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 DE DOCTORAT
ES SCIENCES VETERINAIRES

THEME

CARACTERISATION MOLECULAIRE DE *CRYPTOSPORIDIUM SPP.* ET *MICROSPORIDIA* CHEZ LES EQUIDES EN ALGERIE.

Présenté par : Dr. LAATAMNA Abdelkarim

Le jury :

Présidente: **BOUKHOR S T.K. (Professeur E.N.S.V Alger)**

Promoteur : **AISSI M. (Professeur E.N.S.V Alger)**

Examinateur : **KHELEF DJ. (Professeur E.N.S.V Alger)**

Examinateur: **BOUCHENE Z. (Professeur, Hôpital Beni-Messouss)**

Examinateur: **HAKEM H. (M.C.A Université de Djelfa)**

Année universitaire : 2013/2014.

REMERCIEMENTS

Louange à Dieu, le Miséricordieux, le compatissant. Paix et Salut sur notre Prophète Mohammed.

Je tiens d'abord à adresser mes vifs remerciements au Pr Martin Kvac, chercheur au laboratoire de Protozoologie Vétérinaire et Médicale de l'institut de parasitologie, Tchèque, pour son aide, son soutien et les conseils qu'il m'a toujours donnés.

Je tiens aussi à adresser mes vifs remerciements au Meriem AISSI, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, et la prie de trouver, ici, l'expression de ma reconnaissance et ma sympathie, pour l'assistance et le dévouement sans faille dont elle a toujours fait preuve à mon égard et qui m'a permis d'élaborer le présent mémoire.

Je remercie Madame BOUKHORS T.K., Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury.

Je prie Madame BOUCHENE Z., Professeur à l'hôpital Beni-Messouss, de trouver, ici, l'expression de ma considération et de ma sympathie pour avoir accepté d'être membre du jury.

Je remercie Monsieur KHALEF DJ., Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être membre du jury.

Je remercie Monsieur HAKEM H., Maître de conférences à l'Université de Djelfa, de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être membre du jury.

Un vif remerciement est également adressé à mon frère Dr Houssem, Dr Nadir, Mossaab, Dr Toufik, Dr Zohra, pour l'aide dans la réalisation de la partie expérimentale.

Un vif remerciement est adressé au DANA et SAK qui travaillent dans le laboratoire de Protozoologie Vétérinaire et Médicale de l'institut de parasitologie, Tchèque.

Mes remerciement sont également adressés à Madame ZENIA S, Chargée de cours à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, pour sa disponibilité, les conseils qu'elle n'a jamais cessé de me prodiguer et l'abnégation sans faille qu'elle a déployée pour la finalisation de ce travail.

Abd Elkarim LAATAMNA

Dédicace

A ma mère et mon père, qui se sont sacrifiés pour moi et auxquels je suis redevable pour
les succès que j'ai remportés.

A mes sœurs Saliha, Amria, Hamida, Chahra, Samia, Ahlem et Aziza.

A tous mes amis, particulièrement ; Badri, Riad, Nabil, Djemel, Morad, Hamza, Samir, Mohamed, Bachir, Faicel, Liace, Mohamed Ben guesmia, Arbi, Sofiane, Aziz, Taki, Hafid, Zaki, Bilal, ect.

A mes collègues de promotion de Magistère ; Amar, Kadiro, Fatima, Henia, Yamina.

A mes amis de l'Habitat ; Fouad, Aziz, Akrem, Ahmed, Chawi, Mohamed, Zair, Toufik, Hamza, Abd El kader, Yacine, Hamza.

A mes amis de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire.

A tous ceux là et ceux que je n'ai pas cités, je prie de trouver ici, l'expression de ma gratitude et de mes remerciements.

Abd Elkarim LAATAMNA.

Liste des abréviations

B.B.A : Bourdj Bou Arréridj.

Bp: Base pairs.

COWP: ***Cryptosporidium*** oocyst Wall protein.

E.L.I.S.A: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

GP 60: Glycoprotèine de surface 60.

HIV: Human immunodeficiency virus.

HSP 70: Heat shock protein.

IF: Immunofluorescence.

ICZN: International Code of Zoological Nomenclature.

IFD: Immunofluorescence directe.

IFID: Immunofluorescence indirecte.

ITS: Internal transcribed spacer.

LT CD4+: Lymphocyte T classe de différenciation.

O.I.E: Office international des épizooties.

OPG: Oocyste par gramme.

PCR: Polymerase chain reaction.

rDNA: Ribosomal Deoxyribonucleic acid.

RFLP: Restriction fragment length polymorphism.

rRNA: Ribosomal ribonucleic acid.

SCID: Severe combined immunodeficiency.

SSU: Small subunit.

TRAP-C1: Thrombospondin-related adhesive protein of ***Cryptosporidium***-1.

Liste des tableaux

Tableau 1: Historique des découvertes des différentes espèces de ***Cryptosporidium***.

Tableau 2: Classification et taxonomie de ***Cryptosporidium spp***.

Tableau 3: Différentes génotypes reclassés comme des nouvelles espèces valides.

Tableau 4: Différentes espèces de ***Cryptosporidium*** connues chez les différents hôtes animaux.

Tableau 5: Différentes techniques moