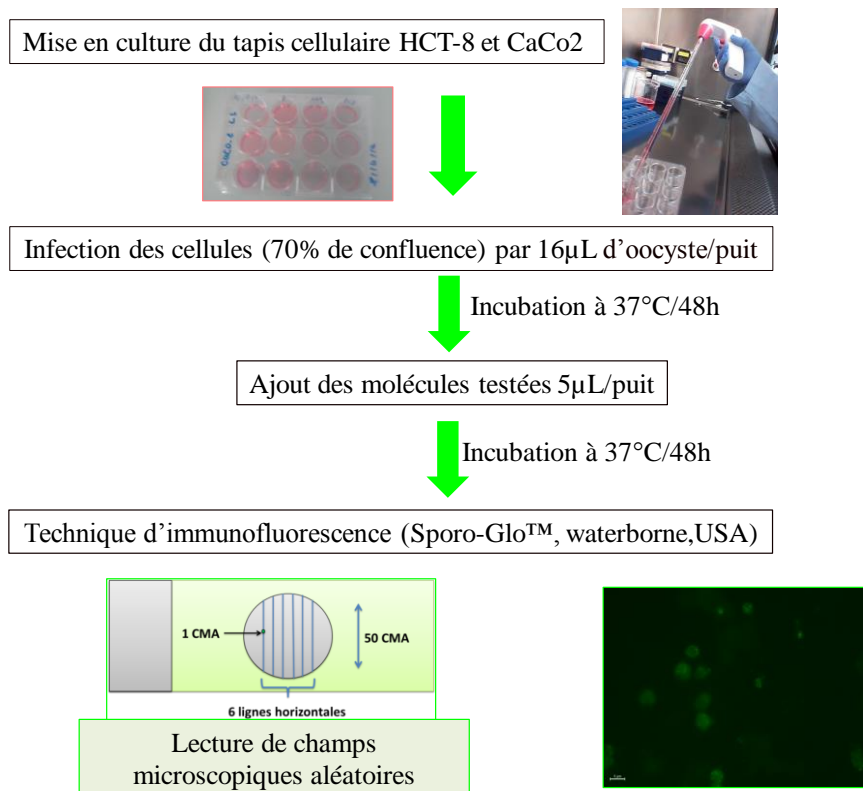
#### **II.6.3.3. Evaluation des effets des molécules sur le parasite**

La recherche de l'effet des molécules sur les oocystes est réalisée par le même protocole cité précédemment. Un marquage immunofluorescent des formes intracellulaires est effectué 48h après dépôt des molécules, les tapis cellulaires sont fixés avec du méthanol (Fisher Scientific, UK) pendant 10 min à température ambiante. Après l'élimination du méthanol et le séchage des lamelles, 1 ml/puits de solution de blocage est ajoutée. Cette solution contient 100 ml de PBS stérile (*Sigma*, France), 0,002 % (vol/vol) Tween 20 (*Montanox, Seppic*, France) et 1 % (poids/vol) de BSA (*Sigma*, France). Les plaques sont incubées pendant 30 minutes à température ambiante. Après 2 lavages au PBS, 150 µl de solution de marquage préparée extemporanément sont ajoutés dans chaque puits. Cette solution a été réalisée à partir d'anticorps polyclonal spécifique conjugué à la fluorescéine (*Sporo-Glo*™, Waterborne Inc., New Orleans, LA, USA) dilué dans du PBS. Cette coloration à la fluorescéine permet la visualisation *in vitro* de différents stades de vie intracellulaires à *Cryptosporidium*.

Après une incubation de 45 minutes dans une chambre humide, à l'obscurité et température ambiante, suivie de deux lavages au PBS, chaque lamelle est retirée du puits et montée avec le

kit *ProLong Antifade* sur une lame de microscope (*Life Technologies*, USA) conformément aux instructions du fabricant (*Superfrost*, France).

Les lames sont analysées au microscope (Leica) à épifluorescence (excitation à 450-480 nm avec émission 515nm). Les formes parasitaires intracellulaires sont comptées dans 300 champs microscopiques aléatoires (6 x 50 champs microscopiques aléatoires (CMA) (Figure 50). Le nombre moyen de formes intracellulaires des 3 puits (n = 3) a été utilisé pour déterminer l'intensité de l'infection.



**Figure 50 :** Protocole expérimental de l'essai *in vitro*

## **II.7. Protocole expérimentale *in vivo***

Suite à nos essais *in vitro*, des essais *in vivo* ont été réalisés. Ceci a concerné les isolats qui ont montré le pouvoir d'infectiosité le plus élevé.

### **II.7.1. Le choix du modèle**

Le modèle de souris CD-1a a été choisi pour toutes les raisons citées précédemment pratique et facilité d'utilisation (Figure 51).



**Figure 51 :** Groupe de souriceaux nouveaux-nés

## **II.7.2. Evaluation *in vivo* de l'infectiosité des isolats ovins et bovins**

### **II.7.2.1. Conditions de mise en place de l'essai *in vivo***

Les protocoles expérimentaux ont été réalisés sur des souriceaux CD-1 selon les étapes mentionnées dans la Figure 52.

Les souris non consanguines CD-1 utilisées dans cette étude ont été obtenues auprès des laboratoires d'élevage Charles River (France) et maintenues dans des conditions d'asepsie dans un isolateur tout au long des expériences. Les draps sont changés tous les jours. Ils sont conservés dans des cages en plastique surmontées de filtres de 60 × 40 cm (Charles River, France) avec des copeaux de bois servant de litière. Tous les animaux avaient accès à un régime alimentaire granulé standard et à de l'eau. La température ambiante a été maintenue à environ 21°C. Les expériences *in vivo* ont été approuvées par le Comité d'éthique régional français numéro 16 de l'ANSES / ENVA / UPEC et par le Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche de France.

Les oocystes utilisés proviennent des isolats de bovin et ovin identifiés et caractérisés. Ils ont été conservés dans du PBS additionné de pénicilline, de streptomycine, de gentamycine ainsi que d'amphotéricine B. Ces suspensions d'oocystes ont été maintenues à +4°C jusqu'à leur utilisation.

### **II.7.2.2. La cinétique du modèle d'infection de souris nouveau-né CD-1**

Afin de vérifier l'absence d'une infection préexistante, les animaux morts et des fèces ont été récoltées avant inoculation et testées pour *Cryptosporidium spp.*



Les solutions d'oocystes sont préparées la veille des expériences d'inoculation. Les souriceaux âgés de cinq jours sont tous infectés expérimentalement avec  $10^5$  d'oocystes de *C. parvum* /animal par gavage œsophagien *via* des tubes d'alimentation en plastique de 22 cm de long (*Phymep*, France). Les souriceaux sont euthanasiés 8 jours après infestation.

Après le sacrifice des animaux, la totalité des intestins (les segments d'iléon, de caecum et de colon) sont fixés, colorés puis analysés par immunofluorescence afin de détecter et compter les oocystes.

#### **II.7.2.3. Etude de l'effet des produits « anti-cryptosporidiens » sur les isolats de terrain d'origine bovine *in vivo***

L'étude est réalisée sur 4 portées de souriceaux : 1 portée par molécule testée (chitosan NAG, chitosan MIX, témoin positif au sulfate de paromomycine) ainsi qu'une portée témoin non traitée (traitement avec de l'eau stérile). Les molécules sont préparées à une concentration de 1mg/inoculation.

Les quatre groupes de souris néonatales sont été traitées la veille de l'infection, un jour (6<sup>ème</sup> jour) et quatre jours (9<sup>ème</sup> jour) après inoculation des oocystes. Les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale au huitième jour après infection. L'expérience *in vivo* a été dupliquée en utilisant un protocole identique (Figure 52).

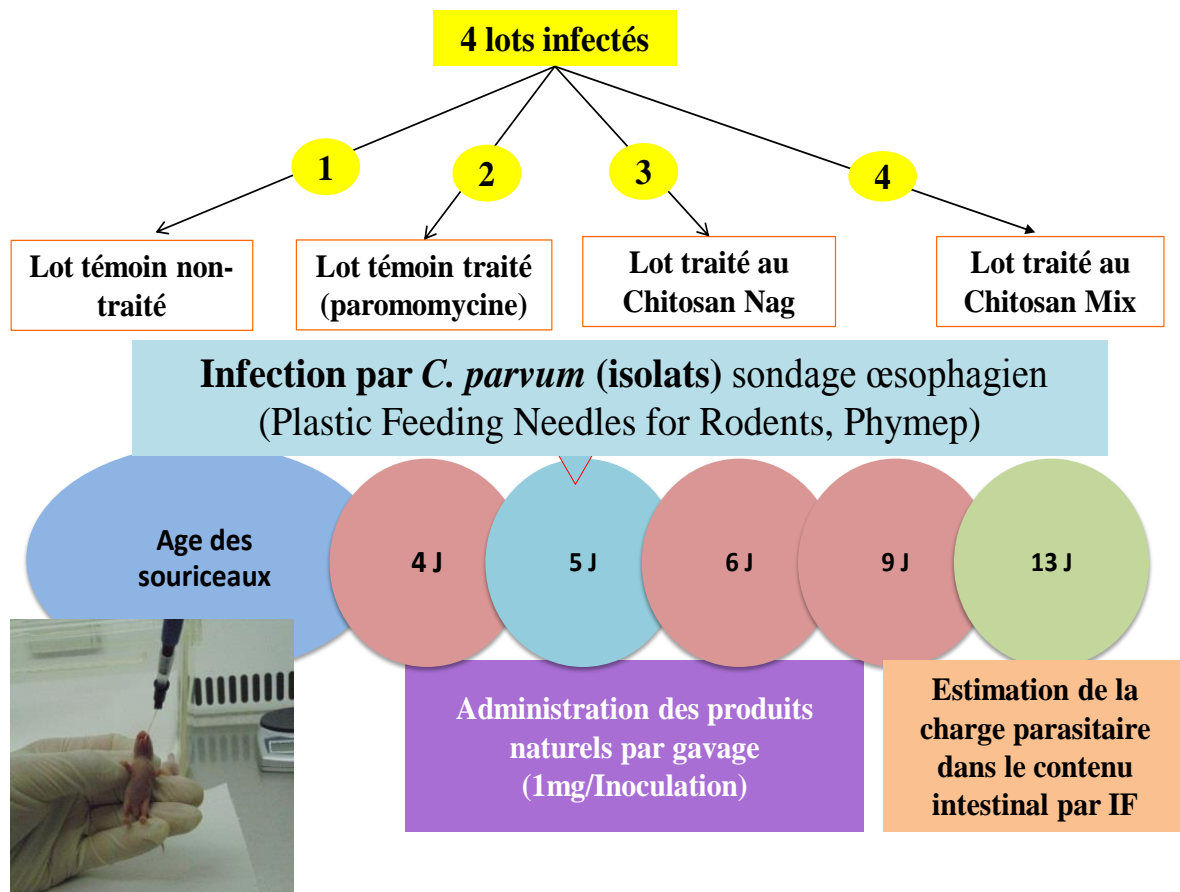
#### **II.7.2.4 Mise en évidence et dénombrement des oocystes par immunofluorescence**

La totalité des intestins (les segments d'iléon, de caecum et de colon) des souriceaux euthanasiés est récupéré et déposé dans 50 ml de PBS afin de remettre en suspension le contenu intestinal. 20 µl en triplicat de cette suspension homogénéisée sont déposés sur une lame d'immunofluorescence (*Immuno-Cell Int.*, France), puis séchés pendant 1 heure à la température ambiante. Une fixation avec 20 µl d'acétone pendant 10 min est effectuée. Ensuite, un immuno-marquage des oocystes a été réalisée en utilisant le kit *Meri fluor® Cryptosporidium / Giardia* (*Meridian Bioscience, Milan, Italie*) en suivant les instructions du fabricant avec une modification : le réactif de détection a été dilué (1/4 vol / vol) dans du PBS.

La lecture de l'ensemble des puits est ensuite effectuée afin de détecter et compter les oocystes.

## II.8. Analyses statistiques

Afin d'évaluer les effets anti-cryptosporidiens du chitosan *in vitro* et *in vivo*, des tests statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel *GraphPad Prism* (version 5.0, USA). Pour les expériences *in vitro*, le pourcentage de formes intracellulaires de *C. parvum* dans les groupes traités a été comparé au pourcentage de formes intracellulaires dans le groupe témoin infecté mais non traité (100%). Le test de Mann-Whitney ou un t-test Student non apparié ont été utilisés pour comparer les groupes traités au groupe de témoin infecté non traité. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur type de la moyenne (SEM). Une valeur de  $p < 0,05$  était considérée comme statistiquement significative.



**Figure 52 :** Protocole expérimental de l'essai *in vivo*

**Remarques :** Dans le modèle *in vivo*, l'étude de l'infectiosité des isolats et l'étude des effets des molécules testées ont été réalisées durant le même essai (Figure 52).





### III. RESULTATS

#### III.1. Caractérisation des isolats bovins et ovins

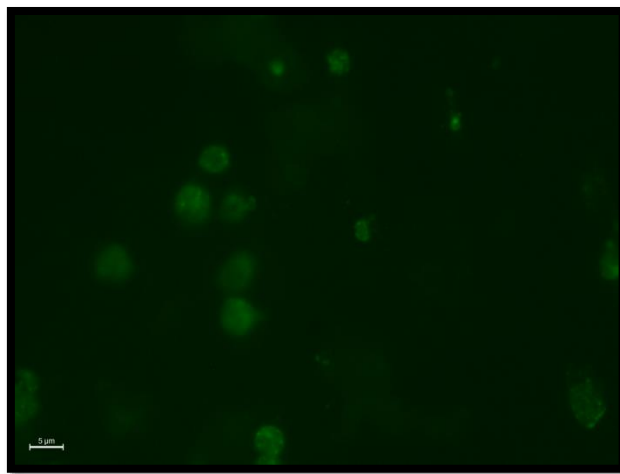
Avant d'évaluer l'effet des molécules anti-cryptosporidiennes (paromomycine et chitosan) sur les *Cryptosporidium spp.* (isolats bovins et ovins), une étude de leur infectiosité a été réalisée sur deux modèles : *in vitro* (culture cellulaire) et *in vivo* (modèle animal). Dans la première partie de notre travail, les isolats bovins et ovins utilisés dans ces essais ont été identifiés et caractérisés par les méthodes de biologie moléculaire (PCR ARNr18S, PCR GP60 et une étape de séquençage). Neuf isolats, cinq bovins et quatre ovins ont été testés. Les caractéristiques des isolats retenus pour cette expérimentation sont mentionnées dans le Tableau 19.

**Tableau 19 :** Caractéristiques des isolats bovins et ovins retenus pour les essais thérapeutiques.

Isolat	Région	Age (jours)	Statut clinique	Date de récolte	Taux d'excrétion	Espèce	Sous-type <i>C. parvum</i>
							
<b>B1</b>	Sétif	45	D	Février 2017	8,42.10 <sup>5</sup>	<i>C. parvum</i>	IlaA16G2R1
<b>B13</b>	Sétif	30	D	Janvier 2017	7,8.10 <sup>5</sup>	<i>C. parvum</i>	IlaA16G2R1
<b>B11</b>	Sétif	26	D	Automne 2016	1,2.10 <sup>6</sup>	<i>C. parvum</i>	IIdA16G1
<b>B17</b>	Sétif	21	D	Janvier 2017	9,33.10 <sup>5</sup>	<i>C. parvum</i>	IlaA16G2R1
<b>B29</b>	Souk Ahras	10	D	Janvier 2017	9,20.10 <sup>5</sup>	<i>C. parvum</i>	IIdA16G1
							
<b>O2</b>	Soukahras	6	D	Janvier 2017	6,30.10 <sup>4</sup>	<i>C. parvum</i>	IlaA21G2R1
<b>O33</b>	Sidi Belabbas	21	D	Automne 2016	2,64.10 <sup>4</sup>	<i>C. parvum</i>	IIdA16G1
<b>O70</b>	M'Sila	20	D	Janvier/février 2016	9,75.10 <sup>5</sup>	<i>C. parvum</i>	pas de résultat du séquençage
<b>O19</b>	Sidi Belabbas	10	D	Novembre/Décembre 2015	6.10 <sup>3</sup>	<i>C. ubiquitum</i>	❖

### **III.2. Résultats de l'étude de l'infectiosité des isolats *in vitro***

Les isolats bovins et ovins ainsi que la souche *C. parvum* Iowa sont mis en culture simultanément sur les 2 lignées cellulaires (HCT-8 et Caco-2). Les tapis cellulaires, cultivés à raison de 70-80% de confluence sur les lamelles de chaque puits (plaque 12 puits), sont infectés en triplicat pour chaque isolat, par la charge parasitaire sélectionnée lors de la validation du modèle, à savoir  $10^4$  oocystes/puits. Après 48h d'incubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 80% d'humidité), les tapis sont récupérés et les formes intracellulaires du parasite sont marquées par un l'anticorps spécifique de Sporoglo couplé à l'immunofluorescence (Figure 53).



**Figure 53:** Oocystes de *Cryptosporidium parvum* (isolat bovin) marqués à l'anticorps polyclonal Sporoglo (Waterborne, USA) et observé en immunofluorescence au microscope UV à 400X (UMR BIPAR, 2017).

L'observation microscopique des lames a permis de constater le développement des parasites (bovins ; ovins) à côté de la souche Iowa sur les deux lignées cellulaires.

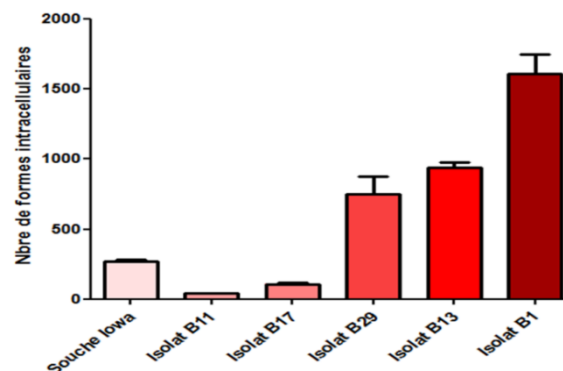
Le dénombrement des formes parasitaires intracellulaires (diamètre > 3μm) des isolats et de la souche de référence a permis de tracer les résultats obtenus sous forme d'histogrammes nombre des formes parasitaires intracellulaires (FIC) en fonction des souches utilisées.

#### **III.2.1. Etude de l'infectiosité des isolats de l'espèce bovine**

La lecture microscopique des lames a permis d'observer le développement du parasite dans les conditions préalablement décrites. La numération, présentée dans les histogrammes (Figures 54 et 55), montre un nombre de FIC important à partir de la charge parasitaire initiale

inoculée dans les 2 lignées cellulaires. Cela a permis de mettre en évidence un développement significatif des oocystes ( $n=3$ ,  $p < 0,05$ ).

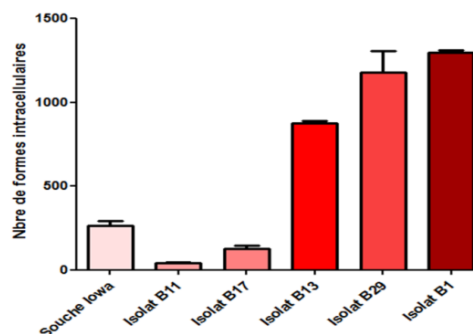
Nos histogrammes montrent clairement l'infectiosité des deux lignées cellulaires (HCT-8 et Caco-2) par les isolats bovins. On constate que l'infectiosité est très élevée chez les souches B1, B13 et B29, où le B1 dépasse le nombre de 1500 de forme intracellulaire sur le tapis des HCT-8 et il est près de ce chiffre sur les cellules du tapis Caco-2. En effet, un développement important des formes intracellulaires est observé par IF dans les deux lignées. Néanmoins, une légère différence a été remarquée en fonction des tapis cellulaires inoculés, notons un nombre légèrement plus élevé de FIC sur HCT-8 que sur Caco-2.



**Figure 54 :** Etude de l'infectiosité des isolats bovins cultivés sur HCT-8

Les isolats B11et B17 ont montré une faible amplification (régression) des formes intracellulaires dans les cellules HCT-8 ainsi que sur Caco-2.

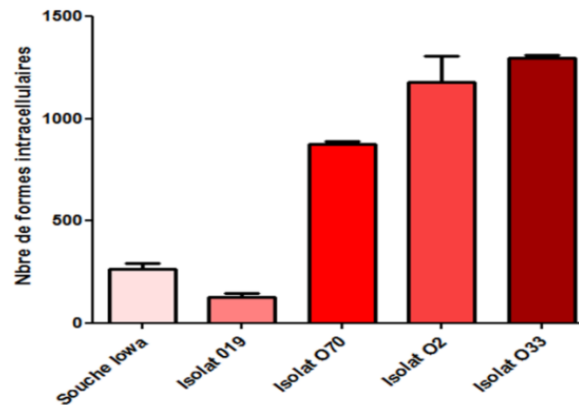
Il est à remarquer aussi, la faible infectiosité de la souche Iowa. La souche de référence n'a pas donné les taux d'infectiosité attendus dans nos conditions expérimentales et ceci dans les deux lignées cellulaires.



**Figure 55 :** Etude de l'infectiosité des isolats bovins cultivés sur Caco-2

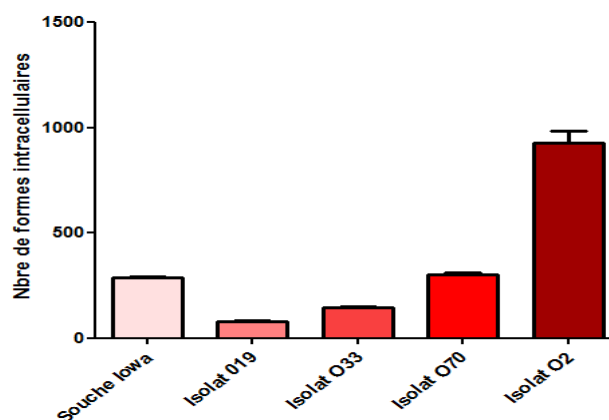
### **III.2.2. Etude de l'infectiosité des isolats de l'espèce ovine**

Comme pour les isolats bovins, les souches ovines testées ont montré une infectiosité importante surtout pour les isolats O33, O2 et O70 cultivés sur la lignée HCT-8 avec un nombre très élevé des formes intracellulaires (près de 1500). Par contre, le FIC du parasite O2 et O70 apparait avec un nombre moins important sur la lignée Caco-2 (Figures 56 et 57).



**Figure 56 :** Etude de l'infectiosité des isolats ovins cultivés sur les cellules HCT8

Cependant, l'isolat O19 montre une régression importante par rapport à la charge initiale. Avec un nombre près de  $10^2$  FIC, l'isolat montre une faible infectiosité sur les deux tapis cellulaires. Suite à ces constations, l'isolat a été écarté de l'expérimentation. Les résultats de la culture de l'isolat O33 dans le tapis cellulaire Caco-2 montrent une faible infectiosité par le parasite (Figure 57). Par conséquent, cet isolat n'a pas été testé lors de l'étude de l'effet des anti-cryptosporidiens sur Caco-2.



**Figure 57 :** Etude de l'infectiosité des isolats ovins cultivés sur les cellules Caco-2

Sur les cellules Caco-2, la souche Iowa a donné le même taux d'infectiosité que précédemment.

### **III.3. Evaluation *in vitro* du potentiel « anti-cryptosporidien » des polysaccharides naturels (chitosan) et la paromomycine sur les isolats de terrain de cryptosporidium**

Les isolats, montrant un nombre élevé des formes intracellulaires, ont été retenus pour réaliser cet essai *in vitro*. En outre, l'effet des anti-cryptosporidiens a été réalisé sur les isolats sélectionnés en fonction de leurs taux d'infectiosité.

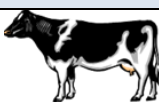
Selon ce critère de choix, les isolats bovins (B1, B13 et B29) et les isolats ovins (O2, O33 et O70) ont été maintenus pour cette expérimentation. Les formes intracellulaires de tous les isolats ont été réduites par les produits testés mais plusieurs variabilités ont été constatées. Pour une meilleure interprétation des résultats, des histogrammes ont été tracés pour chaque isolat (pourcentage des FIC en fonction des molécules testées) et des moyennes individuelles et globales des taux de réduction ont été calculées pour les isolats bovins et ovins.

#### **III.3.1. Effet des « anti-cryptosporidien » polysaccharides naturels (chitosan) sur les isolats bovins *in vitro***

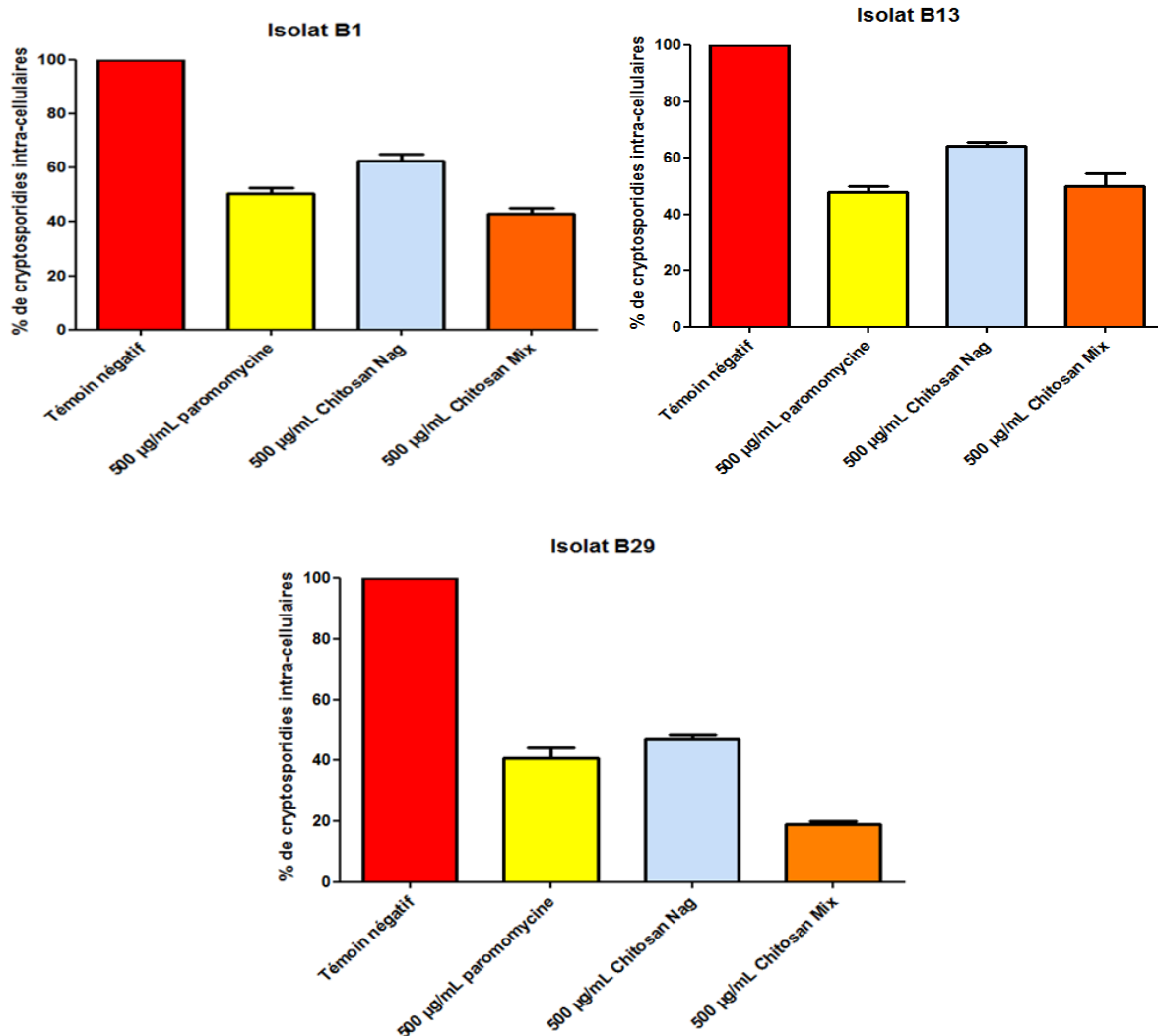
Les résultats mentionnés dans le tableau (20) montrent clairement l'effet des anti-cryptosporidien. Le sulfate de paromomycine inhibe la multiplication parasitaire dans les cellules HCT-8 et Caco-2. Dans les cellules HCT8, une dose de 500 µg / ml de sulfate de paromomycine a réduit la forme intracellulaire de B1, B13 et B29 avec 22%, 38% et 68% respectivement par rapport au contrôle. Avec la même concentration (500 µg / ml) de chitosan, les FIC des isolats B1, B13 et B29 ont été réduites. Avec le chitosan NAG les taux étaient les suivant 49%, 40% et 60%, respectivement. Pour le chitosan Mix les taux de réduction étaient (70%, 58% et 88%) ( $p < 0,001$ ).

Des effets de réduction ont été aussi obtenus sur cellules Caco-2. La molécule sulfate de paromomycine a réduit les formes intracellulaires(FIC) des isolats de 50% à 60% par rapport au contrôle. Pour le chitosan NAG et le chitosan Mix, les FIC ont été réduits significativement de 32% à 55% et de 50% à 80%, respectivement ( $p < 0,01$ ).

**Tableau 20 :** Taux de réduction des formes intracellulaire de *C. parvum* en pourcentage (%) sous l'effet des anticryptosporidiens

Lignées cellulaires	HCT-8			Caco-2		
	 %					
Isolats Sous-types	B1	B13	B29	B1	B13	B29
Paromomycine	22	38	68	50	55	60
<b>Moyenne</b>	<b>30</b>		<b>68</b>	<b>52,5</b>		<b>60</b>
Chitosan NAG	49	40	60	38	32	55
<b>Moyenne</b>	<b>44,5</b>		<b>60</b>	<b>35</b>		<b>55</b>
Chitosan MIX	70	58	88	58	50	80
<b>Moyenne</b>	<b>64</b>		<b>88</b>	<b>54</b>		<b>80</b>

A ce stade des résultats, tous les produits ont considérablement réduit le développement du parasite dans les cellules HCT-8. Les deux composés de chitosan étaient efficaces. L'effet de sulfate de paromocycine et le chitosan NAG était comparable sur l'isolat B13, mais le chitosan NAG a diminué plus le parasite B1 que la paromomycine. Alors que ce dernier diminue plus l'isolat B29 que le chitosan NAG. Le chitosan Mix était le plus efficace des trois molécules.



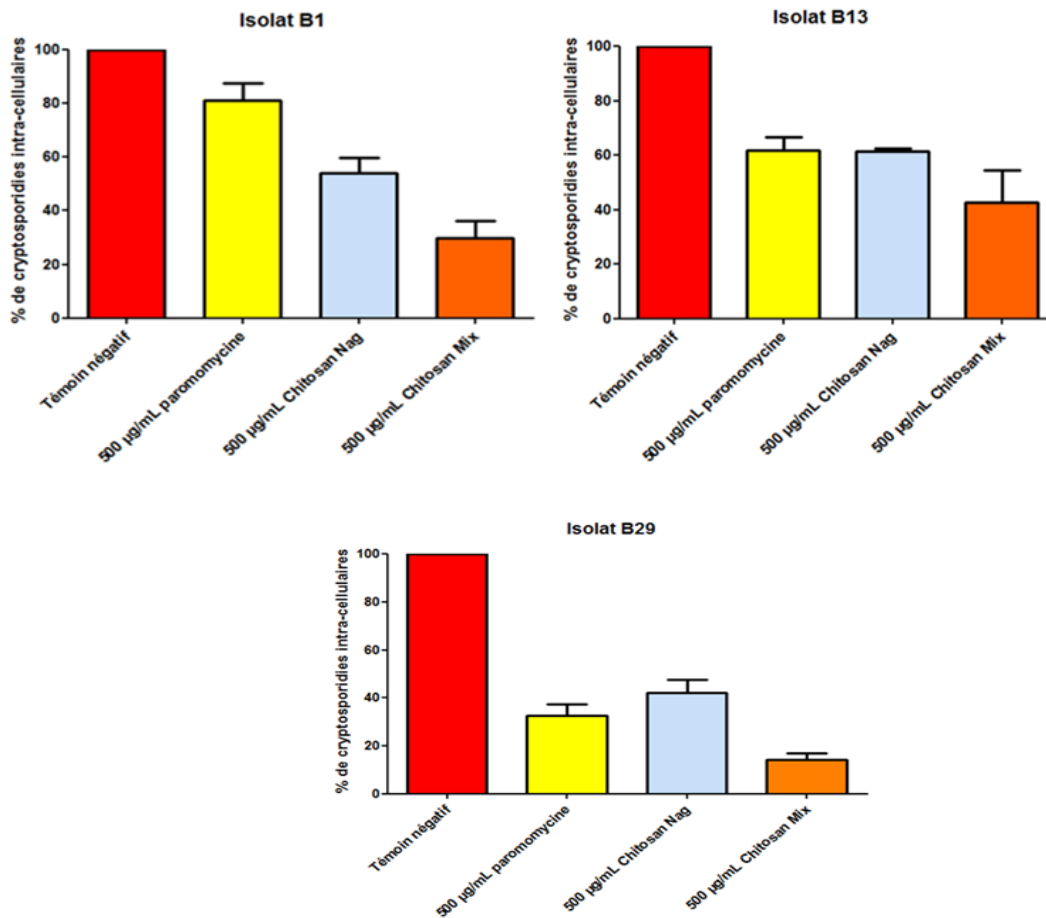
**Figure 58 :** Evaluation du potentiel « anti-cryptosporidien » des polysaccharides naturels (chitosans) sur les isolats bovins B1, B13 et B29 cultivés sur Caco2

Dans le modèle Caco-2, le sulfate de paromomycine, le chitosan NAG et le chitosan Mix ont réduit les formes parasitaires intracellulaires. De nouveau, le meilleur effet a été obtenu avec Chitosan Mix.

Dans cette lignée des cellules Caco-2, la réduction de l'isolat B1 et B13 par la paromomycine s'est montrée moyenne avec 50% et 55% respectivement. Cependant, le chitosan NAG avait une réduction faible sur B1 et B13 dans ces cellules Caco-2. Sur ces dernières le chitosan mix a eu un effet de réduction moyen sur les isolats B1 et B13 de 50% et 58% respectivement.

L'isolat B29 a été diminué de plus que la moitié par la paromomycine et le chitosan NAG dans cette lignée. Par ailleurs, le chitosan Mix a eu un effet de réduction très élevé de 80% sur cet isolat dans le tapis Caco2.

A ce niveau, il apparaît une différence quant aux réductions des parasites en fonction des lignées cellulaires (Figures 58 et 59).



**Figure 59 :** Evaluation du potentiel « anti-cryptosporidien » des polysaccharides naturels (chitosans) sur les isolats bovins B1, B13 et B29 cultivés sur les cellules HCT8


Aussi, le tableau 20 montre des taux de réduction des isolats naturels par les anti-cryptosporidiens par rapport aux sous-types de *C. parvum*. Il apparaît une diminution plus importante du sous-type IIdA16G1 *C. parvum* (B29) avec un taux de réduction de 68%, 60% et 88% dans HCT-8 et de 60%, 55% et 80% dans Caco-2 sous l'effet de la paromomycine, chitosan NAG et chitosan Mix successivement. Cependant, l'effet de la paromomycine, du chitosan NAG et du chitosan Mix était moins important sur le sous-type IIdA16G2R1 *C. parvum* (B1, B13) où les moyennes des taux de réduction étaient de 30%, 44,5% et 64% dans le tapis HCT-8 et de 52,5%, 35% et 54% dans les cellules Caco-2 respectivement. Toutefois, le composé le plus efficace sur les deux sous-types *C. parvum* reste le chitosan Mix.



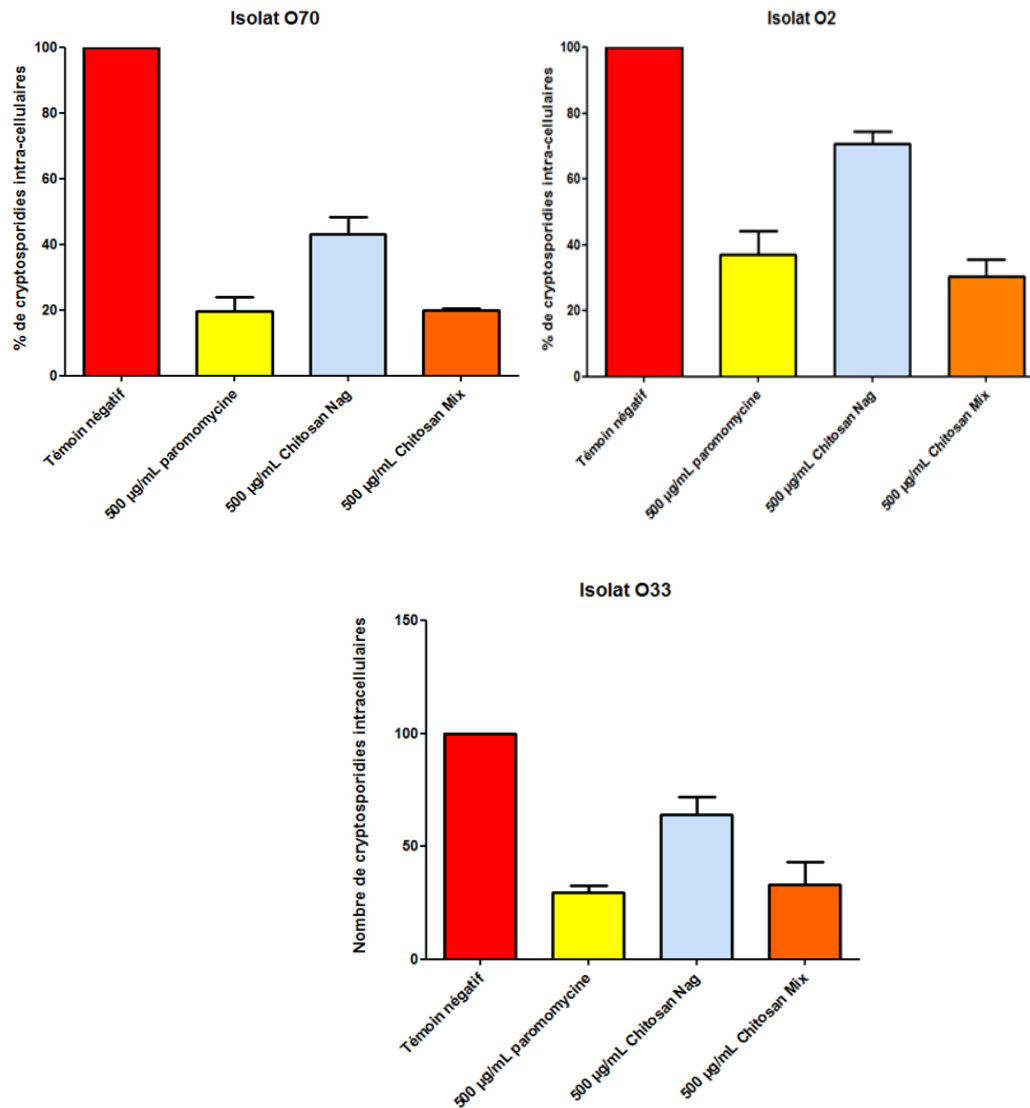
### III.3.2. Evaluation *in vitro* du potentiel « anti-cryptosporidien » des polysaccharides naturels (chitosans) sur les isolats ovins

Les résultats mentionnés dans le Tableau 21 montrent clairement l'effet des anti-cryptosporidien sur les isolats ovins. Le sulfate de paromomycine inhibe la multiplication parasitaire dans les cellules HCT-8 et Caco-2. Dans les cellules HCT-8, la molécule de paromomycine a réduit la forme intracellulaire des isolats O2, O33 et O70 de 65%, 74% et 82% respectivement, par rapport au contrôle. Les polysaccharides, chitosan NAG et le chitosan Mix ont diminué la FIC des isolats de (47%, 40% et 65%,) et de (72%, 70%et 83%) respectivement, ( $p < 0,001$ ). Des effets de réduction ont été aussi obtenus sur cellules Caco-2s. La molécule sulfate de paromomycine a réduit les FIC de l'isolat O33et O70 de 63% et 80% par rapport au contrôle. Pour le chitosan NAG et le chitosan Mix, les FIC de O33 et O70 ont été réduites de (30% et 58%) et (70% et 80%), respectivement ( $p < 0,01$ ).

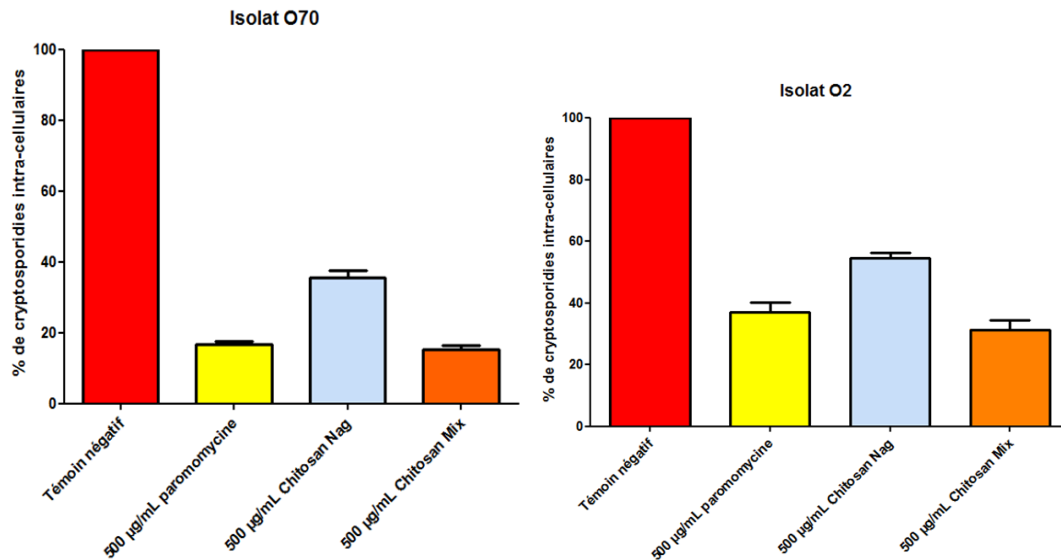
**Tableau 21 :** Taux de réduction des formes intracellulaires du parasite en pourcentage (%) sous l'effet des molécules chitosans et paromomycine

Lignées cellulaires	HCT-8			Caco-2	
	 %				
Isolats ovins	O2	O33	O70	O2	O70
Paromomycine	65	75	82	63	80
Moyenne	74			71.50	
Chitosan NAG	47	40	65	30	58
Moyenne	50.66			44	
Chitosan MIX	72	70	83	70	80
Moyenne	75			75	

Les deux composés de chitosans étaient efficaces dans la lignée HCT-8, mais le sulfate de paromocycine a montré plus d'efficacité que le chitosan NAG, alors que le chitosan Mix était le plus efficace des trois molécules (Figure 60). Dans le modèle Caco-2, le sulfate de paromomycine, le chitosane NAG et le chitosan Mix ont réduit les formes parasitaires intracellulaires. Une fois de plus le meilleur effet a été obtenu avec Chitosan Mix (Figure 61).



**Figure 60 :** Evaluation du potentiel « anti-cryptosporidien » des polysaccharides naturels (chitosans) sur les isolats ovins O2, O33 et O70 cultivés sur les cellules HCT8



**Figure 61** : Evaluation du potentiel « anti-cryptosporidien » des polysaccharides naturels (chitosans) sur les isolats ovins O2 et O70 cultivés sur Caco-2

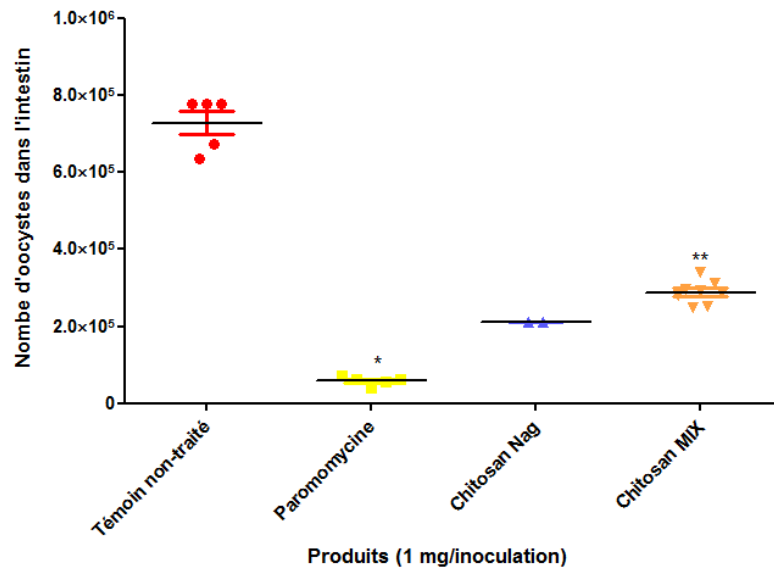
#### III.4. Estimation de l'infectiosité *in vivo*

L'infectiosité de l'isolat bovin testé (B29) a été estimée, le résultat a révélé la présence d'une moyenne de  $7,28 \times 10^5$  d'oocystes observés et quantifiés. Les parasites se sont reproduits dans l'intestin des souris. Leur nombre est passé de  $10^5$  d'oocystes inoculés par gavage au 5<sup>ème</sup> jour de leur vie à 7 fois plus d'oocystes ( $7,28 \times 10^5$ ) au 13<sup>ème</sup> jour à l'estimation du parasite dans le contenu intestinal (Figure 62).

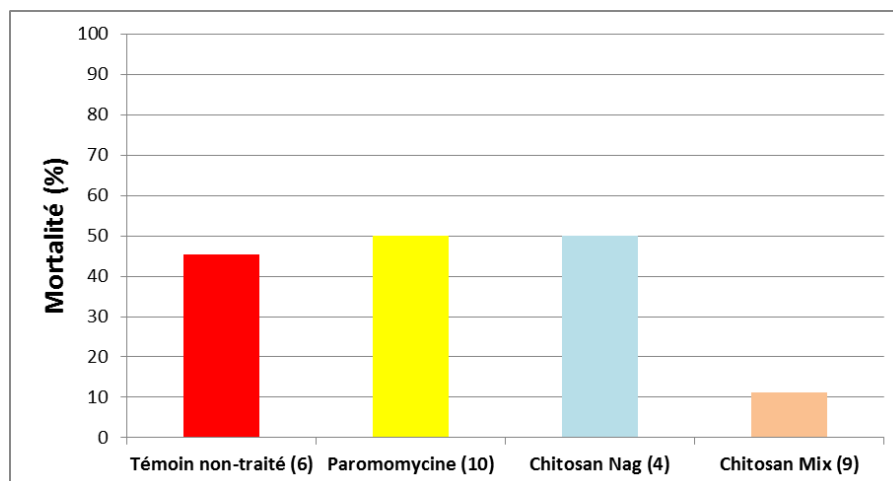
#### III.4. Evaluation *in vivo* du potentiel « anti-cryptosporidien » des polysaccharides et de la paromomycine

Un seul isolat bovin a été retenu pour cette expérience suite au critère d'infectiosité. Notre expérimentation *in vivo* visait à évaluer les effets du chitosan au pic de l'infection. Dans cette étude *in vivo*, toutes les souris inoculées avec des oocystes de *C. parvum* (isolat B29) à l'âge de 5 jours ont été infectées sans aucun symptôme de diarrhée, comme indiqué dans la littérature (Perrucci *et al*, 2006). Nos résultats ont montré dans cette première expérience, le traitement au sulfate de paromomycine réduisait les oocystes de l'intestin de  $7 \times 10^5$ , ce qui représentait une inhibition de l'infection de 93,33% par rapport aux témoins non traités infectés  $p < 0,05$ , sans observer d'effets négatifs sur les animaux. Cette observation a été aussi constatée pour le chitosan Mix, qui a réduit le nombre moyen d'oocystes intestinaux de  $4,7 \times 10^5$ , ce qui représente une inhibition de l'infection de 62,66% par rapport au témoin infecté non traité ( $p < 0,01$ ). Le chitosan NAG a réduit les oocystes du parasite de  $5 \times 10^5$ , ce qui représente une inhibition de l'infection de 66,66% par rapport au témoin infecté non traité mais le résultat était non significatif avec  $p > 0,05$ . Ceci peut être expliqué par le taux de

mortalité enregistré durant l'essai. En effet, le taux de mortalité était de 50% dans le lot chitosan NAG et la même observation était faite pour la paromomycine. Ce taux de mortalité a réduit le nombre d'animaux lors de l'expérience chitosan NAG à 2 souriceaux ce nombre réduit explique le résultat non significatif (Figure 63).



**Figure 62 :** Effet des chitosans et paromomycine sur l'isolat B29 dans le modèle *in vivo*.  
(\* P<0,05 ; \*\* P<0,01)



**Figure 63 :** Taux de mortalité de l'effectif des souriceaux durant l'essai *in vivo*

#### **IV. DISCUSSION**

Comme nous l'avons déjà mentionné, les essais d'infectiosité se basent sur des méthodes qui permettent *in vitro* ou *in vivo* d'évaluer l'infectiosité des microorganismes. L'infectiosité désigne la capacité d'un agent pathogène à produire une infection. *In vivo*, elle se détermine en quantifiant le nombre d'animaux développant l'infection pour une dose de pathogène donné (Benamrouz *et al.*, 2012). *In vitro*, elle se définit à partir du nombre de formes intracellulaires observés sur des cultures cellulaires par rapport à un témoin (King *et al.*, 2011).

Le choix des cellules hôtes pour la culture des cryptosporidies est un paramètre important pouvant influencer sur la croissance du parasite. Idéalement les cellules infectées par *Cryptosporidium* devraient permettre le développement complet du parasite et être morphologiquement et fonctionnellement aussi proche que possible des entérocytes (Favennec, 1997). Nous avons choisi deux modèles cellulaires avec les lignées HCT-8 et Caco-2.

Les cellules HCT-8 sont considérées comme relativement faciles à entretenir en culture et ont un temps de croissance rapide. Elles ont aussi la capacité d'adhérer aux surfaces de culture (plastique et verre) ce qui permet de réaliser des marquages pour la détection microscopique des parasites (Fayer, 2007). Une étude comparative de 11 lignées cellulaires réalisée par Upton et son équipe a démontré que les HCT-8 sont les meilleures cellules pour supporter le développement de *Cryptosporidium parvum* (Upton *et al.*, 1994). Cette lignée a permis la croissance de 2 fois plus de parasites que dans les autres lignées testées et le nombre de cellules parasitées était plus important. D'autre part, les Caco-2 se divisent assez lentement permettant ainsi de prolonger la culture plus longtemps même une fois que le tapis est confluent (Favennec, 1994).

En plus du choix de la lignée cellulaire et du milieu de culture, d'autres paramètres peuvent influencer, voir conditionner, le développement *in vitro* des cryptosporidies. Ces paramètres sont : l'âge des oocystes, la densité parasitaire de l'inoculum et la durée d'incubation (Arrowood, 2002).

La technique d'évaluation du développement intracellulaire du parasite pratiquée dans cette étude est la numération des formes intracellulaires par immunofluorescence après un marquage par un anticorps spécifique. Cette technique permet la détection des oocystes même

si leur charge est faible (de l'ordre  $10^2$  à  $10^4$  oocystes/puits) (Hijjawi *et al.*, 2001 ; Motta *et al.*, 2002 ; Mele *et al.*, 2003).

La numération a été réalisée sur 6 x 50 champs microscopiques aléatoires afin de balayer un maximum de surface du tapis cellulaire. En effet, le parasite s'y développe d'une manière hétérogène. Toutefois, ces résultats restent variables d'un opérateur à l'autre.

Les modèles utilisés ont été mis en place et validés avec *Cryptosporidium parvum* souche Iowa (souche de référence) au laboratoire de l'ANSES. Ces modèles nous ont permis de mettre en culture des isolats naturels de *Cryptosporidium parvum* bovins (B1, B13, B29) et ovin (O2, O33, O70). Ils se sont comportés en culture de manière plus importante de celle de la souche Iowa. Nous pensons que ce nombre des formes intracellulaire moins important est étroitement lié au délai de conservation de la souche Iowa qui a dépassé 6 mois. Alors que nos isolats utilisés lors de cette étude, ont été purifiés et mis en culture dans les 3 mois qui suivent leur collecte. Cette période est celle préconisée pour la culture des cryptosporidies car au-delà leur viabilité décroît rapidement (Hijjawi, 2010). En outre, les isolats B17, B11 ne semblent pas infectieux dans nos conditions expérimentales, alors qu'ils proviennent d'animaux atteints de cryptosporidiose. Cette différence pourrait être rapportée à la viabilité de nos isolats ou même à la virulence des sous-types. Cependant, l'isolat (O19) a cultivé avec un nombre de formes intracellulaires moins important que le reste des isolats sur les lignées utilisées. Néanmoins, cela reste à explorer avec d'autres conditions (délai de conservation, charge parasitaire initiale) car cet isolat appartient à l'espèce *C. ubiquitum*, un agent pathogène zoonotique émergent (Li *et al.*, 2014).

Par ailleurs, les approches *in vitro* de l'évaluation de l'infectiosité de *Cryptosporidium spp.* ne sont pas non plus dénuées d'inconvénients, un tapis cellulaire peut présenter une forte hétérogénéité, certains cellules étant plus âgées que d'autres et plus ou moins susceptibles à l'infection par le parasite (Fayer, 1997). Il existe également une limitation liée au dépôt des oocystes sur le tapis cellulaire ceci est en relation étroite avec la vitesse de sédimentation (Searcy *et al.*, 2005). Et seuls ceux à proximité d'une cellule cible auront une forte probabilité d'infection (King *et al.*, 2011).

Enfin, les conditions de culture et la méthode d'évaluation les plus adéquats aux isolats, d'origine bovine et ovine, retenus pour cette étude, ont permis de les mettre en culture et de comparer leur comportement *in vitro* (étude phénotypique). En plus, cela nous a aidé à choisir les isolats ovins et bovins afin d'évaluer les effets des produits anti-cryptosporidiens (chitosans et sulfate de paromomycine).

Le chitosan est un polymère biocompatible, biodégradable et non toxique, connu pour être un agent antimicrobien et antiparasitaire efficace (Kong *et al.*, 2010). Ces propriétés font de ce produit un candidat intéressant pour des applications «antiparasitaires». Dans la présente étude, les effets anti-cryptosporidiens du chitosan NAG et du chitosan Mix ont été étudiés *in vitro* et *in vivo*, par rapport au composé chimique, le sulfate de paromomycine. Cette dernière molécule est utilisée pour traiter la Cryptosporidiose chez les patients atteints du syndrome d'immunodéficience acquise. Elle est considérée comme la molécule de référence pour l'évaluation des composés anti-cryptosporidiens potentiels (Schupfner *et al.*, 2013) et a déjà été utilisé dans plusieurs études portant sur les effets anti-cryptosporidiens (Downey *et al.*, 2008 ; Asadpour *et al.*, 2017).

Les lignées cellulaires HCT-8 et Caco-2 ont été choisies dans le présent travail car elles se sont avérées d'excellents candidats pour la culture de *Cryptosporidium*, avec des taux d'infection élevés par les protozoaires (Karanis et Aldeyarbi, 2011).

La toxicité est une préoccupation constante lors des tests d'efficacité clinique de tout nouveau produit (Johnson *et al.*, 2000). Plusieurs auteurs ont signalé que le développement de nouveaux composés efficaces devait être arrêté en raison de leurs effets cytotoxiques indésirables.

La cytotoxicité des trois composés (sulfate de paromomycine, chitosan NAG et chitosan Mix) a été évaluée précédemment par l'équipe de recherche BIPAR-ANSES avant de tester leurs effets anti-cryptosporidiens en utilisant les mêmes lignées de cellules HCT-8 et Caco-2. Tous les produits avaient une très faible toxicité, avec une réduction de moins de 10% de la viabilité des cellules hôtes. Par conséquent, tous les composés étaient considérés comme non toxiques lorsqu'ils étaient utilisés à la dose optimale de 500 µg / ml (Mammeri *et al.*, 2018).

Des oocystes de 6 isolats de l'espèce *Cryptosporidium parvum* ont été utilisées dans la cette étude. Ces suspensions d'isolats provenaient de veaux et d'agneaux prélevés des élevages algériens. Comme décrit précédemment, dans les expériences de l'étude de l'infectiosité, ces isolats naturels ont été comptés par la méthode d'immunofluorescence, technique à visualiser facilement *Cryptosporidium*. Ceci est cohérent avec les données de la littérature (Boxell *et al.*, 2008 ; Hijjawi, 2010) qui considèrent l'immunofluorescence avec des marqueurs spécifiques, comme la technique la plus puissante car elle met facilement en évidence le *Cryptosporidium* présent dans les foyers d'infection des cellules hôtes. L'anticorps spécifique SPORO-Glo™, choisi dans cette étude, permettait une identification facile et fiable de toutes les étapes du cycle de vie, facilitant l'évaluation de l'efficacité de nouveaux composés thérapeutiques

(Boxell *et al.*, 2008). Le Chitosan NAG et le Chitosan Mix avaient tous deux un effet anti-cryptosporidien à 500 µg / ml dans les cellules HCT-8 et Caco-2 *in vitro*. Cependant, le pourcentage de réduction des parasites était plus marqué dans la lignée de cellules HCT-8. Comme signalé précédemment une étude comparant plusieurs lignées cellulaires a montré que les cellules HCT-8 sont les plus adaptées au développement du parasite (Upton *et al.*, 1994). L'effet de sulfate de paromomycine a été un peu plus efficace que le chitosan NAG dans HCT-8. En revanche, l'inverse s'est produit dans Caco-2. Comme évoqué ci-dessus, les deux composés de chitosan étaient efficaces sur les isolats naturels ovins, dans la lignée HCT-8, mais le sulfate de paromocycine a montré plus d'efficacité que le chitosan NAG. Alors que le chitosan Mix montre un meilleur effet par rapport autres molécules. Dans le modèle Caco-2, le sulfate de paromomycine, le chitosan NAG et le chitosan Mix ont réduit les formes parasitaires intracellulaires. De nouveau, le meilleur effet a été obtenu avec Chitosan Mix.

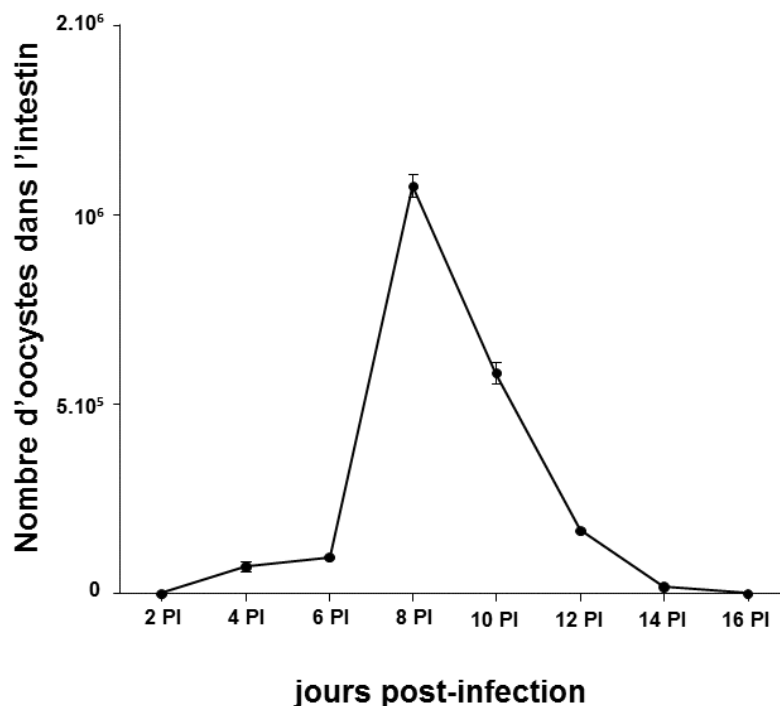
Cependant, Mammeri *et al.*, (2018) signalent dans leurs travaux en utilisant la souche de référence Iowa que l'effet de paromomycine était moins efficace que les chitosans. Par contre, ils indiquent que l'effet de chitosan Mix était le composé le plus efficace. Cette donnée est très proche de nos résultats.

La paromomycine, produit de référence, ainsi que le chitosan Mix et le monomère NAG ont montré des effets de réduction sur le nombre de parasites dans ces deux modèles de cellules. Une étude des relations « structure-activité » des différents chitosans pourrait indiquer le ou les groupes chimiques impliqués dans cette activité anti-cryptosporidienne.

En dehors que les cultures cellulaires soient un moyen de mise en culture et de détection facile à être utilisé, elles ne permettent pas des analyses en continu car les cellules doivent être tuées et fixées. Elles se révèlent inadaptées au criblage haut-débit. Cependant, un modèle animal offre un état physiologique complexe où de nombreux facteurs influencent l'effet des médicaments ; il est donc important de comprendre que le modèle *in vitro* de *C. parvum* présente des limites lorsqu'il imite une infection *in vivo*. Par conséquent, pour déterminer si les effets *in vitro* d'anti-cryptosporidiens sur *C. parvum* pouvaient être visibles chez les animaux, nous avons utilisé des souris CD-1, un modèle animal très sensible à l'infection à *C. parvum*. Ce modèle *in vivo* permettrait de vérifier cette découverte dans des conditions physiologiques réelles (glaise, mouvements péristaltiques, environnement gastro-intestinal...). Pour évaluer correctement les agents thérapeutiques ou préventifs testés, la cinétique de l'infection à la cryptosporidiose a été caractérisée à l'aide du modèle murin CD-1. La cinétique d'infection est influencée par de nombreux facteurs : la souche de souris allaitante, l'âge de



l'animal, la souche de *Cryptosporidium parvum* utilisée et son infectiosité, la dose infectieuse et les techniques utilisées pour détecter et quantifier le parasite (Finch *et al.*, 1993). De nombreuses techniques sont disponibles pour déterminer l'intensité de l'infection chez les souris néonatales, et les plus courantes utilisent un intestin homogénéisé complet (Finch *et al.*, 1993 ; Downey *et al.*, 2008 ; Klein *et al.*, 2008; Mirza-Qavami et Sadraei, 2011). L'intestin entier est analysé car les infections ne se propagent pas toujours uniformément dans l'intestin (Barrier *et al.*, 2006). Cependant, l'homogénéisation de l'intestin pourrait être responsable d'une perte d'environ 41% d'oocystes (Peeters *et al.*, 1989). Par conséquent, dans cette étude, les intestins ont été uniquement ouverts et leur contenu remis en suspension dans du PBS. Plusieurs techniques de sensibilité ou de spécificité variables peuvent également être utilisées pour dénombrer les oocystes et l'intensité de l'infection. Dans ce travail, nous avons utilisé la technique de diagnostic par microscopie à immunofluorescence qui présente à la fois une spécificité et une sensibilité excellentes (Chalmers *et al.*, 2011b). L'intensité de l'infection doit être connue afin d'évaluer de manière appropriée l'efficacité des agents « anti-cryptosporidiens ». Au pic de l'infection, les souris néonatales portaient 10 fois plus d'oocystes que la dose initiale d'inoculation orale (Figure 64).



**Figure 64 :**Caractérisation du modèle souriceaux CD-1 infecté par *C. parvum* (Souche Iowa, Waterborne, USA) (Mammeri et al, 2018).

En résumé, en accord avec de nombreux auteurs, ce modèle est simple et relativement peu coûteux (Finch *et al.*, 1993) et constitue un modèle *in vivo* utile pour évaluer les agents de prévention ou de traitement de l'infection à *C. parvum*.

Devant la molécule de référence la paromomycine qui est un antibiotique de la famille des aminoglycosides, produit par des *Streptomyces*, le chitosan NAG et chitosan Mix se sont révélés possédant une activité «anti-cryptosporidienne» dans un modèle *in vivo* de CD-1 néonatal en réduisant le niveau d'infection par rapport aux témoins infectés non traités. Cette étude a démontré l'innocuité de ces produits, car les animaux ne présentaient aucun effet toxique et étaient aussi sains que le groupe témoin non traité infecté. Par ailleurs, le chitosan aurait des effets «anti-coccidiens» chez des souris infectées par *Eimeria papillata*. En plus de réduire à la fois le nombre d'oocystes excrétés et de parasites au stade de développement, le chitosan a également démontré une activité anti-inflammatoire (Abdel-Latif *et al.*, 2016). En outre, le chitosan a été utilisé pour former un excipient dans un système de microparticules et pourrait jouer un rôle de barrière physique contre *Cryptosporidium parvum* (Blanco-García *et al.*, 2016). Lors de travaux récents il a été rapporté aussi que le chitosan améliorerait l'involution des glandes mammaires chez les bovins, réduisant ainsi le risque de mammite en activant les réponses immunitaires (Lancôt *et al.*, 2017). Le mécanisme d'action exact du chitosan demeure inconnu, mais il est possible que divers mécanismes provoquent des effets du chitosan sur les trophozoïtes et la production d'oocystes (effets directs sur la viabilité et / ou l'infectiosité du parasite et / ou la croissance du parasite dans l'intestin et / ou la formation d'oocystes). D'autres expériences sont nécessaires pour identifier les modes d'action spécifiques de ces composés.

La paromomycine a démontré son efficacité dans le traitement de la Cryptosporidiose chez un très grand nombre d'espèces y compris chez l'Homme. Elle est largement utilisée dans les pays étrangers chez les Ruminants et constitue la molécule de référence lors de l'évaluation de nouveaux composés anti-cryptosporidiens potentiels. Récemment la paromomycine a eu une AMM en Espagne et au Royaume-Uni pour traiter la Cryptosporidiose chez le veau.

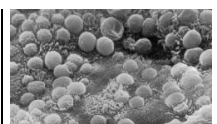
## V. CONCLUSION

En conclusion, Nous avons pu ainsi confirmer que notre modèle *in vitro* était sensible à des doses faibles de *C. parvum* (d'isolats naturels d'origine bovine et ovine). Il pourrait être utilisé pour évaluer la présence de ce protozoaire dans des échantillons environnementaux faiblement parasités. De plus, ce travail a permis de mettre en évidence le fort pouvoir infectieux de nos isolats de terrains provenant d'élevages de ruminants algériens. Aussi, cette

étude démontre clairement les propriétés anti-cryptosporidiennes du chitosan NAG et du chitosan mix à côté de la molécule de référence sulfate de paromomycine *in vitro* et *in vivo*. Ces résultats intéressants, encourageants et prometteurs ouvrent de nouvelles pistes dans la lutte contre la cryptosporidiose animale. Toutefois, de futures expériences et études sur le terrain seront nécessaires pour évaluer l'efficacité des chitosans chez les jeunes ruminants (veaux, agneaux et chevreaux).

## ***DISCUSSION GENERALE***

---



*Cryptosporidium* est un parasite protozoaire de l'homme et de l'animal avec une distribution mondiale. En Afrique, la Cryptosporidiose est courante chez l'homme et chez diverses espèces d'animaux domestiques et sauvages (Squire et Ryan, 2017).

Elle est à l'origine d'importantes pertes économiques chez les ruminants nouveau-nés de par la mortalité et la morbidité qu'elle entraîne (de Graaf *et al.*, 1999). De plus, son épidémiologie complexe (grand nombre d'espèces hôtes et nombreuses espèces de *Cryptosporidium*), la grande difficulté de traitement ou de prévention en l'absence de molécules véritablement efficaces et sa grande résistance dans le milieu extérieur rendent cette infection difficile à maîtriser.

L'utilisation d'outils de diagnostic moléculaire a considérablement amélioré notre compréhension de l'épidémiologie de la Cryptosporidiose. Cela a conduit à l'identification, d'une part, de différences majeures entre les sources d'infection à *Cryptosporidium spp.* chez l'homme entre pays en développement et pays industrialisés, et d'autre part des différences dans les présentations cliniques et la virulence entre les espèces de *Cryptosporidium* et le rôle de la recombinaison génétique dans l'émergence de sous-types de *C. hominis* et de *C. parvum* virulents et hyper transmissibles. Ces outils sont maintenant largement utilisés dans les enquêtes sur les épidémies et la surveillance de la Cryptosporidiose dans les pays industrialisés (Chalmers et Caccio, 2016 ; Hlavsa *et al.*, 2017). Avec l'introduction du séquençage du génome entier et de la génomique comparative dans la caractérisation de *Cryptosporidium* (Liu *et al.*, 2018), il est prévu que l'épidémiologie moléculaire de la Cryptosporidiose demeurera un domaine de recherche très actif. Malgré ces réalisations majeures, de nombreux défis restent à relever.

Les données disponibles concernant la présence de l'infection à *Cryptosporidium spp.* diffèrent selon les pays, les espèces hôtes, le statut clinique et l'âge des animaux. La stratégie de lutte contre ce parasite est encore méconnue dans le monde, encore les moyens de contrôle sont quasi absents dans nos pays en voie de développement. Nous avons donc voulu, au travers de ce travail, apporter des données originales pour l'Algérie sur la caractérisation de *Cryptosporidium spp.* chez les bovins et les ovins avec quatre objectifs principaux :

- Connaître le taux de l'infection par *Cryptosporidium spp.*, le niveau d'excrétion et les espèces excrétées par les bovins laitiers et ovins en fonction de l'âge et du statut clinique des animaux.

- Evaluer le potentiel zoonotique des isolats de *C. parvum* excrétés par les ruminants et étudier la diversité génétique de certains de ces isolats.
- Estimer l'infectiosité des isolats de terrain bovins et ovins *in vitro* et *in vivo*
- Evaluer le potentiel anti-cryptosporidien de certaines molécules de polysaccharides « chitosan » et le sulfate de paromomycine sur les isolats bovins et ovins.

Dans notre travail nous avons constaté, chez l'ovin, que le taux cumulé de l'infection par *Cryptosporidium spp* et les niveaux d'excrétion étaient beaucoup plus élevés chez les animaux âgés de moins de 1 mois (jusqu'à  $10^5$  opg) que chez les animaux âgés entre 1 mois et 3 mois. Cependant, chez le veau le niveau d'excrétion apparaît élevé (aussi jusqu'à  $10^6$ ) chez les animaux moins d'un mois et continue d'être élevé au-delà de cet âge. Cette situation peut avoir une relation avec le statut immunitaire. En effet, des études ont montré la présence d'anticorps spécifiques de *C. parvum* durant l'infection chez l'homme, les bovins et ovins (Ungar *et al.*, 1986 ; Hill *et al.*, 1990 ; Peeters *et al.*, 1992 ; Fayer et Xiao, 2007). En rapport avec l'immunité des jeunes veaux, il est connu qu'un bon transfert du colostrum était un facteur protecteur vis à vis de *Cryptosporidium spp* (Ralston *et al.*, 2003 ; Trotz-Williams *et al.*, 2008). Il a été rapporté que, chez des veaux maintenus isolés, une infection d'épreuve à *C. parvum* provoquait une diarrhée et une forte excrétion chez des animaux âgés de 1 semaine à 3 mois (Harp *et al.*, 1990).

Dans nos élevages, les veaux laitiers sont séparés très tôt des vaches, alors que les agneaux sont accompagnés des brebis durant toute leur vie. Ceci peut confirmer le statut immunitaire qui se présente plus performant chez l'espèce ovine. Les animaux au contact des mères après la naissance, présentaient un niveau bas d'excrétion après l'âge d'un mois. Cette observation est en accord avec l'étude de Kvác *et al.* (2006) qui montre que le type de logement des animaux pouvait avoir un effet sur l'infection par *Cryptosporidium spp*. Toutefois, d'autres études ont également montré que le système de management des animaux n'avait pas de réel effet sur l'infection par le parasite (Geurden *et al.*, 2007 ; Silverlås *et al.*, 2010b, Silverlås *et Blanco-Penedo*, 2012).

Par ailleurs, en Algérie le système extensif en élevage est en cause d'un mélange des animaux en pâturage et par conséquent de l'apparition des infections à différents âges chez les animaux. A ce stade, les mécanismes de contrôle du parasite peuvent être complexes selon les espèces hôtes et leur type d'élevage.

Lors de ce travail nous avons remarqué, que les agneaux et veaux laitiers diarrhéiques et non diarrhéiques, de moins d'un mois pouvaient excréter l'espèce *C. parvum* mais également d'autres espèces de *Cryptosporidium spp.* Notre travail vient compléter les données disponibles en Algérie concernant les espèces de *Cryptosporidium spp* excrétées par les ruminants (Ouchene *et al.*, 2016 ; Benhouda *et al.*, 2017 ; Baroudi *et al.*, 2017 ; Baroudi *et al.*, 2018 Ouakli *et al.*, 2018). Au cours de ce travail, nous avons constaté que plusieurs espèces de *Cryptosporidium spp* étaient excrétées par les ruminants domestiques en Algérie témoignant que *C. parvum* n'est pas la seule espèce à considérer en élevage. *C. parvum* est l'espèce la plus étudiée du fait que celle-ci soit en particulier responsable de diarrhée à la fois chez l'homme et l'animal. Il est donc légitime de s'interroger sur les performances (sensibilité et spécificité) des techniques de diagnostic utilisées à l'heure actuelle (et en particulier IF) à l'égard d'autres espèces que *C. parvum*. En effet, une étude réalisée par Agnamey *et al.*, (2011), a montré que la performance des kits avec l'immunofluorescence testés dépendait des espèces de *Cryptosporidium spp* isolées. Ces auteurs ont montré que la sensibilité des kits était plus faible pour la détection d'espèces autres que *C. parvum* ou *C. hominis*. Les résultats obtenus lors de ces travaux témoignent ainsi de l'importance de ne pas cibler les recherches uniquement sur l'espèce *C. parvum*.

Toutefois, nos observations sont en accord avec ce qui est décrit dans la littérature. Où cette espèce, agent étiologique majeur des diarrhées néonatales chez les ruminants, a été régulièrement rapportée chez les ovins et chez les veaux laitiers diarrhéiques ou non diarrhéiques (Fayer *et al.*, 2006 ; Geurden *et al.*, 2006, 2007, 2008 ; Feng *et al.*, 2007 ; Quílez *et al.*, 2008 ; Santín *et al.*, 2004-2008 ; Paraud *et al.*, 2009 ; Budu-Amoako *et al.*, 2012 ; Rahmouni *et al.*, 2014 ; Baroudi *et al.*, 2018 ; Ouakli *et al.*, 2018 ; Majeed *et al.*, 2018).

Lors de notre étude, l'identification de l'espèce *C. parvum* s'est révélée chez les agneaux diarrhéiques et un agneau seulement non diarrhéique. Les animaux étaient âgés de moins d'un mois mais la majorité avait 3 semaines. Toutefois, Baroudi *et al.*, 2018 ont mentionné la présence de *C. parvum* durant la 1<sup>ère</sup> et la deuxième semaine chez des agneaux tous diarrhéiques, comme ils ont indiqué l'absence de *C. ubiquitum*. En revanche, dans notre travail des agneaux diarrhéiques et non diarrhéiques étaient infectés par *C. ubiquitum*. Cette espèce a été majoritairement rapportée chez les ovins de tout âge dans le monde (Europe, Australie, Chine, USA, Kuwait) (Geurden *et al.*, 2008 ; Robertson *et al.*, 2010 ; Ryan *et al.*, 2005 ; Santín *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2010 ; Diaz *et al.*, 2018 ; Majeed *et al.*, 2018).

Pareillement, nos résultats ont montré deux espèces chez les bovins. Les veaux âgés de moins de 2 mois ont excrété les deux principales espèces de *Cryptosporidium* parasitant les jeunes bovins : *C. parvum* et *C. bovis*. Les animaux ont excrété majoritairement *C. parvum*. Cette espèce était présente chez les animaux diarrhéiques moins d'un mois (n =14) et des animaux diarrhéiques âgés de plus d'un mois (n =5). Par contre, Benhouda *et al.*, 2017 ont rapportés la présence de *C. parvum* dans l'Est du pays que chez les animaux moins d'un mois. A travers notre étude, nous avons observé que les veaux diarrhéiques et non-diarrhéiques, infectés par l'espèce *C. bovis* avaient entre deux semaines et un mois, des travaux antérieurs en Algérie ont indiqués que majoritairement les veaux de 1 à 2 mois étaient infectés par *C. bovis*. Néanmoins, ils ont signalé la présence de cette espèce chez les veaux entre 2 et 3 semaines (Benhouda *et al.*, 2017). Encore le système d'élevage induit des variations concernant la succession d'espèces de *Cryptosporidium spp.* en fonction de l'âge des animaux. Ceci concorde avec les données de systèmes de gestion moins intensifs (extensif) en Algérie et dans différentes parties du monde (Wang *et al.*, 2011 ; Budu-Amoako *et al.*, 2012 ; Benhouda *et al.*, 2017).

Le système d'élevage pourrait expliquer l'excrétion précoce chez les veaux de *C. bovis* espèces retrouvées plus tardivement chez les veaux laitiers (Santín *et al.*, 2008). Cette explication mérite cependant d'autres investigations car récemment, il a été montré que des veaux laitiers séparés à la naissance et d'autres restés en contact avec des veaux plus âgés (durant 3 jours) pouvaient excréter tôt, après la naissance, l'espèce *C. bovis* (Silverlås *et Blanco-Penedo*, 2012).

Les caractérisations génotypiques de l'espèce *C. parvum* réalisées chez les jeunes ruminants ont présenté des résultats originaux, avec la mise en évidence d'un potentiel zoonotique avec des sous-types zoonotiques de *C. parvum* (IIa et IIc) non décrits en Algérie. Toutefois, ils ont été détectés en Afrique dans certaines études menées en Égypte, en Éthiopie et en Tunisie (Essid *et al.*, 2008 ; Molloy *et al.*, 2010 ; Adamu *et al.*, 2014 ; 2015 ; Eibach *et al.*, 2015 ; Ojuomi *et al.*, 2016 ; Naghib *et al.*, 2018 Eibach *et al.*, 2015). Suite au séquençage des produits de l'amplification du gène Gp60 nos résultats ont révélé les sous-types identifiés pour la première fois sur le terrain algérien, à savoir, les sous-types IIcA16G1 (n=15/28), IIaA16G2R1 (8/28), IIaA21G2R1 (3/28), IIaA15G2R1 (1/28) et IIaA13G2R1 (n = 1/28). Parmi, ces sous-types le sous-type IIcA16G1 a été majoritairement retrouvé chez toutes les espèces hôtes de ruminants (veaux laitiers et ovins) chez des animaux diarrhéiques. Le sous-



type IIaA15G2R1 a déjà été décrit à plusieurs reprises chez les jeunes ruminants et l'homme, il est considéré comme le sous-type zoonotique le plus répandu de *C. parvum* (Strong *et al.*, 2000 ; Alves *et al.*, 2006 ; Peng *et al.*, 2003 ; Chalmers *et al.*, 2005 ; Feng *et al.*, 2007 ; Geurden *et al.*, 2008 ; Quílez *et al.*, 2008 ; Soba et Logar, 2008 ; Wielinga *et al.*, 2008 ; Díaz *et al.*, 2010 ; Rieux *et al.*, 2014 ; Naghib *et al.*, 2018 ; Mammeri *et al.*, 2019).

Par ailleurs, la souche IIaA15G2R1 de *C. parvum* isolée chez l'homme était responsable d'une Cryptosporidiose sévère chez le patient immunodéprimé et qu'elle était dotée d'un pouvoir tumorigène avec développement d'adénocarcinomes gastro-intestinaux ainsi que de cholangiocarcinomes chez un modèle murin (Benamrouz *et al.*, 2014). De plus, cette souche (IIaA15G2R1 de *C. parvum*) reconnue comme zoonotique a été identifiée comme étant à l'origine de plusieurs épidémies de cryptosporidiose humaine partout dans le monde (Chalmers *et al.*, 2011 ; Xiao 2010). Ceci devrait accentuer l'intérêt porté à cet agent infectieux auquel un grand nombre de personnes et d'animaux sont exposés.

Enfin, ces observations concernant les sous-types de *C. parvum* excrétés confirment ce qui a déjà été observé dans d'autres pays et suggèrent un rôle des jeunes ruminants dans la transmission d'isolats zoonotiques de *C. parvum* (Cacciò *et al.*, 2013). Au vu des niveaux d'excrétion en oocystes identifiés chez les jeunes ruminants infectés par *C. parvum* dans ce travail, il paraît donc essentiel d'une part de contrôler l'émission parasitaire dans l'environnement et d'autre part que le personnel travaillant en particulier au contact des animaux malades adopte des mesures de biosécurité (se laver souvent les mains, avoir des vêtements et chaussures spécifiques utilisés uniquement en élevage) afin d'éviter une éventuelle contamination par le parasite (ou sa transmission). En outre, il a été mentionné dans plusieurs pays africains une importance potentielle de la transmission anthroponotique dans l'épidémiologie de ce pathogène (Squire et Ryan, 2017 ; Naghib *et al.*, 2018).

La transmission zoonotique et/ou anthroponotique des parasites constitue une cause majeure de diarrhée qui représente une menace particulière pour les enfants des zones en développement et les personnes immunodéprimées. Les traitements curatifs et les vaccins font défaut, principalement en raison de l'absence d'un système de culture à long terme de ce parasite. Contrairement aux autres niveaux d'analyses, l'infectiosité ne se définit donc pas par rapport au parasite uniquement mais à partir de l'infection de cellules-hôtes, par une approche *in vitro* ou/et *in vivo*. Le modèle *in vivo* consiste à inoculer un animal susceptible et à surveiller la reproduction des oocystes. Dans la présente étude nous avons utilisé des souris

CD-1 nouveau-nées (Finch *et al.*, 1993). Cette méthode s'est révélée efficace (Delaunay *et al.*, 2000; Korich *et al.*, 2000; Matsue *et al.*, 2001; Noordeen *et al.*, 2002; Okhuysen *et al.*, 2002; Rochelle *et al.*, 2002), mais elle reste coûteuse à réaliser et que la plupart des laboratoires d'analyse ne disposent pas de colonies d'animaux. Ces épreuves sont généralement réservées à la recherche, pour évaluer l'efficacité d'un procédé de traitement ou désinfection, plutôt que d'être utilisées pour l'évaluation systématique de la viabilité et de l'infectiosité des oocystes. Par contre, l'infectiosité en culture cellulaire est une méthode *in vitro* qui permet d'évaluer à la fois la viabilité et l'infectiosité des microorganismes et vérifier la présence de *Cryptosporidium* en phase de reproduction. Depuis une vingtaine d'années, cette méthode a été employée pour estimer l'infectiosité des oocystes dans l'eau (Di Giovanni *et al.*, 1999; Hijjawi *et al.*, 2001; Weir *et al.*, 2001; Rochelle *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2005; Schets *et al.*, 2005; Coulliette *et al.*, 2006) et elle a donné des résultats semblables à ceux du modèle d'infectiosité pour les souris (Hijjawi *et al.*, 2001; Rochelle *et al.*, 2002; Slifko *et al.*, 2002). En effet, les cultures cellulaires offrent plusieurs avantages, la facilité d'exécution et la production rapide de résultats. Cette méthode permet de plus de conserver *in vitro* des oocystes du parasite pendant plusieurs jours, ce qui facilite les études de viabilité et d'immunothérapie (Hijjawi, 2010). D'autre part, il est possible de combiner la culture cellulaire à d'autres méthodes, y compris la PCR et l'IFA, pour évaluer la viabilité et l'infectiosité avec plus de précision. Néanmoins, certains tests d'immunofluorescence en culture cellulaire *in vitro* (HCT-8 et Caco-2) n'ont pas permis de déterminer l'infectivité du faible nombre d'oocystes de *Cryptosporidium* présents dans les échantillons d'eau contaminée naturellement (Schets *et al.*, 2005). Par contre la PCR à culture cellulaire intégrée (*cell culture PCR*) s'est révélée utile pour évaluer la contamination de l'environnement et pour estimer les risques (Joachim *et al.*, 2003 ; LeChevallier *et al.*, 2003 ; Masago *et al.*, 2004). L'association de la culture cellulaire, IFA et RT-PCR a l'avantage de donner lieu à moins de faux positifs (Johnson *et al.*, 2012). Bien que les épreuves d'infectiosité en culture cellulaire offrent plusieurs avantages, elles présentent également certains inconvénients, notamment la nécessité de maintenir une lignée cellulaire et une faible reproductibilité entre des échantillons semblables pour procéder à des évaluations quantitatives. De plus, nous ignorons à l'heure actuelle si toutes les espèces de *Cryptosporidium* peuvent être détectées à l'aide des méthodes de culture cellulaire qui existent actuellement ; il est toutefois prouvé que ces méthodes peuvent détecter les principaux génotypes qui infectent les humains, soit *C. parvum*, *C. hominis* et *C. meleagridis* (Rochelle *et al.*, 2012). Toutefois, les résultats obtenus dans nos

expériences montrent qu'une nouvelle espèce *C. ubiquitum* peut donner des formes intracellulaires sur HCT-8 et Caco-2. Malgré la faible infectiosité de cet isolat (O19) lié le plus au délai de conservation de l'échantillon. Ce résultat préliminaire reste une piste à explorer afin de confirmer si *C. ubiquitum* peut être détecté par culture cellulaire sachant que cette espèce porte aussi un aspect zoonotique (Li *et al.*, 2014).

La culture *in vitro* de *Cryptosporidium spp.* est un outil intéressant pour l'étude de la biologie du pathogène et le développement ou l'évaluation de traitements antiparasitaires. Toutefois, elle reste d'un intérêt limité en raison des faibles rendements obtenus ainsi que de l'impossibilité de culture continue. Le modèle animal se présente comme un moyen complémentaire voire comme une alternative à la culture *in vitro*, pour l'étude de l'infection par *Cryptosporidium spp.* et pour la propagation du parasite. Toutefois, la difficulté de cet outil est liée à la relative spécificité d'hôte de certaines espèces.

Cependant, la variabilité d'infectiosité des isolats naturels peut être liée en partie au sous-type chez l'espèce *C. parvum*. En effet, la virulence peut varier d'un sous-type à un autre. Nos résultats ont montré, une différence de l'effet des molécules sur les isolats par rapport au sous-type de l'espèce *C. parvum*. En effet, une diminution du parasite *C. parvum* sous-type IIdA16G1 était plus élevée que la réduction du sous-type IIaA16G2R1. A l'heure actuelle 25 facteurs génétiques sont identifiés chez *Cryptosporidium spp.* et sont impliqués au niveau du désenkystement, la mobilité des sporozoïtes sur les cellules hôtes, de leur attachement, de leur invasion, de la formation de la vacuole parasitophore, de la maintenance intracellulaire et des dommages causés à la cellule hôte (Bouزيد *et al.*, 2013). La diversité génétique est liée à ces facteurs dont la caractérisation demeure difficile. Toutefois, le comportement des sous-types et en relation avec la présence et l'expression de gènes codant les facteurs de virulence (Bouزيد *et al.*, 2013).

Lors des essais thérapeutiques, la paromomycine produit de référence ainsi que le chitosan Mix et le monomère NAG ont montré des effets de réduction sur le nombre de parasites dans les deux modèles *in vitro* et *in vivo*. Une étude des relations structure-activité des différents chitosans pourrait indiquer le ou les groupes chimiques impliqués dans cette activité anti-cryptosporidienne. La paromomycine a démontré son efficacité dans le traitement de la cryptosporidiose chez un très grand nombre d'espèces animales. Elle est largement utilisée dans de nombreux pays chez les Ruminants et constitue la molécule de référence lors de l'évaluation de nouveaux composés anti-cryptosporidiens potentiels. La recherche sur le

chitosan a été annoncée par des publications dans les années 1990 décrivant le potentiel antimicrobien du chitosan et de ses dérivés, qui présentent un large éventail d'activités visant les agents pathogènes en santé humaine et animale (Muzzarelli et al, 1990; No et al, 2002; Savard et al, 2002; Rabea et al, 2003).

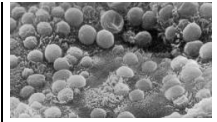
La chimiothérapie de la Cryptosporidiose reste un défi majeur. L'objectif principal de la chimiothérapie antiparasitaire moderne doit être d'amener le médicament aussi directement que possible au pathogène ciblé et de minimiser les effets secondaires potentiels. La chimie des médicaments ne peut à elle seule que fournir des réponses partielles. Néanmoins, les aspects biochimiques et physiopathologiques, entre autres, constitueront un facteur clé supplémentaire qui devra être examiné de près (Coombs et Mueller, 2002 ; Kayser et Kiderlen, 2003).

L'application d'approches moléculaires a permis des avancées significatives dans la connaissance de la répartition de *Cryptosporidium spp.* Cette analyse de la cryptosporidiose dans notre pays suggère que les ruminants pourraient jouer un rôle majeur dans la transmission de *Cryptosporidium spp.* à l'homme, avec une dominance de *Cryptosporidium parvum*, en particulier ses sous-types IId.

L'utilisation de génomes de *Cryptosporidium* a permis d'identifier des cibles thérapeutiques prometteuses et des médicaments sont en développement, mais les méthodes d'évaluation de l'efficacité *in vitro* et chez les animaux ne sont pas bien standardisées. Des méthodes améliorées de propagation et de manipulation génétique de l'organisme constitueraient des avancées significatives. En effet, beaucoup de travaux de recherche vont dans ce sens afin d'améliorer la connaissance de ce parasite et sa relation avec son hôte Li *et al.*, 2018 ; Miller *et al.* 2018).

## ***CONCLUSION GENERALE***

---



L'objectif de cette thèse était de fournir des informations sur la circulation et l'excrétion de *Cryptosporidium spp.* chez les ruminants. Nous avons également recherché des moyens de lutte et de traitement contre ces parasites. Dans ce cadre, il était nécessaire d'avoir à disposition des méthodes rapides, sensibles et spécifiques, de manière à détecter et quantifier la présence de ces pathogènes, mais également de caractériser leur état de viabilité ou d'infectiosité.

Ce travail réalisé en Algérie vient compléter les données disponibles dans le continent africain, et spécifiquement en Algérie sur la caractérisation moléculaire complexe de *Cryptosporidium spp.* chez les ruminants.

Nous avons apporté les premières données concernant l'infectiosité de *Cryptosporidium spp.*, isolats récoltés chez le bovin et l'ovin du terrain algérien.

Lors de ce travail nous avons tout d'abord confirmé les forts niveaux d'excrétion en oocystes de *Cryptosporidium spp.* chez les jeunes ruminants âgés de moins de 3 mois, veaux laitiers et ovins. Les niveaux d'excrétions variaient de  $10^2$  à  $10^6$  opg. Puis, nous avons mis en exergue l'estimation de l'infectiosité d'isolats parasitaires de terrain ainsi que l'évaluation de l'effet des molécules de paromomycine et polysaccharide (chitosans) sur ces isolats bovins et ovins.

Nous avons constaté que l'espèce *C. parvum* était excrétée par l'ensemble des espèces hôtes des ruminants bien que, d'autres espèces de *Cryptosporidium spp.* qui ont marqué une présence un peu différente aient également été excrétées. L'espèce *C. ubiquitum* a pu être identifiée chez des ovins et *C. bovis* chez les bovins.

Il nous a été impossible, dans une majorité des cas ovins surtout et aussi bovins, d'identifier les espèces excrétées par les ruminants, du fait d'une faible excrétion en oocystes.

Toutefois, nous avons également mis en évidence lors de ce travail que les ruminants pouvaient excréter des espèces zoonotiques de *Cryptosporidium spp.*, *C. parvum* et *C. ubiquitum* (ovin).

Pour la première fois, nous avons observé que les jeunes ruminants (veaux et agneaux) excrétaient des sous-types zoonotiques appartenant à la famille IIa et IIc de *C. parvum* non décrits en Algérie. Cependant, cette observation, confirme certaines données des travaux

antérieurs au niveau Algérien et dans d'autres pays et suggère un rôle potentiel des jeunes ruminants dans la transmission zoonotique d'isolats de *C. parvum*.

Par conséquent, l'étude de séquençage menée dans le but d'étudier la diversité génétique de *C. parvum* est la première à signaler la présence de sous-types IIAA21G2R1 et IIAA15G2R1 respectivement chez les agneaux et les veaux dans notre pays. Ce travail, confirme aussi la présence du sous type IIAA13G2R1 chez le mouton algérien, alors que ce sous-type était connu surtout chez les veaux.

La présence de sous-type zoonotique de famille IId est rapportée pour la première fois chez les animaux algériens. Le sous-type IIdA16G1 a été identifié chez les grands et les petits ruminants. En outre, ce sous-type est fréquent dans les pays voisins Tunisie et les pays Nord africains Egypte. Par conséquent, on peut penser à la source ou à l'origine du portage de ce type. En outre, dans la littérature il semble que cette famille pourrait être facilement transmise entre animaux et à l'homme.

Des études similaires, sur une plus grande échelle géographique, avec un plus grand nombre d'échantillons, sont nécessaires pour améliorer notre compréhension de la dynamique de transmission de la Cryptosporidiose chez les ruminants.

Enfin, un point essentiel souligné par nos travaux est que le taux de l'infection, les niveaux d'excrétion, les espèces de *Cryptosporidium spp*, sous-types de *C. parvum* excrétés, ainsi que, la clinique observée chez des jeunes ruminants (< 3 mois) peuvent largement évoluer d'une saison à l'autre et d'année à l'autre. Ceci met en évidence le caractère évolutif et la circulation complexe de *Cryptosporidium spp* en élevage et suggère une compétition interspécifique (voire entre génotypes) dans laquelle des facteurs liés au parasite, à l'hôte et à l'environnement peuvent interagir. Ces interactions restent largement inexplorées à ce jour.

*Cryptosporidium parvum* est un protozoaire responsable de diarrhée chez de nombreuses espèces vertébrées, y compris l'Homme. La cryptosporidiose est considérée comme une zoonose émergente. Très résistants dans le milieu extérieur, les oocystes représentent la forme infectieuse et de dissémination du parasite. Les ruminants constituent l'un des principaux réservoirs en contaminant l'environnement, l'eau et les aliments.

Aujourd'hui, les possibilités thérapeutiques sont réduites aussi bien chez l'Homme que chez l'animal. C'est pourquoi, la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques est plus que nécessaire. Nous rapportons ici l'adaptation d'une infection de deux modèles cellulaires (HCT-

8 et Caco-2) par *C. parvum* (isolats de terrain). Ceci nous a permis de réaliser des évaluations thérapeutiques de polysaccharides naturels (chitosans) avec la molécule de référence le sulfate de paromomycine.

A ce stade de l'étude, nous avons rapporté des données originales en relation avec l'effet « anti-cryptosporidien », établi et confirmé sur deux modèles *in vitro* et *in vivo*. Les lignées cellulaires HCT-8 et Caco-2 sont de bons modèles *in vitro* pour le criblage thérapeutique de première intention (rapidité, coût relativement faible). Le modèle *in vivo*, bien qu'il soit plus complexe et plus coûteux, vient compléter les données concernant les effets des molécules sur le parasite dans des conditions physiopathologiques plus complètes et naturelles. Ce travail a permis de montrer des résultats préliminaires sur la capacité inhibitrice du chitosan NAG, du chitosan Mix et de sulfate de paromomycine sur le développement *in vitro* et *in vivo* de *C. parvum* isolé chez les ruminants. Ces résultats sont très encourageants car ces produits naturels pourraient constituer une bonne alternative aux antibiotiques. D'autres études seront nécessaires pour confirmer ces effets inhibiteurs *in vivo* chez les jeunes ruminants.



### RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

Les recommandations à retenir est la pratique d'une bonne hygiène et l'utilisation d'eau chaude à 60 degrés pour nettoyer toutes les surfaces dans les bâtiments d'élevage des animaux.

Il serait intéressant d'élargir ce travail à des enquêtes épidémiologiques de plus grande envergure touchant toutes les régions du pays où les animaux sont en effectif important.

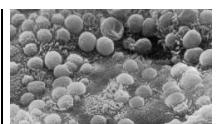
Des études similaires à celles réalisées chez les ovins et bovins pourraient être envisagées chez les caprins compte tenu du faible nombre de données disponibles en Algérie, concernant la prévalence de l'infection, les niveaux d'excrétion et les espèces de *Cryptosporidium* et les sous-types de *C. parvum* excrétés par cette espèce hôte.

Au vu des résultats obtenus dans ce travail concernant l'identification des espèces de *Cryptosporidium spp* excrétées par les ruminants, il pourrait être envisagé de poursuivre ces études en utilisant des outils permettant l'identification du parasite même lors de faible niveau d'excrétion. La PCR quantitative semble être un outil à développer. Une PCR quantitative utilisant des sondes spécifiques de *C. parvum* et une sonde spécifique du genre *Cryptosporidium*, permettant à la fois la quantification et le typage, pourrait être développée. Cette technique permettrait ainsi d'identifier les espèces excrétées et de quantifier la contamination de l'environnement même chez les adultes.

Tous ces éléments devraient accentuer l'intérêt porté à cet agent infectieux auquel un grand nombre de personnes et d'animaux sont exposés. Il reste cependant beaucoup de zones d'ombres quant aux processus et aux molécules par lesquels *C. parvum* agirait sur la cellule hôte. Ceci est d'autant plus complexe qu'il pourrait s'agir d'un processus multifactoriel. Afin de compléter ce travail, nous pourrions envisager, à court terme, d'explorer d'autres voies.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Abal-Fabeiro, J.L., Maside, X., Bello, X., Llovo, J., Bartolome, C., 2013.** Multilocus patterns of genetic variation across *Cryptosporidium* species suggest balancing selection at the gp60 locus. *Mol. Ecol.* 22, 4723-4732.
- Abdel-Latif, M., Abdel-Haleem, H.M., Abdel-Baki, A.-A.S., 2016.** Anticoccidial activities of Chitosan on *Eimeria papillata*-infected mice. *Parasitol. Res.* 115, 2845–2852.
- Abd El Kader, N. M., Blanco, M. A., Ali-Tammam, M., Abd El Ghaffar Ael, R., Osman, A., El Sheikh, N., Rubio, J. M., and de Fuentes, I. (2012).** Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* in human patients in Cairo, Egypt. *Parasitol Res* 110(1), 161-6.
- Abrahamsen, M.S., Templeton, T.J., Enomoto, S., Abrahante, J.E., Zhu, G., Lancto, C.A., Deng, M., Liu, C., Widmer, G., Tzipori, S., Buck, G.A., Xu, P., Bankier, A.T., Dear, V., 2004.** Complete genome sequence of apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science.* 304, 441-445.
- Abubakar, I., Aliyu, S.H., Arumugam, C., Usman, N.K., Hunter, P.R., 2007.** Treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised individuals: systematic review and meta-analysis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 63, 387-393.
- Adamu, H., Petros, B., Zhang, G., Kassa, H., Amer, S., Ye, J., Feng, Y., Xiao, L., 2014.** Distribution and clinical manifestations of *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV/AIDS patients in Ethiopia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2831.
- Adam, K Y., Ismail, A A., Masri, M A., and Gameel A A., 2019.** First report and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in humans and animals in Khartoum state, Sudan. *Veterinary World*, 12(1) : 183-189.
- Adjou, K., 2011.** Moins de cryptosporidies lors de vaccination contre les virus et bactéries. *Point Vét.*, 315, 56-59.
- Afssa, 2002.** Rapport sur les infections à protozoaires liées aux aliments et à l'eau: évaluation scientifique des risques associés à *Cryptosporidium* sp.
- Agnamey, P., Sarfati, C., Pinel, C., Rabodonirina, M., Kapel, N., Dutoit, E., Garnaud, C., Diouf, M., Garin, J.F., Totet, A., Derouin, F.; ANOFEL *Cryptosporidium* National Network. 2011.** Evaluation of four commercial rapid immunochromatographic assays for detection of *Cryptosporidium* antigens in stool samples: a blind multicenter trial. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1605-1607.
- Aguirre, S.A., Perryman, L.E., Davis, W.C., McGuire, T.C., 1998.** IL-4 protects adult C57BL/6 mice from prolonged *Cryptosporidium parvum* infection: analysis of CD4+alpha beta+IFN-gamma+and CD4+alpha beta+IL-4+ lymphocytes in gut-associated lymphoid tissue during resolution of infection. *J. Immunol.* 161, 1891-1900.
- Ahamed, I., Yadav, A., Katoch, R., Godara, R., Saleem, T. & Nisar, N.A. (2013).** Prevalence and analysis of associated risk factors for *Cryptosporidium* infection in lambs in Jammu district. *Journal of Parasitic Diseases* 39(3): 414- 417.
- Ahmed, S. A., El-Mahallawy H.S., Karanis, P., 2019.** Inhibitory activity of chitosan nanoparticles against *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Parasitol Res.*
- Akam A., Khelef D., Kaidi R., 2002.** Abdhussain maria S., Şuteu E., Cozma V. : Épidémiologie de la cryptosporidiose bovine dans une région de Mitidja de l'Algérie. *Scientia Parasitologica.* 2, 22-27.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Akam A., Lafri M., Khelef D., Kaidi R., Bouchene Z., Cozma V., Șuteu E., 2007. Cryptosporidiose bovine dans la région de la Mitidja (Algérie). *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj-Napoca Vet. Med.* **64**, 1-2.
- Akam A., khelef A., Kaidi r., Rahal k., Tali-maamar H., Mouffok F., Mekroud A., Chirilă F., 2009. Frequency of isolation of *Cryptosporidium* spp. F5 *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in eight calves dairy farms Mitidja (Algeria). *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj-Napoca Vet. Med.* **66**, 66-74.
- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe SI, Itoh N., (1987). Genistein, a Specific Inhibitor of Tyrosine-specific Protein Kinases. *J. Biol. Chem.*, **262** (12), 5592-5595.
- Allen, A.V.H., Ridley, D.S., 1970. Further observations on the formol ether concentration technique for faecal parasites. *J. Clin. Pathol.* **23**, 545-546.
- AL-Mathal EM, Alsalem AM., 2012. Pomegranate (*Punica granatum*) peel is effective in a murine model of experimental *Cryptosporidium parvum*. *Exp. Parasitol.*, **131**, 350–357.
- Almawly J., Prattley D., French NP., Lopez-Villalobos N., Hedgespeth B., Grinberg A., 2013. Utility of halofuginone lactate for the prevention of natural cryptosporidiosis of calves, in the presence of co-infection with rotavirus and *Salmonella typhimurium*. *Vet. Parasitol.*, In press.
- Alvarez-Pellitero, P., Sitjà-Bobadilla, A., 2002. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *Int. J. Parasitol.* **32**, 1007-1021.
- Alvarez-Pellitero, P., Quiroga, M.I., Sitjà-Bobadilla, A., Redondo, M.J., Palenzuela, O., Padrós, F., Vázquez, S., Nieto, J.M., 2004. *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Dis. aquat. Organ.* **62**, 133-145.
- Alves, M., Xiao, L., Sulaiman, I., Lal, A.A., Matos, O., Antunes, F., 2003. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 2744-2777.
- Alves, M., Xiao, L., Antunes, F., Matos, O., 2006. Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. *Parasitol. Res.* **99**, 287-292.
- Alyousefi, N. A., Mahdy, M. A., Lim, Y. A., Xiao, L., and Mahmud, R. 2013. First molecular characterization of *Cryptosporidium* in Yemen. *Parasitology* **140**(6), 729-34.
- Amer S, Honma H, Ikarashi M, Tada C, Fukuda Y, Suyama Y, Nakai Y. 2010. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in dairy calves in Egypt. *Veterinary Parasitology*, **169**, 382–386.
- Anim-Baidoo I, Narh C, Obiri D, Ewerenonu-Laryea C, Donkor ES, Adjei DN, et al., 2015. Cryptosporidial diarrhoea in children at a paediatric hospital in Accra, Ghana. *Int J Trop Dis Health.* **10**(3):1–13.
- Anderson BC., 1987. Abomassal cryptosporidiosis in cattle. *Vet Parasitol.* **24**:235-8.
- Anderson BC., 1998. Cryptosporidiosis in bovine and human health. *J Dairy Sci.* (81) 3038-3041.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- ANOFEL Cryptosporidium National Network, 2010.** Laboratory-based surveillance for *Cryptosporidium* in France, 2006-2009. *Euro Surveill.* 19, 19642.
- Appelbee, A.J., Thompson, R.C.A., Olson, M.E., 2005.** *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife: current status and future needs. *Trends. Parasitol.* 21, 370-376.
- Areeshi, M., Dove, W., Papaventsis, D., Gatei, W., Combe, P., Grosjean, P., Leatherbarrow, H., Hart, C.A., 2008.** *Cryptosporidium* species causing acute diarrhea in children in Antananarivo, Madagascar. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 102, 309-315.
- Armson A., Meloni BP., Reynoldson JA., Thompson RA., 1999.** Assessment of drugs against *Cryptosporidium parvum* using a simple in vitro screening method. *FEMS Microbiology Letters*, **178**, 227-233.
- Arrowood, M.J., Sterling, C.R., 1989.** Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1490-1495.
- Arrowood, M.J., 2002.** In vitro cultivation of *Cryptosporidium* species. *Clinical Microbiology Reviews* 15, 390-400.
- Asadpour M., 2017.** Efficacité comparative de la curcumine et de la paromomycine contre l'infection à *Cryptosporidium parvum* dans un modèle BALB / c. *Veterinary Parasitology* , 250 .
- Asadpour M., 2018.** Curcumin: A promising treatment for *Cryptosporidium parvum* infection in immunosuppressed BALB/c mice. *Experimental Parasitology*, 195.
- Atwill ER., Johnson E., Klingborg DJ., Vesperat GM., Markegard G., Jensen WA., Pratt DW., Delmas RE., George HA., Forero LC., Philips RL., Barry SJ., McDougald NK., Gildersleeve RR., 1999.** Frost WE Age, geographic and temporal distribution of fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cow-calf herds. *Am J Vet Res.* 60(4)420-425.
- Auray, G., Lacroix-Lamande, S., Mancassola, R., Dimier-Poisson, I., Laurent, F., 2007.** Involvement of intestinal epithelial cells in dendritic cell recruitment during *C. parvum* infection. *Microbes Infect.* 9, 574-582.
- Azzam-Bouchek Z., 1992.** Premiers cas de cryptosporidiose humaine rapportés en Algérie. *Bull. Société Pathol. Exot.* **85**, 170-170.
- Baishanbo A, Gargala G, Delaunay A, et al., (2005).** Infectivity of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* genotype 2 isolates in immunosuppressed Mongolian gerbils. *Infection and immunity*, 73(8), 5252-5.
- Baishanbo A, Gargala G, Duclos C, et al., (2006).** Efficacy of nitazoxanide and paromomycin in biliary tract cryptosporidiosis in an immunosuppressed gerbil model. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 57(2), 353-5.
- Ballweber, L.R., Xiao, L., Bowman, D.D., Kahn, G., Cama, V.A., 2010.** Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends Parasitol.* 26, 180-189.
- Bamaiyi, P.H., Redhuan, N.E.M., 2016.** Prevalence and risk factors for cryptosporidiosis: a global, emerging, neglected zoonosis. *Asian Biomed.* 10, 309-325.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Barnes, D.A., Bonnin, A., Huang, J.X., Gousset, L., Wu, J., Gut, J., Doyle, P., Dubremetz, J.F., Ward, H., Petersen, C., 1998. A novel multi-domain mucin-like glycoprotein of *Cryptosporidium parvum* mediates invasion. *Mol Biochem Parasitol* 96, 93-110.
- Baroudi D., Khelef D., Goucem R., Adjou K., Bendali F., Xiao L., 2011. Cryptosporidiosis of kids in some sheepfolds in the region of Algiers. *Rencontres Recherches Ruminants.*, 2011, Paris, France.
- Baroudi D., Khelef D., Goucem R., Adamu H., Zhang H., Xiao L., 2012. Molecular identification of *Cryptosporidium* in kid goats in some farms of the region of Algiers. *Rencontres Recherches Ruminants*. Paris, France.
- Baroudi D., Khelef D., Goucem R., Adjou K.T., Adamu H., Zhang H., Xiao L., 2013. Common occurrence of zoonotic pathogen *Cryptosporidium meleagridis* in broiler chickens and turkeys in Algeria. *Vet. Parasitol.* 196, 334-340.
- Baroudi, D., Khelef, D., Hakem, A., Abdelaziz, A., Chen, X., Lysen, C., Roellig, D., Xiao, L., 2017. Molecular characterization of zoonotic pathogens *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in calves in Algeria. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* 8, 66–69.
- Baroudi, D., Hakem, A., Adamu, H., Amer, S., Khelef, D., Adjou, K., Dahmani, H., Chen, X., Roellig, D., Feng, Y., Xiao, L., 2018. Zoonotic *Cryptosporidium* species and subtypes in lambs and goat kids in Algeria. *Parasit. Vectors* 11 (582).
- Baroudi D., Zhang H., Amer S., Khelef D., Roellig D.M., Wang Y., Feng Y., Xiao L., 2018. Divergent *Cryptosporidium parvum* subtype and *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in dromedary camels in Algeria. *Parasitol. Res.*, 117, 905-910.
- Barrier, M., Lacroix-Lamandé, S., Mancassola, R., Auray, G., Bernardet, N., Chaussé, A.-M., Uematsu, S., Akira, S., Laurent, F., 2006. Oral and intraperitoneal administration of phosphorothioate oligodeoxynucleotides leads to control of *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal mice. *J. Infect. Dis.* 193, 1400–1407.
- Barta J.R., Thompson R.C.A., 2006. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities, *Trends in Parasitology*, 22, 10, 463-468.
- Baydoun, Sadia Benamrouz Vanneste, Colette Creusy, Karine Guyot, Nausicaa Gantois, Magali Chabe, Baptiste Delaire, Anthony Mouray, Atallah Baydoun, Gerard Forzy, Vincent Chieux, Pierre Gosset, Vincent Senez, Eric Viscogliosi, Jérôme Follet & Gabriela Certad., 2017. Three-dimensional (3D) culture of adult murine colon as an *in vitro* model of cryptosporidiosis: *Proof of concept*. *Scientific Reports*. (7), 17288.
- Becher, K.A., Robertson, I.D., Fraser, D.M., Palmer, D.G., Thompson, R.C., 2004. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. *Vet. Parasitol.* 123, 1-9.
- Benamrouz, S., Guyot, K., Gazzola, S., Mouray, A., Chassat, T., Delaire, B., Chabe, M., Gosset, P., Viscogliosi, E., Dei-Cas, E., Creusy, C., Conseil, V., and Certad, G., 2012. *Cryptosporidium parvum* infection in SCID mice infected with only one oocyst: qPCR assessment of parasite replication in tissues and development of digestive cancer. *PLoS One* 7(12), e51232.
- Benamrouz, S., Conseil, V., Chabe, M., Praet, M., Audebert, C., Blervaque, R., Guyot, K., Gazzola, S., Mouray, A., Chassat, T., Delaire, B., Goetinck, N., Gantois, N., Osman, M., Slomianny, C., Dehennaut, V., Lefebvre, T., Viscogliosi, E., Cuvelier, C., Dei-Cas, E., Creusy, C.,

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- and Certad, G., 2014.** *Cryptosporidium parvum*-induced ileo-caecal adenocarcinoma and Wnt signaling in a mouse model. *Dis Model Mech* 7(6), 693-700.
- Benhouda, D., Hakem, A., Sannella, A.R., Benhouda, A., Cacciò, S.M., 2017.** First molecular investigation of *Cryptosporidium* spp. in young calves in Algeria. *Parasite Paris Fr.* 24, 15.
- Benitez A, Priest JW, Ehigiator HN, McNair N, Mead JR., 2011.** Evaluation of DNA encoding acidic ribosomal protein P2 of *Cryptosporidium parvum* as a potential vaccine candidate for cryptosporidiosis. *Vaccine*, **29** (49), 9239–9245.
- Benouis A., Bekkouche Z., Benmansour Z., 2013.** Epidemiological study of human intestinal parasitosis in the Hospital of Oran (Algeria). *Int. J. Innov. Appl. Stud.* **2**, 613-620.
- Bern, C., Hernandez, B., Lopez, M.B., Arrowood, M.J., De Merida, A.M., Klein, R.E., 2000.** The contrasting epidemiology of Cyclospora and Cryptosporidium among outpatients in Guatemala. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 63, 231-235.
- Bhat, S.A., Dixit, M., Juyal, P.D., Singh, N.K., 2014.** Comparison of nested PCR and microscopy for the detection of cryptosporidiosis in bovine calves. *J. Parasit. Dis. Off. Organ Indian Soc. Parasitol.* 38, 101–105.
- Bialek, R., Binder, N., Dietz, K., Joachim, A., Knobloch, J., Zelck, U.E., 2002.** Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 43, 283-288.
- Bjorkman, C., Lindstrom, L., Oweson, C., Ahola, H., Troell, K., Axen, C., 2015.** *Cryptosporidium* infections in suckler herd beef calves. *Parasitology* 142, 1108–1114.
- Blagburn BL, Drain KL, Land TM, Kinard RG, Hutton Moore P, Lindsay DS et al. (1998).** Comparative Efficacy Evaluation of Dicationic Carbazole Compounds, Nitazoxanide, and Paromomycin against *Cryptosporidium parvum* Infections in a Neonatal Mouse Model. *Antimicrob. Agents Ch.*, **42** (11), 2877–2882.
- Blanco-García, E., Guerrero-Callejas, F., Blanco-Méndez, J., Gómez-Couso, H., LuzardoÁlvarez, A., 2016.** Development of particulate drug formulation against *C. parvum*: formulation, characterization and in vivo efficacy. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 92, 74–85.
- Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., van der Noordaa, J., 1990.** Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495-503.
- Bonatti, H., Barroso, DR., Sawyer, R.G., Kotton, C.N., Sifri, C.D., 2012.** *Cryptosporidium* enteritis in solid organ transplant recipients: multicenter retrospective evaluation of 10 cases reveals an association with elevated tacrolimus concentrations. *Transpl. Infect. Dis.*, (14) 635-648
- Bornay-Llinares, F.J., da Silva, A.J., Moura, I.N., Myjak, P., Pietkiewicz, H., KruminisLozowska, W., Graczyk, T.K., Pieniazek, N.J., 1999.** Identification of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1455–1458.
- Borowski, H., Thompson, R.C., Armstrong, T., Clode, P.L., 2010.** Morphological characterization of *Cryptosporidium parvum* life-cycle stages in an in vitro model system. *Parasitology* 137, 13–26.
- Boulter-Bitzer JI., Lee H., Trevors JT., 2007.** Molecular targets for detection and immunotherapy in *Cryptosporidium parvum*. *Biotechnol. Adv.*, **25**, 13–44.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Boussenna, S., Sfaksi, A., 2009.** Incidence et étiologie des diarrhées néonatales du veau nouveau-né dans l'est Algérien. *Sci. Technol.*, 2009, **30**, 16-21.
- Bouزيد, M., Hunter, P.R., Chalmers, R., Tyler, K.M., 2013.** Cryptosporidium pathogenicity and virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 115-134.
- Boxell, A., Hijjawi, N., Monis, P., Ryan, U., 2008.** Comparison of various staining methods for the detection of Cryptosporidium in cell-free culture. *Exp. Parasitol.* 120, 67–72.
- Brook, E.J., Christley, R.M., French, N.P., Hart, C.A., 2007.** Detection of Cryptosporidium oocysts in fresh and frozen cattle faeces: comparison of three methods. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 26-31.
- Brook, E.J., Anthony Hart, C., French, N.P., Christley, R.M., 2009.** Molecular epidemiology of Cryptosporidium subtypes in cattle in England. *Vet. J.* 179, 378-382.
- Budu-Amoako, E., Greenwood, S.J., Dixon, B.R., Barkema, H.W., McClure, J.T., 2012.** Occurrence of Cryptosporidium and Giardia on beef farms and water sources within the vicinity of the farms on Prince Edward Island, Canada. *Vet. Parasitol.* 184, 1-9.
- Burnet, J.B., Ogorzaly, L., Tissier, A., Penny, C., Cauchie, H.M., 2013.** Novel quantitative TaqMan real-time PCR assays for detection of Cryptosporidium at the genus level and genotyping of major human and cattle-infecting species. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1211-1222.
- Cacciò, S.M., Thompson, R.C.A., McLauchlin, J., Smith, H.V., 2005.** Unravelling Cryptosporidium and Giardia epidemiology. *Trends Parasitol.* 21, 430–437.
- Cacciò, S.M., Pozio, E., 2006.** Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 4, 429-443.
- Cacciò, S.M., Sannella, A.R., Mariano, V., Valentini, S., Berti, F., Tosini, F., Pozio, E., 2013.** A rare Cryptosporidium parvum genotype associated with infection of lambs and zoonotic transmission in Italy. *Vet. Parasitol.* 191, 128-131.
- Cai, M., Guo, Y., Pan, B., Li, N., Wang, X., Tang, C., Feng, Y., Xiao, L., 2017.** Longitudinal monitoring of *Cryptosporidium* species in pre-weaned dairy calves on five farms in Shanghai, China. *Vet. Parasitol.* 241, 14–19.
- Cama, V.A., Arrowood, M.J., Ortega, Y.R., Xiao, L., 2006.** Molecular characterization of the Cryptosporidium parvum Iowa isolate kept in different laboratories. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53 (Suppl. 1), S40–S42.
- Cama, V., Gilman, R.H., Vivar, A., Ticona, E., Ortega, Y., Bern, C., Xiao, L., 2006.** Mixed Cryptosporidium infections and HIV. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1025-1028.
- Cama, V.A., Ross, J.M., Crawford, S., Kawai, V., Chavez-Valdez, R., Vargas, D., Vivar, A., Ticona, E., Navincopa, M., Williamson, J., Ortega, Y., Gilman, R.H., Bern, C., Xiao, L., 2007.** Differences in clinical manifestations among Cryptosporidium species and subtypes in HIV-infected persons. *J. Infect. Dis.* 196, 684-691.
- Cama, V. A., Bern, C., Roberts, J., Cabrera, L., Sterling, C. R., Ortega, Y., Gilman, R. H., and Xiao, L., 2008.** *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerg Infect Dis* 14(10), 1567-74.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Cama, L., Cabrera, L., Lopera, C., Vargas, M., Taquiri, C., Smit, H., Xiao, L., 2008.** Molecular characterization of Cryptosporidium and Microsporidia from goats and sheep in Peru. X International Workshops on Opportunistic Protists, May 28-31, 2008, Boston, p. 27.
- Carreno, R.A., Martin, D.S., Barta, J.R., 1999.** Cryptosporidium is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol. Res.* 85, 899-904.
- Casadevall, A., and Pirofski, L., 2001.** Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis* 184(3), 337-44.
- Casemore, D.P., Armstrong, M., Sands, R.L., 1985.** Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *J. Clin. Pathol.* 38, 1337-1341.
- Casemore, D.P., 1991.** Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. Broadsheet 128. *J. Clin. Pathol.* 44, 445-451.
- Casemore, D. P., Wright, S. E., and Coop, R. L., 1997.** Cryptosporidiosis-human and animal epidemiology. In "*Cryptosporidium* and cryptosporidiosis" (R. Fayer, Ed.). CRC Press, Boca Raton.
- Castellanos-Gonzalez, A., Cabada, M.M., Nichols, J., Gomez, G., White, A.C., 2013.** Human Primary Intestinal Epithelial Cells as an Improved In vitro Model for *Cryptosporidium parvum* Infection. *Infect. Immun.* 81, 1996-2001.
- Castro IC., Oliveira BB., Slowikowski JJ., Coutinho BP., Siqueira FJ., Costa IB., 2012.** Arginine decreases *Cryptosporidium parvum* infection in undernourished suckling mice involving nitric oxide synthase and arginase. *Nutrition*, 28, 678-685.
- Castro-Hermida, J.A., González-Losada, Y.A., Ares-Mazás, E., 2002a.** Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). *Vet. Parasitol.* 30, 1-10.
- Castro-Hermida JA., Yolanda A., González-Losada YA., Mercedes M-M., Ares-Mazàs E., 2002b.** A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. *Vet Parasitol.* (106) 7-11.
- Castro-Hermida, J.A., Pors, I., Otero-Espinar, F., Luzardo-Alvarez, A., Ares-Mazás, E., Chartier, C., 2004.** Efficacy of alpha-cyclodextrin against experimental cryptosporidiosis in neonatal goats. *Vet. Parasitol.* 120, 35-41.
- Castro-Hermida, J. A., Pors, I., Poupin, B., Ares-Mazás, E., Chartier, C., 2005 a.** Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* infections in goat kids in western France. *Small. Rumin. Res.* 56, 259-264.
- Castro-Hermida, J.A., Delafosse, A., Pors, I., Ares-Mazás, E., Chartier, C., 2005 b.** *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* infections in adult goats and their implications for neonatal kids. *Vet. Rec.* 157, 623-627
- Castro-Hermida, J.A., Almeida, A., González-Warleta, M., Correia da Costa, J., 2007 a.** Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. *Parasitol. Res.* 101, 1443-1448.
- Castro-Hermida, J.A., González-Warleta, M., Mezo, M., 2007 b.** Natural infection by *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in sheep and goats in Galicia (NW Spain). *Small. Rumin. Res.* 72, 96-100.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Causapé, A.C., Quílez, J., Sánchez-Acedo, C., del Cacho, E., López-Bernad, F., 2002. Prevalence and analysis of potential risk factors for *Cryptosporidium parvum* infection in lambs in Zaragoza (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* 104, 287–298.
- Certad, G., Ngouanesavanh, T., Guyot, K., Gantois, N., Chassat, T., Mouray, A., Fleurisse, L., Pinon, A., Cailliez, J. C., Dei-Cas, E., and Creusy, C. 2007. *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma. *Infect Agent Cancer* 2, 22
- Certad, G., Creusy, C., Guyot, K., Mouray, A., Chassat, T., Delaire, B., Pinon, A., Sitja-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P., Praet, M., Cuvelier, C., and Dei-Cas, E. 2010. Fulminant cryptosporidiosis associated with digestive adenocarcinoma in SCID mice infected with *Cryptosporidium parvum* TUM1 strain. *Int J Parasitol* 40(13), 1469-75.
- Certad, G., Benamrouz, S., Guyot, K., Mouray, A., Chassat, T., Flament, N., Delhaes, L., Coiteux, V., Delaire, B., Praet, M., Cuvelier, C., Gosset, P., Dei-Cas, E., Creusy, C., 2012. Fulminant cryptosporidiosis after near-drowning: a human *Cryptosporidium parvum* strain implicated in invasive gastrointestinal adenocarcinoma and cholangiocarcinoma in an experimental model. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1746-1751.
- Cevallos, A.M., Zhang, X., Waldor, M.K., Jaisson, S., Zhou, X., Tzipori, S., Neutra, M.R., Ward, H.D., 2000. Molecular cloning and expression of a gene encoding *Cryptosporidium parvum* glycoproteins gp40 and gp15. *Infect. Immun.* 68, 4108-4116.
- Chalmers, R.M., Elwin, K., Reilly, W.J., Irvine, H., Thomas, A.L., Hunter, P.R., 2002. *Cryptosporidium* in farmed animals: the detection of a novel isolate in sheep. *Int. J. Parasitol.* 32, 21-26.
- Chalmers, R. M., 2003. *Cryptosporidium* as a public health challenge In "*Cryptosporidium* from molecules to disease" (R. C. A. Thompson, A. Armson, and U. M. Morgan-Ryan, Eds.). Elsevier, Amsterdam.
- Chalmers, R.M., Ferguson, C., Cacciò, S., Gasser, R.B., Abs El-Osta, Y.G., Heijnen, L., Xiao, L., Elwin, K., Hadfield, S., Sinclair, M., Stevens, M., 2005. Direct comparison of selected methods for genetic categorisation of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species. *Int. J. Parasitol.* 35, 397-410.
- Chalmers, R.M., Davies, A.P., 2010. Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Exp. Parasitol.* 124, 138-146
- Chalmers, R.M., Giles, M., 2010. Zoonotic cryptosporidiosis in the UK-challenge for control. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1487-1497.
- Chalmers, R.M., Elwin, K., Hadfield, S.J., Robinson, G., 2011 a. Sporadic human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium cuniculus*, United Kingdom, 2007-2008. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 536-538.
- Chalmers, R.M., Campbell, B.M., Crouch, N., Charlett, A., Davies, A.P., 2011 b. Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven *Cryptosporidium* assays used in the UK. *J. Med. Microbiol.* 60, 1598-1604.
- Chalmers, R.M., and Katzer, F., 2013. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends. Parasitol.* 29, 237-251.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Chalmers, R.M., and Caccio, S., 2016.** Towards a consensus on genotyping schemes for surveillance and outbreak investigations of *Cryptosporidium*, Berlin, June 2016. *Euro Surveill.* 2016 Sep 15; 21(37): 30338.
- Chappell, C.L., Okhuysen, P.C., Langer-Curry, R., Widmer, G., Akiyoshi, D.E., Tanriverdi, S., Tzipori, S., 2006.** *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 851-857.
- Chartier, C., Mallereau, M.P., Naciri, M., 1996.** Prophylaxis using paromomycin of natural cryptosporidial infection in neonatal kids. *Prev. Vet. Med.* 25, 357-361.
- Chartier, C., 2002.** La cryptosporidiose des petits ruminants. Le point vétérinaire, n° spécial, Pathologie ovine et caprine, 118-122.
- Chartier, C., Mallereau-Pellet, M.P., Mancassola, R., Nussbaum, D., 2002.** Detection of *Cryptosporidium* oocysts from goat kid faeces: Comparison of a latex agglutination test with three
- Chartier, C., Paraud, C., 2010.** La cryptosporidiose des ruminants. Bulletin des GTV, n° 52 Février 2010.
- Chartier, C., Rieux, A., Delafosse, A., Lehebel, A., Paraud, C., 2013.** Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fresh calf faeces: characteristics of two simple tests and evaluation for a semi-quantitative approach. *Vet. J.*
- Chen, W., Harp, J.A., Harmsen, A.G., Havell, E.A., 1993 a.** Gamma interferon functions in resistance to *Cryptosporidium parvum* infection in severe combined immunodeficient mice. *Infect. Immun.* 61, 3548-3551.
- Chen, W., Harp, J.A., Harmsen, A.G., 1993 b.** Requirements for CD4+ cells and gamma interferon in resolution of established *Cryptosporidium parvum* infection in mice. *Infect. Immun.* 61, 3928-3932.
- Chen, X.M., Gores, G.J., Paya, C.V., LaRusso, N.F., 1999.** *Cryptosporidium parvum* induces apoptosis in biliary epithelia by a Fas/Fas ligand-dependent mechanism *Am. J. Physiol.* (277) G599-G608
- Chen, X.M., Levine, S.A., Splinter, P.L., Tietz, P.S., Ganong, A.L., Jobin, C., Gores, G.J., Paya, C.V., LaRusso, N.F., 2001.** *Cryptosporidium parvum* activates nuclear factor kappaB in biliary epithelia preventing epithelial cell apoptosis. *Gastroenterology* 120, 1774-1783.
- Chen X-M, Keithly JS, Paya CV, LaRusso NF., 2002.** Cryptosporidiosis. *N Engl J Medecine.* 346(22)1723-31.
- Chen F, Huang K 2012.** effects of the chinese medicine matrine on experimental *c. parvum* infection in balb/c mice and mdbk cells. *parasitol. res.*, **111**, 1827-1832.
- Choudhry, N., Korbel, D.S., Edwards, L.A., Bajaj-Elliott, M., McDonald, V., 2009.** Dysregulation of interferon-gamma-mediated signalling pathway in intestinalepithelial cells by *Cryptosporidium parvum* infection. *Cell. Microbiol.* 11, 1354-1364.
- Clark, D.P., 1999.** New insights into human cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 554-563.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Coklin, T., Farber, J., Parrington, L., Dixon, B., 2007.** Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. *Vet. Parasitol.* 150, 297-305.
- Connelly, L., Craig, B.H., Jones, B., Alexander, C.L., 2013.** Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. within a remote population of Soay sheep on St. Kilda Islands, Scotland. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2240–2246. <https://doi.org/10.1128/AEM.02823-12>.
- Constable PD., 2009.** Treatment of Calf Diarrhea: Antimicrobial and Ancillary Treatments. *Vet. Clin. Food Anim.*, 25, 101-120.
- Coombs GH., 1999.** Biochemical Peculiarities and Drug Targets in *Cryptosporidium parvum*: Lessons from other Coccidian Parasites. *Parasitol Today.* 15(8), 333-338.
- Corso, P. S., Kramer, M. H., Blair, K. A., Addiss, D. G., Davis, J. P., and Haddix, A. C. (2003).** Cost of illness in the 1993. waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. *Emerg Infect Dis* 9(4), 426-31.
- Costa LB, Noronha FJ, Roche JK., 2012.** Novel in vitro and in vivo models and potential new therapeutics to break the vicious cycle of *Cryptosporidium* infection and malnutrition. *The Journal of infectious diseases*, 205(9), 1464–71.
- Coutinho, B.P., Oriá, R.B., Vieira, C.M., Sevilleja, J.E., Warren, C.A., Maciel, J.G., Thompson, M.R., Pinkerton, R.C., Lima, A.A., Guerrant, R.L., 2008.** *Cryptosporidium* infection causes undernutrition and, conversely, weanling undernutrition intensifies infection. *J. Parasitol.* 94, 1225-1232.
- Cuero, R.G., 1999.** Antimicrobial action of exogenous chitosan. In *Chitin and Chitinases*. Jollès, P., and Muzzarelli, R.A.A. (eds). Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag, pp. 315–333.
- Current, W.L., Long, P.L., 1983.** Development of human and calf *Cryptosporidium* in chicken embryos. *Journal of Infectious Diseases* 148, 1108.
- Current, W.L., 1986.** *Cryptosporidium* its biology and potential for environmental transmission. *Criti Rev. Environ. Control.* (17) 21-51.
- Current, W.L., Garcia, L.S., 1991.** Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 325-358.
- Dahmani H., Hakem A., Baroudi D., Oumouna M., 2015.** Prevalence and risk factors of *Cryptosporidium* spp. in lambs in the central region of Algeria. *Rencontres Recherches Ruminants*, Paris, France.
- De Graaf, D.C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L.M., Abbassi, H., Peeters, J.E., 1999a.** A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int. J. Parasitol.* 29, 1269–1287.
- De Graaf D.C., Spano, F., Petry, F., Sagodira, S., Bonnin, A., 1999 b.** Speculation on whether a vaccine against cryptosporidiosis is a reality or fantasy. *Int. J. Parasitol.* 29, 1289-1306.
- De la Fuente R, García A, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Luzón M, Cid D, García S, Orden JA, Gómez-Bautista M., 1998.** Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. *Prev Vet Med.* 36(2)145-152.
- Delafosse, A., Castro-Hermida, J.A., Baudry, C., Ares-Mazás, E., Chartier, C., 2006.** Herd-level risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy-goat kids in western France. *Prev. Vet. Med.* 77, 109-121

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- De Waele, V., Berkvens, D., Speybroeck, N., Mulcahy, G.M., Murphy, T.M., 2010.** Control of cryptosporidiosis in neonatal calves: Use of halofuginone lactate in two different calf rearing systems. *Prev. Vet. Med.*, **96**, 143-151.
- De Waele, V., Berzano, M., Berkvens, D., Speybroeck, N., Lowery, C., Mulcahy, G.M., Murphy, T.M., 2011.** Age-stratified Bayesian analysis to estimate sensitivity and specificity of four diagnostic tests for detection of *Cryptosporidium* oocysts in neonatal calves. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 76-84.
- Díaz, P., Quílez, J., Robinson, G., Chalmers, R.M., Díez-Baños, P., Morrondo, P., 2010 a.** Identification of *Cryptosporidium xiaoi* in diarrhoeic goat kids (*Capra hircus*) in Spain. *Vet. Parasitol.* **172**, 132-134
- Díaz, P., Quílez, J., Chalmers, R.M., Panadero, R., López, C., Sánchez-Acedo, C., Morrondo, P., Díez-Baños, P., 2010b .** Genotype and subtype analysis of *Cryptosporidium* isolates from calves and lambs in Galicia (NW Spain). *Parasitology*. **137**, 1187-1193.
- Díaz, P., Quílez, J., Prieto, A., Navarro, E., Pérez-Creo, A., Fernández, G., Panadero, R., López, C., Díez-Baños, P., Morrondo, P., 2015.** *Cryptosporidium* species and subtype analysis in diarrhoeic pre-weaned lambs and goat kids from North-Western Spain. *Parasitol. Res.* **114**, 4099–4105.
- Di Giovanni, G.D., LeChevallier, M.W., 2005.** Quantitative-PCR assessment of *Cryptosporidium parvum* cell culture infection. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1495-1500.
- Doares, S.H., Syrovets, T., Weiler, E.W., and Ryan, C.A., 1995.** Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4095–4098.
- Downey, A.S., Chong, C.R., Graczyk, T.K., Sullivan, D.J., 2008.** Efficacy of pyriminyl pamoate against *Cryptosporidium parvum* infection in vitro and in a neonatal mouse model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 3106–3112.
- Drumo, R., Widmer, G., Morrison, L.J., Tait, A., Grelloni, V., D'Avino, N., Pozio, E., Cacciò, S.M., 2012.** Evidence of host-associated populations of *Cryptosporidium parvum* in Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 3523–3529.
- DuPont, H.L., Chappell, C.L., Sterling, C.R., Okhuysen, P.C., Rose, J.B., Jakubowski, W., 1995.** The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.* **332**, 855-859.
- Eibach D, Krumkamp R, Al-Emran HM, Sarpong N, Hagen RM, Adu-Sarkodie Y, et al., 2015.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. among children in rural Ghana. *PLoS Negl Trop Dis.* **9**(3):e0003551.
- Elitok B, Elitok ÖM, Pulat H 2005.** Efficacy of Azithromycin Dihydrate in Treatment of Cryptosporidiosis in Naturally Infected Dairy Calves. *J. Vet. Intern. Med.*, **19**, 590–593.
- Elwin, K., Hadfield, S.J., Robinson, G., Crouch, N.D., Chalmers, R.M., 2012 a.** *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. *Int. J. Parasitol.* **42**, 675-682.
- Essid R, Mousli M, Aoun K, Abdelmalek R, Mellouli F, Kanoun F, et al., 2008.** Identification of *Cryptosporidium* species infecting humans in Tunisia. *Am J Trop Med Hyg.* **2008**;79(5):702–5.
- Esteban, E., Anderson, B.C., 1995.** *Cryptosporidium muris*: prevalence, persistency, and detrimental effect on milk production in a drylot dairy. *J. Dairy. Sci.* **78**, 1068-1072.
- Faubert GM, Litvinski Y., 2000.** Natural transmission of *Cryptosporidium parvum* between

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

dams and calves on a dairy farm. J Parasitol. 83(3):495-500.

**Fayer R, Ungar B.L.P., 1986.** *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis. Clinical Microbiol Rev. 50(4):453-483.

**Fayer, R., Andrews, C., Ungar, B.L.P., Blagburn, B., 1989.** Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves. J. Parasitol., 75, 393-397.

**Fayer, R., Graczyk, T.K., Lewis, E.J., Trout, J.M., Farley, C.A., 1998 a.** Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1070-1074.

**Fayer, R., Morgan, U., Upton, S.J., 2000 a.** Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int. J. Parsitol. 30, 1305-1322.

**Fayer, R., Trout, J.M., Graczyk, T.K., Lewis, E.J., 2000 b.** Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on three Maryland farms. Vet. Parasitol. 93, 103-112.

**Fayer, R., Trout, J.M., Xiao, L., Morgan, U.M., Lai, A.A., Dubey, J.P., 2001.** *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. J. parasitol. 87, 1415-1422.

**Fayer, R., 2004.** *Cryptosporidium*, a water-borne zoonotic parasite. Vet. Parasitol. 126, 37-56.

**Fayer, R., Santín, M., Trout, J.M., Greiner, E., 2006.** Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. Vet. Parasitol. 135, 105-112.

**Fayer, R., and Xiao, L., 2007.** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. second ed. CRC Press, Boca Raton.

**Fayer, R., Santin, M., Trout, J.M., 2007.** Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. Vet. Parasitol. 145, 260-266.

**Fayer, R., Santín, M., Trout, J.M., 2008.** *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). Vet. Parasitol. 156, 191-198.

**Fayer, R., Santin, M., 2009.** *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*) Vet. Parasitol. 164, 192-200.

**Fayer, R., 2010.** Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. Exp. Parasitol. 124, 90-97.

**Fayer, R., Santín, M., Macarisin, D., 2010.** *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. Vet. Parasitol. 172, 23-32.

**Feltus, D. C., Giddings, C. W., Schneck, B. L., Monson, T., Warshauer, D., and McEvoy, J. M. 2006.** Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. J Clin Microbiol 44(12), 4303-8.

**Feng, X., Rich, S.M., Akiyoshi, D., Tumwine, J.K., Kekitiinwa, A., Nabukeera, N., Tzipori, S., Widmer, G., 2000.** Extensive polymorphism in *Cryptosporidium parvum* identified by multilocus microsatellite analysis. Appl. Environ. Microbiol. 66, 3344-3349.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Feng, Y., Ortega, Y., He, G., Das, P., Xu, M., Zhang, X., Fayer, R., Gatei, W., Cama, V., Xiao, L., 2007.** Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deerlike genotype in bovines. *Vet. Parasitol.* 144, 1–9.
- Feng, Y., Li, N., Duan, L., and Xiao, L. 2009.** *Cryptosporidium* genotype and subtype distribution in raw wastewater in Shanghai, China: evidence for possible unique *Cryptosporidium hominis* transmission. *J Clin Microbiol* 47 (1), 153-7.
- Feng, Y., and Xiao, L. 2017.** Molecular epidemiology of Cryptosporidiosis in China. *Front. Microbiol.* 8:1701.
- Feng, Y., Ryan, U.M., Xiao, L., 2018.** Genetic diversity and population structure of *Cryptosporidium*. *Trends Parasitol.* 0.
- Feng, Y., Gong, X., Zhu, K., Li, Na., Yu, Z., Guo, Y., Weng, Y., Kváč, M., and Xiao, L., 2019.** Prevalence and genotypic identification of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bienersi* in pre-weaned dairy calves in Guangdong, China
- Fergusson, P., and Tomkins, A. 2009.** HIV prevalence and mortality among children undergoing treatment for severe acute malnutrition in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103(6), 541-8.
- Ferre, I., Benito-Peña, A., García, U., Osoro, K., Ortega-Mora, L.M., 2005.** Effect of different decoquinate treatments on cryptosporidiosis in naturally infected Cashmere goat kids. *Vet. Rec.* 157, 621-262.
- Finch, G.R., Daniels, C.W., Black, E.K., Schaefer, F.W., Belosevic, M., 1993.** Dose response of *Cryptosporidium parvum* in outbred neonatal CD-1 mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3661–3665
- Follet, J., Guyot, K., Leruste, H., Follet-Dumoulin, A., Hammouma-Ghelboun, O., Certad, G., Dei cas, E., Halama, P., 2011.** *Cryptosporidium* infection in a veal calf cohort in France : molecular characterization of species in longitudinal study. *Vet. Res.* 42 (1), 116.
- Fontaine, M., Guillot, E., 2002.** Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 214, 13-17.
- Fournet, N., Deege, M.P., Urbanus, A.T., Nichols, G., Rosner, B.M., Chalmers, R.M., Gorton, R., Pollock, K.G., van der Giessen, J.W., Wever, P.C., Dorigo-Zetsma, J.W., Mulder, B., Mank, T.G., Overdevest, I., Kusters, J.G., van Pelt, W., Kortbeek, L.M., 2013.** Simultaneous increase of *Cryptosporidium* infections in the Netherlands, the United Kingdom and Germany in late summer season, 2012. *Euro Surveill.* (10),1-5.
- Fox, L.M., Saravolatz, L.D., 2005.** Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent. *Clin. Infect. Dis.* (40), 1173-1180.
- Garcia, L.S., Bruckner, D.A., Brewer, T.C., Shimizu, R.Y., 1983.** Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 18, 185-190.
- Garcia, L.S., Brewer, T.C., Bruckner, D.A., 1987.** Fluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 25,119-121.
- Garcia, L.S., Shimizu, R.Y., 1997.** Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1526-1529.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Garcia-Preledo, I., Pedraza-Diaz, S., Gonzalez-Warleta, M., Mezo, M., Gomez-Bautista, M., Ortega-Mora, L. M., and Castro-Hermida, J. A., 2013.** Presence of *Cryptosporidium* scrofarum, *C. suis* and *C. parvum* subtypes IIAA16G2R1 and IIAA13G1R1 in Eurasian wild boars (*Sus scrofa*). *Vet Parasitol* 196 (3-4), 497-502.
- Gaafar MR., 2012.** Efficacy of *Allium sativum* (garlic) against experimental cryptosporidiosis. *Alexandria Journal of Medicine*, **48**, 59–66.
- Gargala G., Delaunaya A., Favennec L., Brasseur P., Ballet J., 1999.** Enzyme immunoassay detection of *Cryptosporidium parvum* inhibition by sinefungin in sporozoite infected HCT-8 enterocytic cells. *Int. J. Parasitol.*, **29**, 703-709.
- Gargala G., Delaunaya A., Favennec L., Brasseur P., Ballet J., 2000.** Efficacy of nitazoxanide, tizoxanide and tizoxanide glucuronide against *Cryptosporidium parvum* development in sporozoite infected HCT-8 enterocytic cells. *J. Antimicrob. Chemoth.*, **46**, 57-60.
- Garvey, M., Farrell, H., Cormican, M., Rowan, N., 2010.** Investigations of the relationship between use of in vitro cell culture-quantitative PCR and a mouse-based bioassay for evaluating critical factors affecting the disinfection performance of pulsed UV light for treating *Cryptosporidium parvum* oocysts in saline. *J. Microbiol. Methods* 80, 267–273.
- Garza A, Castellanos-Gonzalez A, Griffiths J, et al., 2008.** Infection of immunocompetent mice with acid-water-pretreated *Cryptosporidium parvum* results in weight loss, and intestinal (structural and physiological) alterations. *Parasitology research*, 102(3), 457–63.
- Gatei, W., Hart, C. A., Gilman, R. H., Das, P., Cama, V., and Xiao, L. 2006 a.** Development of a multilocus sequence typing tool for *Cryptosporidium hominis*. *J Eukaryot Microbiol* 53 Suppl 1, S43-8.
- Gatei, W., Wamae, C. N., Mbae, C., Waruru, A., Mulinge, E., Waithera, T., Gatika, S. M., Kamwati, S. K., Revathi, G., and Hart, C. A. (2006b).** Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 75(1), 78-82.
- Gatei, W., Das, P., Dutta, P., Sen, A., Cama, V., Lal, A.A., Xiao, L., 2007.** Multilocus sequence typing and genetic structure of *Cryptosporidium hominis* from children in Kolkata, India. *Infect. Genet. Evol.* 7, 197-205.
- Gatei, W., Barrett, D., Lindo, J. F., Eldemire-Shearer, D., Cama, V., and Xiao, L. (2008).** Unique *Cryptosporidium* population in HIV-infected persons, Jamaica. *Emerg Infect Dis* 14(5), 841-3.
- Geurden, T., Goma, F.Y., Siwila, J., Phiri, I.G., Mwanza, A.M., Gabriel, S., Claerebout, E., Vercruysse, J., 2006 a.** Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* in three cattle husbandry systems in Zambia. *Vet. Parasitol.* 138, 217-222.
- Geurden, T., Berkvens, D., Geldhof, P., Vercruysse, J., Claerebout, E., 2006 b.** A Bayesian approach for the evaluation of six diagnostic assays and the estimation of *Cryptosporidium* prevalence in dairy calves. *Vet. Res.* 37, 671-682.
- Geurden, T., Berkvens, D., Martens, C., Casaert, S., Vercruysse, J., Claerebout, E., 2007.** Molecular epidemiology with subtype analysis of *Cryptosporidium* in calves in Belgium. *Parasitology*. 134, 1981-1987.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Geurden, T., Thomas, P., Casaert, S., Vercruysse, J., Claerebout, E., 2008.** Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium. *Vet. Parasitol.* 155, 142–145.
- Giacometti A, Cirioni O, Scalise G., 1996.** In-vitro activity of macrolides alone and in combination with artemisin, atovaquone, dapson, minocycline or pyrimethamine against *Cryptosporidium parvum*. *J. Antimicrob. Chemoth.*, **38**, 399-408.
- Giacometti A, Burzacchini F, Cirioni O, Barchiesi F, Dini M, Scalise G (1999).** Efficacy of Treatment with Paromomycin, Azithromycin, and Nitazoxanide in a Patient with Disseminated Cryptosporidiosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **18**, 885–889.
- Giadinis, N.D., Papadopoulos, E., Lafi, S.Q., Panousis, N.K., Papazahariadou, M., Karatzias, H., 2008.** Efficacy of halofuginone lactate for the treatment and prevention of cryptosporidiosis in goat kids: an extensive field trial. *Small. Rumin. Res.* 76, 195-200.
- Gift Witto, S. Kankya, C. Kazibwe, A. Akurut, G. Ochwo. S., 2019.** Occurrence of *Cryptosporidium hominis* in cattle bordering the Lake Mburo National Park 1 in Kiruhura district, Western Uganda. *ReseachGate*.
- Giles, M., Chalmers, R., Pritchard, G., Elwin, K., Mueller-Doblies, D., Clifton-Hadley, F., 2009.** *Cryptosporidium hominis* in a goat and a sheep in the UK. *Vet. Rec.* 164, 24-25.
- Girouard, D., Gallant, J., Akiyoshi, D.E., Nunnari, J., Tzipori, S., 2006.** Failure to propagate *Cryptosporidium* spp. in cell-free culture. *Journal of Parasitology* 92, 399–400.
- Goma,F., Geurden,T., Siwila,J.,Phiri,I., Gabriël,S., Claerebout,E., Vercruysse,J., 2007.** The prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* spp. in small ruminants in Zambia. *Small Rumin. Res.* 72, 77–80.
- Gong C, Cao XF., Deng L., Li W., Huang XM., Lan JC., Xiao Q-C, Zhong Z-J, Feng F, Zhang Y, Wang W-B, Guo P,Wu K-J & Peng G-N., 2017.** Epidemiology of *Cryptosporidium* infection in cattle in China: a review. *Parasite.* 24: 1.
- Griffiths JK 1998.** Human Cryptosporidiosis: Epidemiology, Transmission, Clinical Disease, Treatment, and Diagnosis. *Adv. Parasit.*, **40**, 37-49.
- Guerrant, R.L., Oria, R.B., Moore, S.R., Oria, M.O., Lima, A.A., 2008.** Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. *Nutr. Rev.* 66, 487–505.
- Guyot, K., Ngouanesavanh, T., Dei-Cas, E., 2005.** Strategies for detecting pathogenic protists in water: the point on *Cryptosporidium*. *European Journal of water quality* 36, 51-70.
- Guyot, K., Sarfati, C., and Derouin, F., 2012.** Actualités sur l'épidémiologie et le diagnostic de la cryptosporidiose. *feuillets de Biologie VOL LIII N° 304*, 21-29.
- Hadfield, S.J., Robinson, G., Elwin, K., Chalmers, R.M., 2011.** Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 49, 918-924.
- Hadfield, S.J., Chalmers, R.M., 2012.** Detection and characterization of *Cryptosporidium cuniculus* by real-time PCR. *Parasitol. Res.* 111, 1385-1390.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Hajdusek, O., Ditrich, O., Slapeta, J., 2004.** Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 122, 183-192.
- Hamnes, I.S., Gjerde, B.K., Forberg, T., Robertson, L.J., 2007.** Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in suckling piglets in Norway. *Vet. Parasitol.* 144, 222–233.
- Harari, M.D., West, B., and Dwyer, B., 1986.** *Cryptosporidium* as a cause laryngotracheitis in an infant. *Lancet* i: 1207.
- Harp JA, Wannemuehler MW, Woodmansee DB, et al. (1988).** Susceptibility of germfree or antibiotic-treated adult mice to *Cryptosporidium parvum*. *Infection and immunity*, 56(8), 2006–10.
- Harp, J.A., Woodmansee, D.B., Moon, H.W., 1990.** Resistance of calves to *Cryptosporidium parvum*: effects of age and previous exposure. *Infect. Immun.* 58, 2237-2240.
- Heine, J., 1982.** Eine einfache nachweismethode für kryptosporidien. *Im Kot. Zentralbl. Veterinär. Reiche B.* 29, 324-327.
- Heine, J., Pohlenz, J., Moon, H.W., Woode, G.N., 1984.** Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* Species. *J. Infect. Dis.* 150, 768-775.
- Helmy, Y. A., Krucken, J., Nockler, K., von Samson-Himmelstjerna, G., and Zessin, K. H. (2013).** Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in livestock animals and humans in the Ismailia province of Egypt. *Vet Parasitol* 193(1-3), 15-24.
- Helmy YA, Samson-Himmelstjerna GV, Nockler K, Zessin KH., 2015.** Frequencies and spatial distributions of *Cryptosporidium* in livestock animals and children in the Ismailia province of Egypt. *Epidemiol Infect.* 143(6), 1208–18.
- Henriksen, S.A., and J. Pohlenz. 1981.** Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet. Scand.* 22, 594-596.
- Hemphill A, Mueller J, Esposito M (2006).** Nitazoxanide, a broad-spectrum thiazolide anti-infective agent for the treatment of gastrointestinal infections. *Expert. Opin. Pharmacother.*, 7 (7), 953-964.
- Heuschele, W.P., Oosterhuis, J., Janssen, D., Robinson, P.T., Ensley, P.K., Meier, J.E., Olson, T., Anderson, M.P., Benirschke, K., 1986.** Cryptosporidial infections in captive wild animals. *J. Wildlife Dis.* 22, 493-496.
- Hijjawi, N.S., Meloni, B.P., Morgan, U.M., Thompson, R.C.A., 2001.** Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. *International Journal of Parasitology* 31, 1048–1055.
- Hijjawi, N.S., Meloni, B.P., Ng'anzo, M., Ryan, U.M., Olson, M.E., Cox, P.T., Monis, P.T., Thompson, R.C.A., 2004.** Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *International Journal for Parasitology* 34, 769–777.
- Hijjawi, N., Ng, J., Yang, R., Atoum, M.F., Ryan, U., 2010.** Identification of rare and novel *Cryptosporidium* GP60 subtypes in human isolates from Jordan. *Exp. Parasitol.* 125, 161-164.
- Hijjawi, N., 2010.** *Cryptosporidium*: new developments in cell culture. *Exp. Parasitol.* 124, 54–60.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Hijjawi N, Mukbel R, Yang R, Ryan U., 2016.** Genetic characterization of *Cryptosporidium* in animal and human isolates from Jordan. *Vet Parasitol.* (228) 116–20.
- Hill, B.D., Blewett, D.A., Dawson, A.M., Wright, S., 1990.** Analysis of the kinetics, isotype and specificity of serum and coproantibody in lambs infected with *Cryptosporidium parvum*. *Res. Vet. Sci.* 48, 76-81.
- Hlavsa, MC., Roellig, DM., Seabolt MH., et al., 2017.** Using molecular characterization to support investigations of aquatic facility-associated outbreaks of cryptosporidiosis, Alabama, Arizona, and Ohio, 2016.
- Hira, K. G., Mackay, M. R., Hempstead, A. D., Ahmed, S., Karim, M. M., O'Connor, R. M., Hibberd, P. L., Calderwood, S. B., Ryan, E. T., Khan, W. A., and Ward, H. D. (2011).** Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. from Bangladeshi children. *J Clin Microbiol* 49(6), 2307-10.
- Hocine, A., R., Bouzid R., Ladjama M., Khalef, D., 2016.** Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts in calves in two aereas from Aestern Algeria. *Global Veterinaria.* 335-342.
- Hu, G., Feng, Y., O'Hara, S.P., Chen, X.-M., SpringerLink (Online service), 2014.** Immunology of Cryptosporidiosis. In: Cacciò, S.M., Widmer, G. (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*, Springer-Verlag, Wien, pp. 423–454.
- Huang, K., Akiyoshi, D. E., Feng, X., and Tzipori, S. 2003.** Development of patent infection in immunosuppressed C57Bl/6 mice with a single *Cryptosporidium meleagridis* oocyst. *J Parasitol* 89(3), 620-2.
- Huang, J., Mullapudi, N., Lancto, C.A., Scott, M., Abrahamsen, M.S., Kissinger, J.C., 2004.** Phylogenomic evidence supports past endosymbiosis, intracellular and horizontal gene transfer in *Cryptosporidium parvum*. *Genome Biol* 5, R88.
- Huetink REC, van der Giessen JWB, Noordhuizen JPTM, Ploeger HW., 2001.** Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Vet Parasitol.* (102)53-67.
- Hunter, P.R., Quigley, C., 1998.** Investigation of an outbreak of cryptosporidiosis associated with treated surface water finds limits to the value of case control studies. *Commun. Dis. Public Health* 1, 234–238.
- Hunter, P.R., Hughes, S., Woodhouse, S., Raj, N., Syed, Q., Chalmers, R.M., Verlander, N.Q., Goodacre, J., 2004.** Health sequelae of human cryptosporidiosis in immunocompetent patients. *Clin. Infect. Dis.* 39, 504-510.
- Ibrahim MA, Abdel-Ghany AE, Abdel-Latef GK, Abdel-Aziz SA, Aboelhadid SM., 2016.** Epidemiology and public health significance of *Cryptosporidium* isolated from cattle, buffaloes, and humans in Egypt. *Parasitol Res.*;115:2439–48.
- Imre, K., Luca, C., Costache, M., Sala, C., Morar, A., Morariu, S., Ilie, M.S., Imre, M., Dărăbuș, G., 2013.** Zoonotic *Cryptosporidium parvum* in Romanian newborn lambs (*Ovis aries*). *Vet. Parasitol.* 191, 119–122.
- Iqbal, J., Khalid, N., and Hira, P. R. (2011).** Cryptosporidiosis in Kuwaiti children: association of clinical characteristics with *Cryptosporidium* species and subtypes. *J Med Microbiol* 60(Pt 5), 647-52.
- Iqbal, A., Lim, Y.A.L., Surin, J., Sim, B.L.H., 2012.** High diversity of *Cryptosporidium* subgenotypes identified in Malaysian HIV/AIDS individuals targeting gp60 gene. *PLoS ONE* 7, e31139.
- Iseki, M., 1979.** *Cryptosporidium felis* sp. N. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Jpn. J. Parsitol.* 28, 285-307.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Izquierdo, J., Antunez, I., Calderon, M. T., Perez Giraldo, C., and Munoz Sanz, A., 1988.** Diarrhea caused by *Cryptosporidium* and colonic neoplasia. *Rev Clin Esp* 182(7), 393-4.
- J. Clarke., 1895.** A Study of Coccidia met with in Mice, *J Microsc Sci*, vol.37, p.277.
- Jarvie BD, Trotz-williams LA, Mcknight DR, Leslie KE, Wallace MM, Todd CG., 2005.** Effect of Halofuginone Lactate on the Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and Growth of Neonatal Dairy Calves. *J. Dairy Sci.*, **88** (5), 1801–1806.
- Janoff EN, Reller LB., 1987.** *Cryptosporidium* species, a protean protozoan. *J Clin Microbiol.* 25(6):967.
- Jenkins, M., Higgins, J., Kniel, K., Trout, J., Fayer, R., 2004.** Protection of calves against cryptosporidiosis by oral inoculation with gamma-irradiated *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J. Parasitol.* 90, 1178–1180.
- Jex, A. R., Whipp, M., Campbell, B. E., Caccio, S. M., Stevens, M., Hogg, G., and Gasser, R. B. (2007).** A practical and cost-effective mutation scanning-based approach for investigating genetic variation in *Cryptosporidium*. *Electrophoresis* 28(21), 3875-83.
- Jex, A.R., Smith, H.V., Monis, P.T., Campbell, B.E., Gasser, R.B., 2008.** *Cryptosporidium* biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotech. Adv.* 26, 304-317.
- Joachim A, Krull T, Schwarzkopf J, Dauschies A., 2003.** Prevalence and control of bovine cryptosporidiosis in German dairy herds. *Vet. Parasitol.*, **112**, 277–288.
- Johnson, D.W., Pieniazek, N.J., Griffin, D.W., Misener, L. Rose, J.B., 1995.** Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3849–3855.
- Johnson EH, Muirhead DE, Windsor JJ, King GJ, Al-Busaidy R, Cornelius R., 1999.** Atypical outbreak of caprine cryptosporidiosis in the Sultanate Oman. *Vet Res.* 145(18) 521-4.
- Johnson, E.H., Windsor, J.J., Muirhead, D.E., King, G.J., Al-Busaidy, R., 2000.** Confirmation of the prophylactic value of paromomycin in a natural outbreak of caprine cryptosporidiosis. *Vet. Res. Commun.* 24, 63–67.
- Johnston, S.P., Ballard, M.M., Beach, M.J., Causer, L., Wilkins, P.P., 2003.** Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 41, 623-626.
- Jothikumar, N., da Silva, A.J., Moura, I., Qvarnstrom, Y., Hill, V.R., 2008.** Detection and differentiation of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* by dual TaqMan assays. *J. Med. Microbiol.* 57, 1099-1105.
- Jumaa, M., Furkert, F.H., and Muller, B.W., 2002.** A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan. *Eur J Pharm Biopharm* **53**: 115–123.
- Kar, S., Gawlowska, S., Dauschies, A., Bangoura, B., 2011.** Quantitative comparison of different purification and detection methods for *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Vet. Parasitol.* 177, 366-370.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Karanis, P., Plutzer, J., Abdul Halim, N., Igori, K., Nagasawa, H., Ongerth, J., Liqing, M., 2007.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* from animal sources in Qinghai province of China. *Parasitol. Res.* 101, 1575-1580.
- Karanis, P., Kimura, A., Nagasawa, H., Igarashi, I., Suzuki, N., 2008.** Observation on *Cryptosporidium* life cycle stages during excystation. *Journal of Parasitology* 94, 157–158.
- Karanis, P., Aldeyarbi, H.M., 2011.** Evolution of *Cryptosporidium* in vitro culture. *Int. J. Parasitol.* 41, 1231-1242.
- Kaupke, A., Michalski, M.M., Rzeżutka, A., 2017.** Diversity of *Cryptosporidium* species occurring in sheep and goat breeds reared in Poland. *Parasitol. Res.* 116, 871–879.
- Kehl, K.S., Cicirello, H., Havens, P.L., 1995.** Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *J. Clin. Microbiol.* 33, 416-418.
- Keidel J, Dauschies A 2013.** Integration of halofuginone lactate treatment and disinfection with p-chloro-m-cresol to control natural cryptosporidiosis in calves. *Vet. Parasitol.*, In press.
- Khan, A., Shaik, G S., Grigg, M E., 2018.** Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. *Acta Tropica* (184) 1–14.
- Khelef D., Saïb M.Z., Akam A., Kaidi R., Chirila V., Cozma V., Adjou K.T., 2007.** Épidémiologie de la cryptosporidiose chez les bovins en Algérie. *Revue Méd. Vét.* 158, 260-264.
- Klein, P., Cirioni, O., Giacometti, A., Scalise, G., 2008.** *In vitro* and *in vivo* activity of aurintricarboxylic acid preparations against *Cryptosporidium parvum*. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 1101–1104.
- Koinari, M., Lymbery, A .J., Ryan, U.M., 2014.** *Cryptosporidium* species in sheep and goats from Papua New Guinea. *Exp. Parasitol.* 141, 134–137.
- Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., Park, H.J., 2010.** Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 51–63.
- Kotloff, K.L., Nataro, J.P., Blackwelder, W.C., Nasrin, D., Farag, T.H., Panchalingam, S., Wu, Y., Sow, S.O., Sur, D., Breiman, R.F., Faruque, A.S., Zaidi, A.K., Saha, D., Alonso, P.L., Tamboura, B., Sanogo, D., Onwuchekwa, U., Manna, B., Ramamurthy, T., Kanungo, S., Ochieng, J.B., Omore, R., Oundo, J.O., Hossain, A., Das, S.K., Ahmed, S., Qureshi, S., Quadri, F., Adegbola, R.A., Antonio, M., Hossain, M.J., Akinsola, A., Mandomando, I., Nhampossa, T., Acacio, S., Biswas, K., O'Reilly, C.E., Mintz, E.D., Berkeley, L.Y., Muhsen, K., Sommerfelt, H., Robins-Browne, R.M., Levine, M.M., 2013.** 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. *Lancet* (382) 209–222.
- Koudela B, Modry D and Vítovec J., 1998.** Infectivity of *Cryptosporidium muris* isolated from cattle. *Veterinary Parasitology*, 76(3), 181–188.
- Kourenti C, Karanis P, Smith H., 2007.** Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health.* 5(1):1.
- Kvác, M., Vítovec, J., 2003.** Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.* 50, 451-457.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Kváč, M., Kouba, M., Vítovec, J., 2006.** Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 137, 202-209.
- Kvač M, Květoňová D, Salat J, et al., 2007.** Viability staining and animal infectivity of *Cryptosporidium andersoni* oocysts after long-term storage. *Parasitology research*, 100(2), 213–7.
- Kváč, M., Kestánová, M., Pinková, M., Kvetonová, D., Kalinová, J., Wagnerová, P., Kotková, M., Vítovec, J., Ditrich, O., McEvoy, J., Stenger, B., Sak, B., 2013.** *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Vet. Parasitol.* 191, 218-227.
- Kumar, M.N.V., 2000.** A review of chitin and chitosan applications. *Reactive Funct Polym* 46: 1–27.
- Laatamna A.E., Wagnerová P., Sak B., Květoňová D., Xiao L., Rost M., Mcevoy J., Saadi A.R., Aissi M., Kváč M., 2013.** Equine cryptosporidial infection associated with *Cryptosporidium* hedgehog genotype in Algeria. *Vet. Parasitol.* 197, 350-353.
- Laatamna A.E., Wagnerová P., Sak B., Květoňová D., Xiao L., Rost M., Mcevoy J., Saadi A.R., Aissi M., Kváč M., 2015.** *Microsporidia* and *Cryptosporidium* in horses and donkeys in Algeria: detection of a novel *Cryptosporidium hominis* subtype family (Ik) in a horse. *Vet. Parasitol.* 208, 135-142.
- Laatamna A. E., Holubova N., Sak B., Kvac M., 2017.** *Cryptosporidium meleagridis* and *C. baileyi* (Apicomplexa) in domestic and wild birds in Algeria., *Folia Parasitol.* 64, 018.
- Lacroix-Lamande, S., Mancassola, R., Naciri, M., Laurent, F., 2002.** Role of gamma interferon in chemokine expression in the ileum of mice and in a murine intestinal epithelial cell line after *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* 70, 2090–2099.
- Lake IR, Harrison FCD, Chalmers RM, Bentham G, Nichols G, Hunter PR, 2007.** Case-control study of environmental and social factors influencing cryptosporidiosis. *Eur J Epidemiol.* 22(11) : 805-11.
- Lallemond M, Villeneuve A, Belda J, Dubreuil P (2006).** Field study of the efficacy of halofuginone and decoquinate in the treatment of cryptosporidiosis in veal calves. *Vet. Rec.*, 159, 672-677.
- Lancôt, S., Fustier, P., Taherian, A.R., Bisakowski, B., Zhao, X., Lacasse, P., 2017.** Effect of intramammary infusion of chitosan hydrogels at drying-off on bovine mammary gland involution. *J. Dairy Sci.* 100, 2269–2281.
- Langkjaer, R.B., Vigre, H., Enemark, H.L., Maddox-Hyttel, C., 2007.** Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology.* 134, 339-350.
- Lantier, L., Lacroix-Lamande, S., Potiron, L., Metton, C., Drouet, F., Guesdon, W., Gnahoui-David, A., Le Vern, Y., Deriaud, E., Fenis, A., Rabot, S., Descamps, A., Werts, C., Laurent, F., 2013.** Intestinal CD103+ dendritic cells are key players in the innate immune control of *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal mice. *PLoS Pathog.* 9, e1003801.
- Lanternier, F., Amazzough, K., Favennec, L., Mamzer-Bruneel, M.F., Abdoul, H., Turret, J., Decramer, S., Zuber, J., Scemla, A., Legendre, C., Lortholary, O., Bougnoux, M.E. Network, A.C.N., Transplant *Cryptosporidium* Study, G., 2017.** *Cryptosporidium spp.* infection in solid organ transplantation: the nationwide “TRANSCRYPTO” study. *Transplantation* 101, 826–830.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Lantz, P.-G., Matsson, M., Wadstrom, T., Radstrom, P., 1997.** Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *J. Microbiol. Methods* 28, 159–167.
- Laurent, F., Eckmann, L., Savidge, T.C., Morgan, G., Theodos, C., Naciri, M., Kagnoff, M. F., 1997.** *Cryptosporidium parvum* infection of human intestinal epithelial cells induces the polarized secretion of C-X-C chemokines. *Infect. Immun.* 65, 5067–5073.
- Laurent, F., McCole, D., Eckmann, L., and Kagnoff, M. F., 1999.** Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. *Microbes Infect* 1(2), 141-8.
- Laurent, F., Lacroix-Lamande, S., 2017.** Innate immune responses play a key role in controlling infection of the intestinal epithelium by *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology* (47) 711–721.
- Lambertus A. M., Broek, V.D., Boeriu C. G., 2020.** Chitin and Chitosan: Properties and Applications. Edition 2020. pp 536.
- Leav, B. A., Mackay, M. R., Anyanwu, A., RM, O. C., Cevallos, A. M., Kindra, G., Rollins, N. C., Bennish, M. L., Nelson, R. G., and Ward, H. D. (2002).** Analysis of sequence diversity at the highly polymorphic Cpgp40/15 locus among *Cryptosporidium* isolates from human immunodeficiency virus-infected children in South Africa. *Infect Immun* 70(7), 3881-90.
- LeChevallier MW, Norton WD, Lee RG., 1991.** Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. *Appl Environ Microbiol.* 57(9) :2610-6.
- Lefay, D., Naciri, M., Poirier, P., Chermette, R., 2000.** Prevalence of *Cryptosporidium* infection in calves in France. *Vet. Parasitol.* 89, 1-9.
- Lefay, D., Naciri, M., Poirier, P., Chermette, R., 2001.** Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in suckling calves. *Vet. Rec.* 148, 108-112.
- Lefay, D., Naciri, M., Poirier, P., Chermette, R., 2001.** Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in suckling calves. *Vet. Rec.* 148, 108–112.
- Leitch, G. J., and He, Q., 1999.** Reactive nitrogen and oxygen species ameliorate experimental cryptosporidiosis in the neonatal BALB/c mouse model. *Infect Immun* 67(11), 5885-91.
- Leitch, G.J., He, Q., 2012.** Cryptosporidiosis-an overview. *J. Biomed. Res.* 25, 1–16.
- Levine, N.D., 1980.** Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *J. Parasitol.* 66, 830834.
- Li, N., Xiao, L., Alderisio, K., Elwin, K., Cebelinski, E., Chalmers, R., et al., 2014.** Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zoonotic pathogen emerging in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 217 - 224.
- Li, P., Cai, J., Cai, M., Wu, W., Li, C., Lei, M., et al., 2016.** Distribution of *Cryptosporidium* species in Tibetan sheep and yaks in Qinghai, China. *Vet. Parasitol.* 215, 58–62.
- Li, K., Nader, S M. Zhang, X. Ray, B C., et al., 2019.** Novel lactate dehydrogenase inhibitors with *in vivo* efficacy against *Cryptosporidium parvum*. *PLOS Pathogens*.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Limor, J.R., Lal, A.A., Xiao, L., 2002.** Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2335-2338.
- Lindsay, D.S., Upton, S.J., Owens, D.S., Morgan, U.M., Mead, J.R., Blagburn, B.L., 2000.** *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J. Eukaryot. Microbiol.* (47), 91-95.
- Liu, C., Vigdorovich, V., Kapur, V., Abrahamsen, M.S., 1999.** A random survey of the *Cryptosporidium parvum* genome. *Infect. Immun.* (67), 3960–3969.
- Liu, J., Deng, M., Lancto, C.A., Abrahamsen, M.S., Rutherford, M.S., Enomoto, S., 2009.** Biphasic modulation of apoptotic pathways in *Cryptosporidium parvum*-infected human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* (77), 837–849.
- Liu X, Zhou X, Zhong Zh, Deng J, Chen W, Cao S., 2014.** Multilocus genotype and subtype analysis of *Cryptosporidium andersoni* derived from a Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) in China. *Parasitol Res.* (113) 2129–36.
- Liu, T L., Fan X C, Li, Y H., et al., 2018.** Expression Profiles of mRNA and lncRNA in HCT-8 Cells Infected With *Cryptosporidium parvum* IId Subtype. *Frontiers in Microbiology*. Volume 9 | Article 1409.
- Loganthan, S., Yang, R., Bath, A., Gordon, C., and Ryan, U. 2012.** Prevalence of *Cryptosporidium* species in recreational versus non-recreational water sources. *Exp Parasitol* 131(4), 399-403.
- Ma, P., Soave, R., 1983.** Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. *J. Infect. Dis.* 147, 824-828.
- Ma, P., 1984.** *Cryptosporidium* and the enteropathy of immune deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 3, 488-490.
- Mac Kenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B., et al., 1994.** A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.* 331, 161-167.
- Mahfouz ME, Mira NN, Amer S., 2014.** Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in farm animals in Egypt. *J Vet Med Sci.* 76:1569–75.
- Mallon, M., MacLeod, A., Wasling, J., Smith, H., Reilly, B., Tait, A., 2003.** Population structures and the role of genetic exchange in the zoonotic pathogen *Cryptosporidium parvum*. *J. Mol. Evol.* 56, 407-417.
- Mammeri, M., Chevillot, A., Thomas, M., Polacka, B., Julien, C., Marden, J., Auclair, E., Vallée, I., Adjou, K T., 2018.** Efficacy of chitosan, a natural polysaccharide, against *Cryptosporidium parvum* in vitro and in vivo in neonatal mice. *Experimental Parasitology*. (194) 1–8.
- Mammeri, M., Chevillot, A., Chenafia, I., Julien, C., Vallée, I., Polacka, B., Follet, J., Adjou K T., 2019.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from diarrheal dairy calves in France. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 18.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Mammeri M., Adjou K T., 2019.** Veterinary and public health importance of cryptosporidiosis in Algeria: an update and new insights. *Revue Méd. Vét.*, 2019, **170**, 7-9, 164-174
- Mancassola, R., Richard, A., Naciri, M., 1997.** Evaluation of decoquinate to treat experimental cryptosporidiosis in kids. *Vet. Parasitol.* 69, 31-37
- Marshall, R.J., Flanigan, T.P., 1992.** Paromomycin inhibits *C. parvum* infection of a human enterocyte cell line. *J. Infect. Dis.* 165, 772-774.
- Marcos, L. A., and Gotuzzo, E., 2013.** Intestinal protozoan infections in the immunocompromised host. *Curr Opin Infect Dis* 26(4), 302-8.
- Martin-Gomez S., Álvarez-Sánchez MA., Rojo-Vázquez FA., 2005.** Obtaining hyperimmune anti-*Cryptosporidium parvum* ovine colostrum. A study of the humoral immune response in immunized sheep. *Parasitol Res.* (98)119-129.
- Mason, R.W., Hartley, W.J, Tilt, L., 1981.** Intestinal cryptosporidiosis in goat kid. *Aust.Vet. J.* 57,386-388.
- Mason, M.E., and Davis, J.M. 1997.** Defense response in slash pine: chitosan treatment alters the abundance of specific mRNAs. *Mol Plant Microbe Interact* **10**: 135–137.
- Maurya, P.S., Rakesh, R.L., Pradeep, B., Kumar, S., Kundu, K., Garg, R., Ram, H., Kumar, A., Banerjee, P.S., 2013.** Prevalence and risk factors associated with *Cryptosporidium* spp. infection in young domestic livestock in India. *Trop. Anim. Health Prod.* 45, 941–946
- McDonald, V., Korbel, D.S., Barakat, F.M., Choudhry, N., Petry, F., 2013.** Innate immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. *Parasite Immunol.* 35, 55–64.
- McLauchlin, J., Pedraza-Diaz, S., Amar-Hoetzeneder, C., Nichols, G.L., 1999.** Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3153–3158.
- Mead JR (2002).** Cryptosporidiosis and the challenges of chemotherapy. *Drug Resist. Update*, **5**, 47–57.
- Mead, J.R., 2014.** Prospects for immunotherapy and vaccines against *Cryptosporidium*. *Hum. Vaccin. Immunother.* 10, 1505–1513.
- Meisel, J .L., Perera, D.R., Meligro, C., Rubin, C.E., 1976.** Overwhelming watery diarrhea associated with a cryptosporidium in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology.* 70, 1156-1160.
- Mele, R., Gomez Morales, M.A., Tosini, F., Pozio, E., 2004.** *Cryptosporidium parvum* at different developmental stages modulates host cell apoptosis in vitro. *Infect. Immun.* 72, 6061–6067.
- Mezali L., Mebkhout D., Saidj d., Merah S., Razali h., Larbi B., Abdessalem L., 2015.** Premières données sur la cryptosporidiose chez l'espèce *Oryctolagus cuniculus domesticus* en Algérie. 16ème journée de la Recherche Cunicole. Le Mans, France.
- Ming, Z., Zhou, R., Chen, X.M., 2017.** Regulation of host epithelial responses to *Cryptosporidium* infection by microRNAs. *Parasite Immunol.* 39.
- Miller, C N., Jossé, L., Brown, I., Blakeman, B., Povey, J., Lyto, C., Yiangou, Price M., Jindrich, D., Cinatl J., Feng, W., Xue, Michaelis, M., Tsaousis A D., 2018.** A cell culture platform for

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

Cryptosporidium that enables long-term cultivation and new tools for the systematic investigation of its biology. *International Journal for Parasitology* (48) 197–201

**Mirza-Qavami, S.M., Sadraei, J., 2011.** An examination of *Cryptosporidium parvum* infection in neonate BALB/c mice and rats. *JJM* 4, 185–190.

**Mohammed HO, Wade SE, Schaaf S., 1999.** Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in dairy cattle in southeastern New York State. *Vet Parasitol.* (83) 1-13.

**Molloy SF, Smith HV, Kirwan P, Nichols RA, Asaolu SO, Connelly L, et al., 2010.** Identification of a high diversity of *Cryptosporidium* species genotypes and subtypes in a pediatric population in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg.* 82(4):608–13.

**Monis, P.T., Giglio, S., 2006.** Nucleic acid amplification-based techniques for pathogen detection and identification. *Infect. Genet. Evol.* 6, 2-12.

**Monis, P.T., Giglio, S., Keegan, A.R., Andrew Thompson, R.C., 2005.** Emerging technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites. *Trends. Parasitol.* 21, 340-346.

**Moore, D.A., Atwill, E.R., Kirk, J.H., Brahmbhatt, D., Alonso, L.H., Hou, L., Singer, M.D., Miller, T.D., 2003.** Prophylactic use of decoquinate for infections with *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves. *J of the Am. Vet. Med. Ass.* 223, 839-845.

**Morada, M., Lee, S., Gunther-Cummins, L., Weiss, L.M., Widmer, G., Tzipori, S., Yarlett, N., 2016.** Continuous culture of *Cryptosporidium parvum* using hollow fiber technology. *Int. J. Parasitol.* 46, 21–29.

**Morgan, U.M., Pallant, L., Dwyer, B.W., Forbes, D.A., Rich, G., Thompson, R.C., 1998.** Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. *J. Clin. Microbiol.* 36, 995-998.

**Morgan, U.M., Deplazes, P., Forbes, D.A., Spano, F., Hertzberg, H., Sargent, K.D., Elliot, A., Thompson, R.C., 1999.** Sequence and PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacers of the rDNA repeat unit in isolates of *Cryptosporidium* from different hosts. *Parasitol.* 118, 49-58.

**Morgan-Ryan, U.M., Fall, A., Ward, L.A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R., Thompson, R.C., Olson, M., Lal, A, Xiao, L., 2002.** *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J. Eukaryot. Microbio.* 49, 433-440.

**Morrison, J.L., Mallon, E.M., Smith, V.H., MacLeod, A., Xiao, L., Tait, A., 2008.** The population structure of the *Cryptosporidium parvum* population in Scotland: A complex picture. *Infect. Genet and Evolution.* 8, 121-129.

**Muller J, Wastling J, Sanderson S, Muller N, Hemphill A., 2007.** A Novel *Giardia lamblia* Nitroreductase, GINR1, Interacts with Nitazoxanide and Other Thiazolides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51 (6), 1979–1986.

**Mueller-Doblies, D., Giles, M., Elwin, K., Smith, R.P., Clifton-Hadley, F.A., Chalmers, R.M., 2008.** Distribution of *Cryptosporidium* species in sheep in the UK. *Vet. Parasitol.* 154, 214-219.

**Naciri, M., 1992.** La cryptosporidiose. Importance de la contamination de l'eau. *INRA. Prod. Anim.* 5, 319-327.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Naciri, M., Mancassola, R., Yvoré, P., Peeters, J.E., 1993.** The effect of halofuginone lactate on experimental *Cryptosporidium parvum* infections in calves. *Vet. Parasitol.* 45, 199-207.
- Naciri, M., Mancassola, R., Reperant, J.M., Canivez, O., Quinque, B., Yvoré, P., 1994.** Treatment of experimental ovine cryptosporidiosis with ovine or bovine hyperimmune colostrums. *Vet. Parasitol.* 53, 173-190.
- Naciri, M., Lefay, M.P., Mancassola, R., Hougron, M., Poly, L., Chermette, R., 1999 a.** Efficacité d'une nouvelle formulation du lactate d'halofuginone sur la cryptosporidiose du veau nouveau-ne, Sixièmes Rencontres Recherche Ruminants, 183-183.
- Naciri, M., Lefay, M.P., Mancassola, R., Poirier, P., Chermette, R., 1999 b.** Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France. *Vet. Parasitol.* 85, 245-257.
- Naguib, D., El-Gohary<sup>1</sup>, A H., Roellig, D., Mohamed, A A., Arafat, N., Wang, Y., Feng Y., and Xiao L., 2018.** Molecular characterization of *Cryptosporidium spp.* and *Giardia duodenalis* in children in Egypt. *Parasites & Vectors* (11): 403.
- Nahavandi, K H., Ahmadpour, E., Carmena, D., Spotin, A., Bangoura, B., Xiao, L., 2019.** *Cryptosporidium* infections in terrestrial ungulates with focus on livestock: a systematic review and meta-analysis
- Naumova, E. N., Christodouleas, J., Hunter, P. R., and Syed, Q. (2005).** Effect of precipitation on seasonal variability in cryptosporidiosis recorded by the North West England surveillance system in 1990-1999. *J Water Health* 3(2), 185-96.
- Nazemalhosseini-Mojarad, E., Haghighi, A., Taghipour, N., Keshavarz, A., Mohebi, S. R., Zali, M. R., and Xiao, L. (2011).** Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* isolates from humans and cattle in Iran. *Vet Parasitol* 179(1-3), 250-2.
- Neira, O. P., Munoz, S. N., Wilson, L. G., Barthel, M. M., Rosales, L. M., and Henriquez, R. C. (2012).** *Cryptosporidium* species in immunodeficient and immunocompetent patients of Valparaíso: a descriptive study. *Rev Chilena Infectol* 29(1), 63-71.
- Ng, J.S., Eastwood, K., Walker, B., Durrheim, D.N., Massey, P.D., Porigneaux, P., Kemp, R., McKinnon, B., Laurie, K., Miller, D., Bramley, E., Ryan, U., 2012.** Evidence of *Cryptosporidium* transmission between cattle and humans in northern New South Wales. *Exp. Parasitol.* 130, 437-441
- Ngouanesavanh, T., Guyot, K., Certad, G., Le Fichoux, Y., Chartier, C., Verdier, R.I., Cailliez, J.C., Camus, D., Dei-Cas, E., Bañuls, A.L., 2006.** *Cryptosporidium* population genetics: evidence of clonality in isolates from France and Haiti. *J. Eukaryot. Microbiol.* (53) 33-36.
- Nichols, R.A., Campbell, B.M. Smith, H.V., 2003.** Identification of *Cryptosporidium spp.* oocysts in UK still natural mineral waters and drinking waters using a modified nested PCR-RFLP assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4183-4189.
- Nichols, R.A., Smith, H.V., 2004.** Optimization of DNA extraction and molecular detection of *Cryptosporidium* oocysts in natural mineral water sources. *J. Food. Prot.* 67, 524-532.
- Nichols, R.A., Moore, J.E., Smith, H.V., 2006.** A rapid method for extracting oocyst DNA from *Cryptosporidium*-positive human faeces for outbreak investigations. *J. Microbiol.* 65, 512-524.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Nime, F.A., Burek, J.D., Page, D.L., Holsher, M.A., Yardley, J.H., 1976.** Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*. 70, 592-598.
- Noordeen, F., Rajapakse, R.P., Faizal, A.C., Horadagoda, N.U., Arulkanthan, A., 2000.** Prevalence of *Cryptosporidium* infection in goats selected locations in three agroclimatic zones of Sri Lanka. *Vet. Parasitol.* 93, 95-101.
- Novak SM and Sterling CR., 1991.** Susceptibility dynamics in neonatal BALB/c mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *The Journal of protozoology*, 38(6), 103S–104S.
- Nuchjangreed, C., Boonrod, K., Ongerth, J., and Karanis, P. (2008).** Prevalence and molecular characterization of human and bovine *Cryptosporidium* isolates in Thailand. *Parasitol Res* 103(6), 1347-53.
- O'Brien, E., McInnes, L., and Ryan, U. (2008).** *Cryptosporidium* GP60 genotypes from humans and domesticated animals in Australia, North America and Europe. *Exp Parasitol* 118(1), 118-21.
- O'Donoghue, P.J., 1995.** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int.J. Parasitol.* 25, 139–195.
- O' Handley, R.M., Cockwill, C., McAllister, T.A., Jelinski, M., Morck, D.W., Olson, M.E., 1999.** Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214, 391-396
- O'Hara, S.P., Chen, X.M., 2011.** The cell biology of *Cryptosporidium* infection. *Microb. Infect.* 13, 721–730.
- O'Hara, S.P., Bogert, P.S., Trussoni, C.E., Chen, X., LaRusso, N.F., 2011.** TLR4 promotes *Cryptosporidium parvum* clearance in a mouse model of biliary cryptosporidiosis. *J. Parasitol.* 97, 813–821.
- OIE (2018).** Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Chapter 2.9.4. Cryptosporidiosis.
- Ojuromi OT, Duan L, Izquierdo F, Fenoy S, Oyibo WA, Del Aguila C, et al., 2016.** Genotypes of *Cryptosporidium spp.* and *Enterocytozoon bienersi* in human immunodeficiency virus-infected patients in Lagos, Nigeria. *J Eukaryot Microbiol.* 63(4):414–8.
- Okazawa, A., Kanai, T., Nakamaru, K., Sato, T., Inoue, N., Ogata, H., Iwao, Y., Ikeda, M., Kawamura, T., Makita, S., Uraushihara, K., Okamoto, R., Yamazaki, M., Kurimoto, M., Ishii, H., Watanabe, M., and Hibi, T., 2004.** Human intestinal epithelial cell-derived interleukin (IL)-18, along with IL-2, IL-7 and IL-15, is a potent synergistic factor for the proliferation of intraepithelial lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* 136(2), 269-76.
- Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., Sterling, C.R., Jakubowski, W., DuPont, H.L., 1998.** Susceptibility and serologic response of healthy adults to reinfection with *Cryptosporidium parvum*. *Infect. Immun.* 66, 441–443.
- Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., Crabb, J.H., Sterling, C.R., Dupont, H.L., 1999.** Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J. Infect. Dis.* 180, 1275-1281.
- Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., 2002.** *Cryptosporidium* virulence determinants are we there yet? *Int. J. Parasitol.* 32, 517-525.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Olson ME., Thorlakson CL., Deselliers L., Morck DW., McAllister TA., 1997.** *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. *Vet Parasitol.* (68) 375-81.
- Ollivett TL, Nydam DV, Bowman DD, Zambriski JA, Bellosa ML, Linden TC., 2009.** Effect of nitazoxanide on cryptosporidiosis in experimentally infected neonatal dairy calves. *J. Dairy Sci.*, **92** (4), 1643–1648.
- Ong, C.S., Eisler, D.L., Alikhani, A., Fung, V.W., Tomblin, J., Bowie, W.R., Isaac-Renton, J.L., 2002.** Novel cryptosporidium genotypes in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infections with a cervine genotype. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 263–268.
- Osman, M., El Safadi, D., Benamrouz-Vanneste, S., Cian, A., Moriniere, R., Gantois, N., Delgado Viscogliosi, P., Guyot, K., Bosc, S., Chabe, M., Petit, T., Viscogliosi, E., Certad, G., 2017.** Prevalence, transmission, and host specificity of *Cryptosporidium* spp. in various animal groups from two French zoos. *Parasitol. Res.* 116, 3419–3422.
- Ouakli, N., Belkhiri, A., de Lucio, A., Köster, P.C., Djoudi, M., Dadda, A., Khelef, D., Kaidi, R., Carmena, D., 2018.** Cryptosporidium-associated diarrhoea in neonatal calves in Algeria. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* 12, 78–84.
- Ouchène N., Benekhla A., Khelifi n.-A., Righi S., Paraud C., Chartier C., 2012.** Prevalence of *Cryptosporidium* sp in dairy calves in north-eastern Algeria, *Rev. Médecine Vét.* (**163**) 163-166.
- Ouchene N., Ouchene-Khelifi N.A., Khelifi M., Zeroual F. Bitam, I., Benakhla, A. KAIDI, R., Abu-Median A. B., 2016.** Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in dairy cattle from farms in Algeria. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* (22) 703-707.
- Panciera, R.J., Thomassen, R.W., Garner, F.M., 1971.** Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.* 8, 479-484.
- Paoletti, B., Giangaspero, A., Gatti, A., Iorio, R., Cembalo, D., Milillo, P., Traversa, D., 2009.** Immunoenzymatic analysis and genetic detection of *Cryptosporidium parvum* in lambs from Italy. *Exp. Parasitol.* 122, 349-352.
- Paraud, C., Chartier, C., 2012.** Cryptosporidiosis in small ruminants. *Small Rumin. Res.* 103, 93–97.
- Paraud, C., Guyot, K., Chartier, C., 2009.** Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* sp. infection in calves, lambs and goat kids reared in a same farm in France. III International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference, 11-15 October 2009, Orvieto, Italy.
- Paraud, C., Pors, I., Journal J.P., Besnier, P., Reisdorffer, L., Chartier, C., 2011.** Control of cryptosporidiosis in neonatal goat kids: efficacy of a product containing activated charcoal and wood vinegar liquid (Obioneck®) in field conditions. *Vet. Parasitol.* 180, 354-357.
- Paraud, C., Chartier, C., 2012.** Cryptosporidiosis in small ruminants. *Small Rumin. Res.* 103, 93–97. Special issue: Specificities of parasitism in goats and sheep: interactions with nutrition and control strategies.
- Parsons, M.B., Travis, D., Lonsdorf, E.V., Lipende, I., Roellig, D.M., Roellig, D.M.A., Collins, A., Kamenya, S., Zhang, H., Xiao, L., Gillespie, T.R., 2015.** Epidemiology and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in humans, wild primates, and domesticated animals in the greater Gombe ecosystem, Tanzania. *PLoS Negl. Trop. Dis.*
- Paschke, C., Apelt, N., Fleischmann, E., Perona, P., Walentiny, C., Loscher, T., and Herbringer, K. H. (2011).** Controlled study on enteropathogens in travellers returning from the tropics with and without diarrhoea. *Clin Microbiol Infect* 17(8), 1194-200.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Park, J.H., Guk, S.M., Han, E.T., Shin, E.H., Kim, J.L., Chai, J.Y., 2006. Genotype analysis of *Cryptosporidium* spp. prevalent in a rural village in Hwasun-gun, Republic of Korea. *Korean J. Parasitol.* 44, 27-33.
- Pasetti, M.F., Simon, J.K., Sztein, M.B., Levine, M.M., 2011. Immunology of gut mucosal vaccines. *Immunol. Rev.* 239, 125–148.
- Pavlásek, I., Láviczková, M., Horák, P., Král, B., 1995. *Cryptosporidium varanii* n.sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae) in Emerald monitor (*Varanus prasinus* Schlegel, 1983) in captivity in Prague Zoo. *Gazelle.* 22, 99-108.
- Paze Silva, F.M., Lopes, R.S., Bresciani, K.D.S., Amarante, A.F.T., Araujo, J.P., 2014. High occurrence of *Cryptosporidium ubiquitum* and *Giardia duodenalis* genotype E in sheep from Brazil. *Acta Parasitol.* 59, 193–196.
- Peeters, J.E., Mazás, E.A., Masschelein, W.J., Villacorta Martiez de Maturana, I., Debacker, E., 1989. Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1519–1522.
- Peeters, J.E., Villacorta, I., Vanopdenbosch, E., Vandergheynst, D., Naciri, M., Ares-Mazás, E., Yvoré, P., 1992. *Cryptosporidium parvum* in calves: kinetics and immunoblot analysis of specific serum and local antibody responses (immunoglobulin A [IgA], IgG, and IgM) after natural and experimental infections. *Infect. Immun.* 60, 2309-2316.
- Peeters, J.E., Villacorta, I., Naciri, M., Vanopdenbosch, E., 1993. Specific serum and local antibody responses against *Cryptosporidium parvum* during medication of calves with halofuginone lactate. *Infect. Immun.*, 61 (10), 4440-4445.
- Peng, M.M., Meshnick, S.R., Cunliffe, N.A., Thindwa, B.D., Hart, C.A., Broadhead, R.L., Xiao, L., 2003 a. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis in children in Malawi. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50 Suppl: 557-9.
- Peng, M.M., Wilson, M.L., Holland, R.E., Meshnick, S.R., Lal, A.A., Xiao, L., 2003 b. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. *Parasitol. Res.* 90, 175-180.
- Peng, X.-Q., Tian, G.-R., Ren, G.-J., Yu, Z.-Q., Lok, J.B., Zhang, L.-X., Wang, X.-T., Song, J.-K., Zhao, G.-H., 2016. Infection rate of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bienersi* in cashmere, dairy and meat goats in China. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 41, 26–31.
- Perrucci S., Fichi G., Buggiani C., Rossi G., Flamini G., 2006. Efficacy of mangiferin against *Cryptosporidium parvum* in a neonatal mouse model. *Parasitol. Res.*, 99, 184–188.
- Peter, M.G., 1997. Introductory remarks. *Carbohydr Eur* 19: 9–15.
- Petry, F., Jakobi, V., Tessema, T.S., 2010. Host immune response to *Cryptosporidium parvum* infection. *Exp. Parasitol.* 126, 304-309.
- Platts-Mills, J.A., Babji, S., Bodhidatta, L., Gratz, J., Haque, R., Havt, A., McCormick, B. J., McGrath, M., Olortegui, M.P., Samie, A., Shakoor, S., Mondal, D., Lima, I.F., Hariraju, D., Rayamajhi, B.B., Qureshi, S., Kabir, F., Yori, P.P., Mufamadi, B., Amour, C., Carreon, J.D., Porporatto, C., Bianco, I.D., and Correa, S.G., 2005. Local and systemic activity of the polysaccharide chitosan at lymphoid tissues after oral administration. *J Leukoc Biol* 78: 62–69.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Power, M.L., Ryan, U.M., 2008.** A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *J. Parasitol.* 94, 1114-1117.
- Pozio E, Gomez Morales MA, Barbieri FM, La Rosa G., 1992.** *Cryptosporidium*: different behavior in calves of isolates of human origin. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 86, (6) 636-8.
- Pozio, E., Morales, M.A., 2005.** The impact of HIV-protease inhibitors on opportunistic parasites. *Trends. Parasitol.* 21, 58-63.
- Puiu, D., Enomoto, S., Buck, G.A., Abrahamsen, M.S., Kissinger, J.C., 2004.** CryptoDB: the *Cryptosporidium* genome resource. *Nucleic Acids Res* 32, D329-331.
- Putignani, L., Menichella, D., 2010.** Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. *Interdiscip Perspect Infect Dis.*
- Quílez, J., Sánchez-Acedo, C., del Cacho, E., Clavel, A., Causapé, A.C., 1996.** Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragón (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* 66, 139-146.
- Quilez, J., Torres, E., Chalmers, R.M., Hadfield, S.J., del Cacho, E., Sanchez-Acedo, C., 2008.** *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in lambs and goat kids in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6026–6031.
- Quílez, J., Vergara-Castiblanco, C., Monteagudo, L., Del Cacho, E., Sánchez-Acedo, C., 2011.** Multilocus fragment typing and genetic structure of *Cryptosporidium parvum* Isolates from diarrheic preweaned calves in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7779-7786.
- Raafat, D., Sahl, H., 2009.** Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey. *Microb. Biotechnol.* 2, 186–201.
- Rabea, E.I., Badawy, M.E.-T., Stevens, C.V., Smagghe, G., and Steurbaut, W., 2003.** Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4: 1457–1465.
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD., 2007.** *Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats.* 10th edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, 1512-1515.
- Rahmouni, I., Essid, R., Aoun, K., Bouratbine, A., 2014.** Glycoprotein 60 diversity in *Cryptosporidium parvum* causing human and cattle cryptosporidiosis in the rural region of northern Tunisia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 90, 346–350. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0522>. Read, C.M., Monis, P.T.,
- Ralston, B.J., McAllister, T.A., Olson, M.E., 2003.** Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. *Vet. Parasitol.* 114, 113-122.
- Ramirez, N.E., Ward, L.A., Sreevatsan, S., 2004.** A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes. Infect.* 6, 773-785.
- Ranjbar, R., Fattahi, R., 2017.** Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in calves under one year old in Ilam county (Iran), from March 2014 to February 2015. *Electron. Physician* 9, 4631–4635.
- Rasmussen, K.R., Healey, M.C., 1992.** Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in immunosuppressed adult mice. *Infect. Immun.* 60, 1648–1652.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Razakandrainibe R., Diawara E.H., Costa D., Le Goff L., Lemeteil D., Ballet J.J., Gargala G., Favennec L., 2018.** Common occurrence of *Cryptosporidium hominis* in asymptomatic and symptomatic calves in France. *PLOS Neglected Tropical Diseases*.
- Rehg JE (1991).** Activity of Azithromycin against *Cryptosporidia* in Immunosuppressed Rats. *J. Infect. Dis.*, **163**, 1293-1296.
- Ren, X., Zhao, J., Zhang, L., Ning, C., Jian, F., Wang, R., Lv, C., Wang, Q., Arrowood, M.J., Xiao, L., 2012.** *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp. Parasitol.* **130**, 274-281.
- Richard, S.A., Lang, D., Bessong, P., Mduma, E., Ahmed, T., Lima, A.A., Mason, C.J., Zaidi, A.K., Bhutta, Z.A., Kosek, M., Guerrant, R.L., Gottlieb, M., Miller, M., Kang, G., Houpt, E.R., Investigators, M.-E.N., 2015.** Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). *Lancet. Glob. Health* (3) e564–e575.
- Rider, S. D., Jr., and Zhu, G., 2010.** *Cryptosporidium*: genomic and biochemical features. *Exp Parasitol* **124**(1), 2-9.
- Rieux, A., Chartier, C., Pors, I., Delafosse, A., Paraud, C., 2013a.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from high-excreting young dairy calves in dairy cattle herds in Western France. *Parasitol. Res.* **112**, 3423–3431.
- Rieux, A., Chartier, C., Pors, I., Paraud, C., 2013b.** Dynamics of excretion and molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates in pre-weaned French beef calves. *Vet. Parasitol.* **195**, 169–172.
- Rieux, A., Paraud, C., Pors, I., Chartier, C., 2013c.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pre-weaned calves in western France in relation to age. *Vet. Parasitol.* **197**, 7–12.
- Rieux, A., Paraud, C., Pors, I., Chartier, C., 2014.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from beef calves under one month of age over three successive years in one herd in western France. *Vet. Parasitol.* **202**, 171–179.
- Riggs, M.W., Stone, A.L., Yount, P.A., Langer, R.C., Arrowood, M.J., Bentley, D.L., 1997.** Protective monoclonal antibody defines a circumsporozoite-like glycoprotein exoantigen of *Cryptosporidium parvum* sporozoites and merozoites. *J Immunol* **158**, 1787-1795.
- Riggs, M.W., McNeil, M.R., Perryman, L.E., Stone, A.L., Scherman, M.S., O'Connor, R.M., 1999.** *Cryptosporidium parvum* sporozoite pellicle antigen recognized by a neutralizing monoclonal
- Riggs, M.W., 2002.** Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response. *Microbes. Infect.* **4**, 1067-1080.
- Ripert, C., Guyot, K., 2003.** Cryptosporidiose. In *Epidemiologie des maladies parasitaires* vol. 3, pp. 269-297. Editions médicales internationales
- Robertson, L.J., Campbell, A.T., Smith, H.V., 1992.** Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3494-3500.
- Robertson, L.J., 2009.** *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in sheep and goats: a review of the potential for transmission to humans via environmental contamination. *Epidemiol. Infect.* **137**, 913–921.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Robertson, L.J., Gjerde, B.K., Furuseth Hansen, E., 2010.** The zoonotic potential of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian sheep: a longitudinal investigation of 6 flocks of lambs. *Vet. Parasitol.* 171, 140-145.
- Robertson LJ, Bjorkman C, Axen C, Fayer R. 2014.** Cryptosporidiosis in farmed animals, in *Cryptosporidium: parasite and disease*. Cacciò SM, Widmer G, Editors. Springer-Verlag: Wien. p. 149–235.
- Robinson, G., Wright, S., Elwin, K., Hadfield, S.J., Katzer, F., Bartley, P.M., Hunter, P.R., Nath, M., Innes, E.A., Chalmers, R.M., 2010.** Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. *Int. J. Parasitol.* 40,1539-1548.
- Robinson, G., Chalmers, R.M., 2012.** Assessment of polymorphic genetic markers for multi-locus typing of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Exp. Parasitol.* 132, 200-215.
- Roffet, C., Valognes, A., Chauvin, A., Fournier, R., 2005. Enquête de prévalence de la cryptosporidiose dans les élevages ovins et bovins des Pyrénées Atlantiques. Comparaison de deux méthodes d'analyse de *Cryptosporidium parvum*. Recueil des Journées nationales des GTV, Nantes, 25-27 mai 2005 :341-347.
- Roller, S., 2003.** Chitosan: new food preservative or laboratory curiosity? In *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods*. Roller, S. (ed.). Cambridge, UK: Woodhead Publishing, pp. 158–175.
- Romero-Salas D, Alvarado-Esquivel C, Cruz-Romero A, Aguilar-Domínguez M, Ibarra-Priego N, Merino-Charrez JO., et al. 2016.** Prevalence of *Cryptosporidium* in small ruminants from Veracruz, Mexico. *BMC Vet Res.*12,14.
- Rosales, M.J., Perez-Cordon, G., Sanchez-Moreno, M., Marin-Sanchez, C., Mascaró, C., 2005.** Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. *Acta Tropica* 95, 74–78.
- Rossignol JF, Hidalgo H, Feregrino M, Higuera F, Gomez WH, Romero J.L,1998.** A double-‘blind’ placebo-controlled study of nitazoxanide in the treatment of cryptosporidial diarrhoea in aids patients in mexico. *t. roy. soc. trop. med. h.*, **92**, 663-666.
- Rossignol, J.F., Ayoub, A., Ayers, M.S., 2001.** Treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum*: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled study of Nitazoxanide. *J. Infect. Dis.* 184, 103-106.
- Rossignol, JF., (2006).** Nitazoxanide in the treatment of acquired immune deficiency syndrome-related cryptosporidiosis: results of the United States compassionate use program in 365 patients. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **24**, 887–894.
- Ruest N, Faubert GM, Couture Y., 1998.** Prevalence and geographical distribution of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in dairy farms in Quebec. *Can Vet J.* 39:697-700.
- Ryan, U.M., Xiao, L., Read, C., Sulaiman, I.M., Monis, P., Lal, A.A., Fayer, R., Pavlasek, I., 2003.** A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *J. parasitol.* 89, 809-813.
- Ryan, U. M., Bath, C., Robertson, I., Read, C., Elliot, A., Mcinnes, L., Traub, R., Besier, B., 2005.** Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4992-4997.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Ryan, U.M., Power, M., Xiao, L., 2008.** *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *J. Eukaryot. Microbiol.* 55, 22-26.
- Ryan, U., Cacciò, S.M., 2013. Zoonotic potential of *Giardia*. *Int. J. Parasitol.* 43, 943–956.
- Ryan, U., Fayer, R., Xiao, L. 2014.** *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology* 141 (13) 1667-1685.
- Ryan, U., and Hijjawi, N., 2015.** New developments in *Cryptosporidium* research. *International Journal for Parasitology.* (45) 367–373
- Ryan, U., Paparini, A., Monis, P., Hijjawi, N., 2016.** It's official-*Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? *Water Research* (105) 305-313
- Sagoo, S.K., Board, R., and Roller, S., 2002.** Chitosan potentiates the antimicrobial action of sodium benzoate on spoilage yeasts. *Lett Appl Microbiol* 34: 168–172.
- Sallon, S., Deckelbaum, R.J., Schmid, II, Harlap, S., Baras, M., Spira, D.T., 1988.** *Cryptosporidium*, malnutrition, and chronic diarrhea in children. *Am J Dis Child* 142, 312-315.
- Samra NA, Jori F, Cacciò SM, Frea J, Poonsamy B, Thompson PN., 2016.** *Cryptosporidium* genotypes in children and calves living at the wildlife or livestock interface of the Kruger National Park, South Africa. *Onderstepoort J Vet Res.* 83(1),1–7.
- Sanford, SE., Josephson, GKA., 1982.** Bovine cryptosporidiosis: clinical and pathological findings in 42 scouring neonatal calves. *Can Vet J.* 23 (12), 343-7.
- Santín, M., Trout, J., Xiao, L., Zhou, L., Greiner, E., Fayer, R., 2004.** Prevalence and age related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet. Parasitol.* 122, 103-117.
- Santín, M., Trout, J.M., Fayer, R., 2007.** Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. *Vet. Parasitol.* 146, 17-24.
- Santín, M., Trout, J.M., Fayer, R., 2008.** A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Vet. Parasitol.* 155, 15-23.
- Saxon, A., Weinstein, W., 1987. Oral administration of bovine colostrum anti-cryptosporidia antibody fails to alter the course of human cryptosporidiosis. *J. Parasitol.* 73, 413-415.
- Santín, M., and Trout, J.M., 2008.** Cryptosporidiosis of Livestock. In: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, Fayer, R., Xiao, L. (editors) 2nd edition. *CRC Press, Florida*, pp 451-483.
- Sateriale, A., Striepen, B., 2016.** Beg, borrow and steal: three aspects of horizontal gene transfer in the protozoan parasite, *Cryptosporidium parvum*. *PLoS Pathog.* 12, e1005429.
- Schneider, A., 1875.** Note sur la psorospermies oviformes du poulpe. *Archives de Zoologie Experimentale et Generale.* (9), 387–404.
- Schnyder, M., Kohler, L., Hemphill, A., Deplazes, P., 2009.** Prophylactic and therapeutic efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves. *Vet. Parasitol.*, 160, 149–154.
- Schupfner, M., Greif, G., Lendner, M., Dauschies, A., Lippuner, C., von Samson-Himmelstjerna, G., Krücken, J., 2013.** Evaluation of putative anti-cryptosporidial drugs in an *in vitro* culture system. *Parasitol. Res.* 112 (Suppl. 1), 149–162.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Semmani, M., Costa, D., Razik, F., Favennec, L., Hamoudi, H A., Razakandrainibe R., 2019.** First genotypic characterization of *Cryptosporidium* spp. from Algerian HIVinfected/AIDS patients. Congress, 29th ECCMID 13-16 april 2019 amsterdam, netherlands.
- Shahiduzzaman M, Dyachenko V, Obwaller A, Unglaube S, Dauschies A 2009(b).** Combination of cell culture and quantitative PCR for screening of drugs against *Cryptosporidium parvum*. *Vet. Parasitol.*, **162**, 271-277.
- Shahiduzzaman, M., Dauschies, A., 2012.** Therapy and prevention of cryptosporidiosis in animals. *Vet. Parasitol.* 188, 203-214.
- Sharma, P., Sharma, A., Sehgal, R., Malla, N., and Khurana, S. (2013).** Genetic diversity of *Cryptosporidium* isolates from patients in North India. *Int J Infect Dis* 17(8), e601-5.
- Sherwood, D. K., Angus, K. W., Snodgrass, D. R., and Tzipori, S., 1982.** Experimental cryptosporidiosis in laboratory mice. *Infect .immun.* (38) 471-475.
- Sheoran, A., Wiffin, A., Widmer, G., Singh, P., Tzipori, S., 2012.** Infection with *Cryptosporidium hominis* provides incomplete protection of the host against *Cryptosporidium parvum*. *J. Infect. Dis.* 205, 1019–1023.
- Silverlås, C., Björkman, C., Egenvall, A., 2009.** Systematic review and meta-analyses of the effects of halofuginone against calf cryptosporidiosis. *Prev.Vet. Med.* 91, 73-84.
- Silverlås, C., Näslund, K., Björkman, C., Mattsson, J.G., 2010 a.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from Swedish dairy cattle in relation to age, diarrhea and region. *Vet. Parasitol.* 169, 289–295.
- Silverlås, C., de Verdier, K., Emanuelson, U., Mattsson, J.G., Björkman, C., 2010 b.** *Cryptosporidium* infection in herds with and without calf diarrhoeal problems. *Parasitol. Res.* 107, 1435-1444.
- Silverlås, C., Blanco-Penedo, I., 2012.** *Cryptosporidium* spp. in calves and cows from organic and conventional dairy herds. *Epidemiol. Infect.* 8, 1-11.
- Silverlås, C., Bosaeus-Reineck, H., Näslund, K., Björkman, C., 2013.** Is there a need for improved *Cryptosporidium* diagnostics in Swedish calves? *Int. J. Parasitol.* 43, 155-161.
- Singla, A.K., and Chawla, M., 2001.** Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update. *J Pharm Pharmacol* **53**: 1047–1067.
- Siwila J, Phiri IG, Vercruyssen J, Goma F, Gabriel S, Claerebout E, et al., 2007.** Asymptomatic cryptosporidiosis in Zambian dairy farm workers and their household members. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 101(7), 733–4.
- Skotarczak B., 2010.** Progress in the molecular methods for the detection and genetic characterization of *Cryptosporidium* in water samples. *Annales agricultural an environmental medicine AAEM.* 17(1) 1-8.
- Slapeta J., 2013.** Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: A thirty colour rainbow?. *Int. J. Parasitol.*, 2013, **43**, 957-970.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Slavin, D., 1955.** *Cryptosporidium meleagridis* (sp.nov.) *J. Comp. Pathol.* 65, 262-266
- Smith HV, Rose JB., 1998.** Waterborne cryptosporidiosis: current status. *Parasitol Today.* 14(1):14-22.
- Smith, H.V., Nichols, R.A., Mallon, M., Macleod, A., Tait, A., Reilly, W.J., Browning, L.M., Gray, D., Reid, S.W., Wastling J.M., 2005. Natural *Cryptosporidium hominis* infections in Scottish cattle. *Vet. Rec.* 156, 710-711.
- Smith, H.V., Cacciò, S.M., Tait, A., McLauchlin, J., Thompson, R.C., 2006 b.** Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends. Parasitol.* 22, 160-167.
- Smith, H.V., Nichols, R.A., 2010.** *Cryptosporidium*: detection in water and food. *Exp. Parasitol.* 124, 61-79.
- Smith, R.P., Chalmers, R.M., Mueller-Doblies, D., Clifton-Hadley, F.A., Elwin, K., Watkins, J., Paiba, G.A., Hadfield, S.J., Giles, M., 2010.** Investigation of farms linked to human patients with cryptosporidiosis in England and Wales. *Prev.Vet. Med.* 94, 9-17.
- Snodgrass DR., Angus KW., Gray EW, Keir WA., Clerihew LW., 1980.** Cryptosporidia associated with rotavirus and an *Escherichia coli* in an outbreak of calf scour. *Vet Rec.* 106 (22) 458-60.
- Soba, B., Logar, J., 2008.** Genetic classification of *Cryptosporidium* isolates from humans and calves in Slovenia. *Parasitology.* 135, 1236-1270.
- Soltane R, Guyot K, Dei-Cas E, Ayadi A., 2007.** *Cryptosporidium parvum* (Eucoccidiorida: Cryptosporidiidae) in calves: results of a longitudinal study in a dairy farm in Sfax, Tunisia. *Parasite.* 14(4):309–12.
- Sow SO, Muhsen K, Nasrin D, Blackwelder WC, Wu Y, Farag TH, Panchalingam S, Sur D, Zaidi AK, Faruque AS, Saha D, Adegbola R., Kotloff KL, Levine MM., et al., 2016.** The burden of *Cryptosporidium* diarrheal disease among children < 24 months of age in moderate/ high mortality regions of Sub-Saharan Africa and South Asia, utilizing data from the Global Enteric Multicenter Study (GEMS). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10, e0004729.
- Spano, F., Putignani, L., Guida, S., Crisanti, A., 1998.** *Cryptosporidium parvum*: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C1 (thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium*-1) gene discriminates between two alleles differentially associated with parasite isolates of animal and human origin. *Exp Parasitol* 90, 195-198.
- Spano, F., Crisanti, A., 2000.** *Cryptosporidium parvum* : the many secrets of a small genome.- *International Journal for Parasitology*, 30, 553-65. Sprong, H., Cacciò, S.M., van der Giessen, J.W.B., ZOOPNET network and partners, 2009. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e558.
- Squire, S. A., and Ryan, U., 2017.** *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and future challenges. *Parasites & Vectors* (10) 195.
- Stachulski AV., Berry NG., Lilian Low AC., Moores SL., Row E, Warhurst DC., 2006.** Identification of Isoflavone Derivatives as Effective Anticryptosporidial Agents *in Vitro* and *in Vivo*. *J. Med. Chem.*, 49, 1450-1454.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Steele, M.I., Kuhls, T.L., Nida, K., Meka, C.S., Halabi, I.M., Mosier, D.A., Elliott, W., Crawford, D.L., Greenfield, R.A., 1995. A *Cryptosporidium parvum* genomic region encoding hemolytic activity. *Infect Immun* 63, 3840-3845.
- Striepen, B., Pruijssers, A.J., Huang, J., Li, C., Gubbels, M.J., Umejiego, N.N., Hedstrom, L., Kissinger, J.C., 2004. Gene transfer in the evolution of parasite nucleotide biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3154-3159.
- Strong, W.B., Gut, J., Nelson, R.G., 2000. Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. *Infect. Immun.* 68, 4117-4134.
- Sturbaum, G.D., C. Reed, P.J., Hoover, B.H., Jost, M.M., Marshall, and C. R. Sterling. 2001. Species-specific, nested PCR-restriction fragment length polymorphism detection of single *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2665-2668.
- Striepen, B., 2013. Parasitic infections: time to tackle cryptosporidiosis. *Nature* 503, 189–191.
- Suarez-Luengas, L., Clavel, A., Quilez, J., Goni-Cepero, M.P., Torres, E., Sanchez-Acedo, C., del Cacho, E., 2007. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* 148, 231–235.
- Sulaiman, I.M., Lal, A.A., Xiao, L., 2001. A population genetic study of the *Cryptosporidium parvum* human genotype parasites. *J. Eukaryot. Microbiol.* Suppl: 24S-27S.
- Sulaiman, I.M., Fayer, R., Bern, C., Gilman, R.H., Trout, J.M., Schantz, P.M., Das, P., Lal, A.A., Xiao, L., 2003. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 1444–1452.
- Sulaiman, I.M., Hira, P.R., Zhou, L., Al-Ali, F.M., Al-Shelahi, F.A., Shweiki, H.M., Iqbal, J., Khalid, N., Xiao, L., 2005. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J. Clin. Microbiol.* (43) 2805–2809.
- Sulzyc-Bielicka, V., Kuzna-Grygiel, W., Kolodziejczyk, L., Bielicki, D., Kladny, J., Stepień-Korzonek, M., and Telatynska-Smieszek, B., 2007. Cryptosporidiosis in patients with colorectal cancer. *J Parasitol* 93(3), 722-4.
- Suzuki, S., 2000. Biological effects of chitin, chitosan, and their oligosaccharides. *Biotherapy* 14: 965–971.
- Sweeny, J.P., Ryan, U.M., Robertson, I.D., Yang, R., Bell, K., Jacobson, C., 2011. Longitudinal investigation of protozoan parasites in meat lamb farms in southern Western Australia. *Prev. Vet. Med.* 101, 192-203.
- Taghipour, N., Nazemalhosseini-Mojarad, E., Haghighi, A., Rostami-Nejad, M., Romani, S., Keshavarz, A., Alebouyeh, M., and Zali, M., 2011. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis in Iranian children, tehran, iran. *Iran J Parasitol* 6(4), 41-5.
- Tanriverdi, S., Arslan, M.O., Akiyoshi, D.E., Tzipori, S., Widmer, G., 2003. Identification of genotypically mixed *Cryptosporidium parvum* populations in humans and calves. *Mol. Biochem. Parasitol.* 130, 13–22.
- Tharanathan, R.N., and Kittur, F.S., 2003. Chitin – the undisputed biomolecule of great potential. *Crit Rev Food Sci Nutr* 43: 61–87.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Theodos CM, Griffiths JK, D'Onfro J, Fairfield A, Tzipori, S., 1998.** Efficacy of Nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in Cell Culture and in Animal Models. *Antimicrob. Agents Ch.*, **42** (8), 1959–1965.
- Thompson R.C.A. et Ash, A., 2016.** Molecular epidemiology of Giardia and Cryptosporidium infections. *Infection, Genetics and Evolution.* (40) 315–323.
- Thomson, S., Hamilton, C.A., Hope, J.C., Katzer, F., Mabbott, N.A., Morrison, L.J., Innes, E.A., 2017.** Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. *Vet. Res.* 48.
- Takashima Y., Xuan X., Kimata I., Iseki M., Kodama Y., Nagane N., et al. (2003).** Recombinant Bovine Herpesvirus-1 Expressing p23 Protein of *Cryptosporidium parvum* induces Neutralizing Antibodies in Rabbits. *J. Parasitol.*, **89** (2), 276-282.
- Takeuchi, D., Jones, V.C., Kobayashi, M., Suzuki, F., 2008.** Cooperative role of macrophages and neutrophils in host Antiprotozoan resistance in mice acutely infected with *Cryptosporidium parvum*. *Infect. Immun.* 76, 3657–3663.
- Tanriverdi, S., Tanyeli, A., Ba lami li, F., Köksal, F., Kiliç, Y., Feng, X., Batzer, G., Tzipori, S., Widmer, G., 2002.** Detection and genotyping of oocysts of *Cryptosporidium parvum* by real-time PCR and melting curve analysis. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3237-3244.
- Tanriverdi, S., Widmer, G., 2006.** Differential evolution of repetitive sequences in *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Infect. Genet. Evol.* 6,113-122.
- Tanriverdi, S., Markovics, A., Arlsan, M.O., Itik, A., Shkap, V., Widmer, G., 2006.** Emergence of distinct genotypes of *Cryptosporidium parvum* in structured host population. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2507-2513.
- Tanriverdi, S., Grinberg, A., Chalmers, R.M., Hunter, P.R., Petrovic, Z., Akiyoshi, D.E., London, E., Zhang, L., Tzipori, S., Tumwine, J.K., Widmer, G., 2008.** Inferences about the global population structures of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7227-7234.
- Templeton, T.J., Lancto, C.A., Vigdorovich,V., Liu, C., London, N.R., Hadsall, K.Z., Abrahamsen, M.S., 2004.** The *Cryptosporidium* oocyst wall protein is a member of a multigene family and has a homolog in *Toxoplasma*. *Infect. Immun.* 72, 980-987.
- Templeton, T. J., Enomoto, S., Chen, W. J., Huang, C. G., Lancto, C. A., Abrahamsen, M. S., and Zhu, G., 2010.** A genome-sequence survey for *Ascogregarina taiwanensis* supports evolutionary affiliation but metabolic diversity between a Gregarine and *Cryptosporidium*. *Mol Biol Evol* 27(2), 235-48.
- Thompson RC, Lymberry AJ., 1996.** Genetic Variability in parasites and host-parasite interactions. *Parasitol*, (112) 7-22.
- Thompson, R.C.A., 2004.** Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 4, 125–130.
- Thompson, R.C.A., 2004.** The zoonotic significance and molecular epidemiology of Giardia and giardiasis. *Vet. Parasitol.* 126, 15–35.
- Thompson RCA., Koh, W., Clode, P., 2016.** *Cryptosporidium* — What is it? *Food and Waterborne Parasitology.* (4), 54-61

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Tomazic ML, Rodriguez AE, Lombardelli J, Poklepovich T(1), Garro C(2), Galarza R(4), Tiranti K(3), Florin-Christensen M, Schnittger L., 2018.** Identification of novel vaccine candidates against cryptosporidiosis of neonatal bovines by reverse vaccinology. Volume (264), 74-78.
- Toso, M. A., and Omoto, C. K., 2007.** Gregarina niphandrodes may lack both a plastid genome and organelle. J Eukaryot Microbiol 54(1), 66-72.
- Travaillé, E., La Carbonab, Gargalac, G., Aubertd, D., Guyote, K., Villenad, I., Houssin H., 2016.** Development of a qRT-PCR method to assess the viability of *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium spp.* and *Toxoplasma gondii* oocysts. Food Control 59 (2016) 359e365
- Troell, K., Hallstrom, B., Divne, A.M., Alsmark, C., Arrighi, R., Huss, M., Beser, J., Bertilsson, S., 2016.** Cryptosporidium as a testbed for single cell genome characterization of unicellular eukaryotes. BMC Genomics 17, 471.
- Trotz-Williams, L.A., Jarvie, B.D., Martin, S.W., Leslie, K.E., Peregrine, A.S., 2005 a.** Prevalence of Cryptosporidium parvum infection in southwestern Ontario and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. Can. Vet. J. 46, 349-351
- Trotz-Williams, L.A., Martin, S.W., Martin, D., Duffield, T., Leslie, K.E., Nydam, D.V., Jamieson, F., Peregrine, A.S., 2005 b.** Multiattribute evaluation of two simple tests for the detection of Cryptosporidium parvum in calf faeces. Vet. Parasitol. 134, 15-23.
- Trotz-Williams, L.A., Martin, D.S., Gatei, W., Cama, V., Peregrine, A.S., Martin, S.W., Nydam, D.V., Jamieson, F., Xiao, L., 2006.** Genotype and subtype analyses of Cryptosporidium isolates from dairy calves and humans in Ontario. Parasitol. Res. 99, 346-352.
- Trotz-Williams, L.A., Wayne Martin, S., Leslie, K.E., Duffield, T., Nydam, D.V., Peregrine, A.S., 2007.** Calf level risk factors for neonatal diarrhea and shedding of Cryptosporidium parvum in Ontario dairy calves. Prev. Vet. Med. 82, 12-28.
- Trotz-Williams, L.A., Leslie, K.E., Peregrine, A.S., 2008.** Passive immunity in Ontario dairy calves and investigation of its association with calf management practices. J. Dairy. Sci. 91, 3840-3849.
- Trotz-Williams, L.A., Jarvie, B.D., Peregrine, A.S., Duffield, T.F., Leslie, K.E., 2011.** Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in dairy calves. Vet Rec. 14, 168(19):509
- Tumwine JK, et al., 2005.** Cryptosporidiosis and microsporidiosis in ugandan children with persistent diarrhea with and without concurrent infection with the human immunodeficiency virus. Am J Trop Med Hyg. (73) 921-925.
- Tyzzar, E.E., 1907.** A sporozoan found in the peptic gland of the common mouse. Proc. Soc. Exp. Biol. Med 5,12.
- Tyzzar E.E., 1910.** An extracellular coccidium, Cryptosporidium muris (ge. Etsp.nov.) of the gastric gland of the common mouse. J. Med. Res. 23, 487-509.
- Tyzzar, E.E., 1912.** Cryptosporidium parvum (sp. Nov), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Arch Protisenkd 26.
- Tzanidakis, N., Sotiraki, S., Claerebout, E., Ehsan, A., Voutzourakis, N., Kostopoulou, D., Stijn, C., Vercruyssen, J., Geurden, T., 2014.** Occurrence and molecular characterization of Giardia duodenalis and Cryptosporidium spp. in sheep and goats reared under dairy husbandry systems in Greece. Parasite Paris Fr. 21, 45.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Tzipori S., Halpin C., Angus KW., Sherwood D., Campbell I., 1983.** Experimental cryptosporidiosis in calves: clinical manifestations and pathological findings. *Vet Rec.* (112)116-120.
- Tzipori, S., 1983.** Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiol. Rev.* 47, 84-96.
- Tzipori, S., 1988.** Cryptosporidiosis in perspective. *Adv. Parasitol.* 27, 63-129.
- Tzipori, S., 1998.** Cryptosporidiosis: Laboratory Investigations and Chemotherapy. *Adv. Parasit.*, **40**, 187-221.
- Uhl, E. W., Jacobson, E., Bartick, T. E., Micinilio, J., and Schimdt, R. (2001). Auralpharyngeal polyps associated with *Cryptosporidium* infection in three iguanas (*Iguana iguana*). *Vet Pathol* 38(2), 239-42.
- Ungar, B.L., Soave, R., Fayer, R., Nash, T.E., 1986.** Enzyme immunoassay detection of immunoglobulin M and G antibodies to *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunocompromised persons. *J. Infect. Dis.* 153, 570-578.
- Ungar, B.L., Kao, T.C., Burris, J.A., Finkelman, F.D., 1991.** *Cryptosporidium* infection in an adult mouse model. Independent roles for IFN-gamma and CD4+ T lymphocytes in protective immunity. *J. Immunol.* 147, 1014-1022.
- Usluca, S., and Aksoy, L. 2011.** Detection and genotyping of *Cryptosporidium* spp. In diarrheic stools by PCR/RFLP analyses. *Turk J Med Sci* 41(6), 1029-1036.
- Verdon R, Polianski J, Gaudebout C, Marche C, Garry L, Carbon C., 1995.** Evaluation of High-Dose Regimen of Paromomycin against Cryptosporidiosis in the Dexamethasone-Treated Rat Model. *Antimicrob. Agents Ch.*, **39** (9), 2155–2157.
- Vesikari, T., 2012.** Rotavirus vaccination: a concise review. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 57–63.
- Vetterling, J.M., Jarvis, H.R., Merrill, T.G., Sprinz, H., 1971.** *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. *J. Protozool.* 18, 243-247.
- Vieira, L.S., Silva, M.B., Tolentino, A.C., Lima, J.D., Silva, A.C., 1997. Outbreak of cryptosporidiosis in dairy goats in Brazil. *Vet. Rec.* 140, 427-428.
- Viel, H., Rocques, H., Martin, J., Chartier, C., 2007.** Efficacy of nitazoxanide against experimental cryptosporidiosis in goat neonates. *Parasitol. Res.* 102, 163-166.
- Villacorta, I., Peeters, J.E., Vanopdenbosch, E., Ares-Mazas, E., Theys, H., 1991.** Efficacy of halofuginone lactate against *C. parvum* in calves, *Antimicrobs. Agents. Chemother.* 35, 283-287.
- Villeneuve A., 2003.** Les zoonoses parasitaires. Les Presses de l'Université de Montréal. 499 pp.
- Viu, M., Quílez, J., Sánchez-Acedo, C., del Cacho, E., López-Bernad, F., 2000.** Field trial on the therapeutic efficacy of paromomycin on natural *Cryptosporidium parvum* infections in lambs. *Vet. Parasitol.* 90, 163–170.
- Wade SE., Mohammed HO., Schaaf SL., 2000.** Prevalence of *Giardia* sp., *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris* in 109 dairy herds in five counties of southeastern New York. *Vet Parasitol.*; 93, 1-11.
- Wang, Y., Feng, Y., Cui B, Jian F., Ning, C., Wang, R., Zhang, L., Xiao, L., 2010.** Cervine genotype is the major *Cryptosporidium* genotype in sheep in China. *Parasitol. Res.* 106, 341-347.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Wang C, Luo J, Amer S, Guo Y, Hu Y, Lu Y et al., 2011.** Multivalent DNA vaccine induces protective immune responses and enhanced resistance against *Cryptosporidium parvum* infection. *Vaccine*, **29**, 323–328.
- Wang, R., Zhang, L., Axen, C., Bjorkman, C., Jian, F., Amer, S., Liu, A., Feng, Y., Li, G., Lv, C., Zhao, Z., Qi, M., Dong, H., Wang, H., Sun, Y., Ning, C., Xiao, L., 2014.** *Cryptosporidium parvum* IId family: clonal population and dispersal from Western Asia to other geographical regions. *Sci. Rep.* **4**, 4208.
- Ward, L.A., Wang, Y., 2001.** Rapid methods to isolate *Cryptosporidium* DNA from frozen feces for PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **41**, 37–42.
- Ward, P.I., Deplazes, P., Regli, W., Rinder H., Mathis, A., 2002.** Detection of eight *Cryptosporidium* genotypes in surface and waste waters in Europe. *Parasitol.* **124**, 359–368.
- Watarai, S., Tana, Koiwa, M., 2008.** Feeding activated charcoal from bark containing wood vinegar liquid (nekka-rich) is effective as treatment for cryptosporidiosis in calves. *J. Dairy. Sci.* **91**, 1458–1463.
- Weber, R., Bryan, R.T., Bishop, H.S., Wahlquist, S.P., Sullivan, J.J., Juranek, D.D., 1991.** Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 1323–1327.
- Webster, K.A., Smith, H.V., Giles, M., Dawson, L., Robertson, L.J., 1996.** Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in faeces: comparison of conventional coproscopical methods and the polymerase chainreaction. *Vet. Parasitol.* **61**, 5–13.
- Gegrzyn G, Jakobkiewicz-banecka J, Gabig-ciminska M, Piotrowska E, Narajczyk M, Kloska A, et al.** Genistein: a natural isoflavone with a potential for treatment of genetic diseases (2010). *Biochem Soc Trans.*, **38**(2), 695–701.
- Wehkamp, J., Wang, G., Kubler, I., Nuding, S., Gregorieff, A., Schnabel, A., Kays, R.J., Fellermann, K., Burk, O., Schwab, M., Clevers, H., Bevins, C.L., Stange, E.F., 2007.** The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J. Immunol.* **179**, 3109–3118.
- Wheeler, C., Vugia, D. J., Thomas, G., Beach, M. J., Carnes, S., Maier, T., Gorman, J., Xiao, L., Arrowood, M. J., Gilliss, D., and Werner, S. B., 2007.** Outbreak of cryptosporidiosis at a California waterpark: employee and patron roles and the long road towards prevention. *Epidemiol Infect* **135**(2), 302–10.
- Widmer, G., 2009.** Meta-analysis of a polymorphic surface glycoprotein of the parasitic protozoa *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Epidemiol. Infect.* **137**
- Widmer, G., and Sullivan, S., 2012.** Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. *Parasite Immunol* **34**(2-3), 61–7.
- Wielinga, P.R., de Vries, A., van der Goot, T.H., Mank, T., Mars, M.H., Kortbeek, L.M., van der Giessen, J.W., 2008.** Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in human and cattle in the Netherlands. *Int. J. parasitol.* **38**, 809–817.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Woodmansee, D.B., Pohlenz, J.F., 1983.** Development of *Cryptosporidium* sp. in a human rectal tumor cell line. In: Proceedings of the 4th International Symposium on Neonatal Diarrhea. University of Saskatchewan, Canada.
- Wu L, Jiang XG., Shen YJ., Lu ZX., Tu GH., Fu XL.,2011).** Efficacy of ginkgolic acids against *Cryptosporidium andersoni* in cell culture. *Parasitol. Res.*, **109**, 1475–1479.
- Wyatt, C.R., Riggs, M.W., Fayer, R., 2010.** Cryptosporidiosis in neonatal calves. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 26, 89-103.
- Xiao, L., Herd, R.P., 1993.** Quantitation of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples by direct immunofluorescence assay. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2944-29446.
- Xiao L, Herd RP, McClure KE 1994.** Periparturient rise in the excretion of *Giardia* sp. Cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts as a source of infection for lambs. *J Parasitol.* 80(1):55-9.111
- Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thomson, R.C., Fayer, R., Lal, A.A., 1999.** Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3386-3391.
- Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, L., Gilman, R.H., Lal, A.A., 2001.** Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J. Infect. Dis.* 183, 492-7.
- Xiao, L., Ryan, U. M., 2004.** Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17, 483-490.
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S J., 2004.** *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 72-97.
- Xiao, L., Zhou, L., Santín, M., Yang, W., and Fayer, R., 2007.** Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States. *Parasitol. Res.* 100, 701-706.
- Xiao, L., and Fayer, R., 2008.** Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int. J. Parasitol.* 38, 1239-1255.
- Xiao, L., and Feng, Y. 2008.** Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52(3), 309-23.
- Xiao, L., 2010.** Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp. Parasitol.* 124, 80-89.
- Xiao, L., and Feng, Y., 2017.** Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Food and Waterborne Parasitology.* (8–9)14–32
- Xie, Y., Zhou, N.J., Gong, Y.F., Zhou, X.J., Chen, J., Hu, S.J., 2007.** Th immune response induced by *H. pylori* vaccine with chitosan as adjuvant and its relation to immune protection. *World J Gastroenterol* **13**: 1547–1553.
- Xu, P., Widmer, G., Wang, Y., Ozaki, L.S., Alves, J.M., Serrano, M.G., Puiu, D., Manque, P., Akiyoshi, D., Mackey, A.J., Pearson, W.R., Dear, P.H., Bankier, A.T., Peterson, D.L., Abrahamsen, M.S., Kapur, V., Tzipori, S., Buck, G.A., 2004.** The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature.* 431, 1107-1112.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Yang, S., Benson, S. K., Du, C., and Healey, M. C., 2000.** Infection of immunosuppressed C57BL/6N adult mice with a single oocyst of *Cryptosporidium parvum*. *J Parasitol* 86(4), 884-7.
- Yang, R., Jacobson, C., Gordon, C., Ryan, U., 2009.** Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in pre-weaned sheep in Australia. *Vet. Parasitol.* 161, 19-24.
- Yang, R., Jacobson, C., Gardner, G., Carmichael, I., Campbell, A.J.D., Ng-Hublin, J., Ryan, U., 2014.** Longitudinal prevalence, oocyst shedding and molecular characterisation of *Cryptosporidium* species in sheep across four states in Australia. *Vet. Parasitol.* 200, 50-58.
- Ye J, Xiao L, Wang Y, Wang L, Amer S., Roellig DM, et al., 2013.** Periparturient transmission of *Cryptosporidium* oocysts from ewes to lambs. *Vet Parasitol.* 197:627-33.
- Yoder, J. S., Harral, C., and Beach, M. J., 2010.** Cryptosporidiosis surveillance – United States, 2006-2008. *MMWR Surveill Summ* 59(6), 1-14.
- Yoder, J. S., Wallace, R. M., Collier, S. A., Beach, M. J., and Hlavsa, M. C., 2012.** Cryptosporidiosis surveillance--United States, 2009-2010. *MMWR Surveill Summ* 61(5), 1-12.
- You, X., Mead, J.R., 1998.** Characterization of experimental *Cryptosporidium parvum* infection in IFN-gamma knockout mice. *Parasitology* 117 (Pt. 6), 525-531.
- Yu, J.-R., Lee, S.-U., Park, W.-Y., 2009.** Comparative sensitivity of PCR primer sets for detection of *Cryptosporidium parvum*. *Korean J. Parasitol.* 47, 293-297.
- Yusof, A.M. and M.L.M. Isa, 2017.** Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* from dairy cattle in five farms in Kuantan. *Malaysian Applied Biol.*, 46: 21-27.
- Zardi EM, Picardi A, Afeltra A 2005.** Treatment of Cryptosporidiosis in Immunocompromised Hosts. *Chemotherapy*, 51, 193-196.
- Zhang, L., Sheoran, A.S., Widmer, G., 2009.** *Cryptosporidium parvum* DNA replication in cell-free culture. *J. Parasitol.* 95, 1239-1242. Zhou R, O'Hara SP, Chen XM. MicroRNA regulation of innate immune responses in epithelial cells. *Cellular and Molecular Immunology.* (8) 371-379.
- Zhang, X. T., Gong, A. Y., Wang, Y., Chen, X., Lim, S. S., and Dolata, C. E. 2016.** *Cryptosporidium parvum* infection attenuates the ex vivo propagation of murine intestinal enteroids. *Physiol. Rep.*
- Zhong Z, Dan J, Yan G, Tu R, Tian Y, Cao S, Shen L, Deng J, Yu S, Geng Y, Gu X, Wang Y, Liu H & Peng G. 2018.** Occurrence and genotyping of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* in pre-weaned dairy calves in central Sichuan province, China. *Parasite* 25, 45.
- Zhou R., Feng Y., Chen XM., 2015.** Non-coding RNAs in epithelial immunity to *Cryptosporidium* infection. *Parasitology.* 2014 September ; 141(10): 1233-1243.
- Zintl, A., Proctor, A. F., Read, C., Dewaal, T., Shanaghy, N., Fanning, S., and Mulcahy, G. 2009.** The prevalence of *Cryptosporidium* species and subtypes in human faecal samples in Ireland. *Epidemiol Infect* 137(2), 270-7.
- Zu, S. X., Fang, G. D., Fayer, R., and Guerrant, R. L., 1992.** Cryptosporidiosis: Pathogenesis and immunology. *Parasitol Today* 8(1), 24-7.

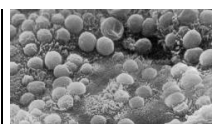
## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---

**Zucatto<sup>1</sup>, A.S., Aquino<sup>1</sup>, M.C.C., Inácio<sup>1</sup>, S.V., Figueiredo<sup>1</sup>, R.N., Pierucci, J.C., Perri, S.H.V., Meireles, M.V., Bresciani, K.D.S., 2015.** Molecular characterisation of *Cryptosporidium* spp. in lambs in the South Central region of the State of São Paulo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.67, n.2.441-446,

***PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES***

---



## **Publications et communications se rapportant à la thèse**

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Recherche ANSES UMR BIPAR/ENVA en France et Laboratoire SPA à l'ENSV Alger sous la direction du Professeur AINBAZIZ Hacina et du Professeur ADJOU Karim. Elle fait référence aux publications et communications suivantes :

### **Publication internationale**

**Sahraoui, L.,** Thomas, M., Chevillot, A., Mammeri, M., Polack, B., Vallée, I., Follet, J., Ain-Baaziz, H., Adjou, K.T., 2019. Molecular characterization of zoonotic *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* pathogens in Algerian sheep. Vet.Parasitol. Reg. Stud. Rep.16, 100280. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100280>

### **Communications nationales et internationales**

**Sahraoui, L.,** Thomas, M., Chevillot, A., Mammeri, M., Julien, C., Polack, B., Vallée, I., Ain-Baaziz, H., Adjou, K.T., Molecular diagnosis and characterization of *Cryptosporidium* spp. in young ruminant in Algeria. Présenté au: “5th european bovine medecine congress”, Bilbao, Espagne, 4-6 /10/ 2017.

**Sahraoui, L.,** Mammeri, M., Chevillot, A., Thomas, M., Polack, B., Julien, C., Vallée, I., Follet, J., Ain-Baaziz, H., Adjou, K.T., Diagnosis and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs in Algeria. Présenté au “the European College of Ruminant Health Management”, Thessaloniki, Grèce, 12/05/2018.

**Sahraoui, L.,** Mammeri, M., Chevillot, A., Thomas, M., Polack, B., Julien, C., Vallée, I., Follet, J., Ain-Baaziz, H., Adjou, K.T., Diagnosis and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in sheep in Algeria. Présenté au: *The 30th World Buiatrics Congress 2018 Sapporo, Japan 28Aug-1sept, 2018.*

**Sahraoui, L.,** Mammeri, M., Chevillot, A., Thomas, M., Polack, B., Julien, C., Vallée, I., Follet, J., Ain-Baaziz, H., Adjou, K.T., Occurrence and genotyping of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* in calves in Algeria. Présenté au: *The 30th World Buiatrics Congress 2018 Sapporo, Japan 28Aug-1sept, 2018.*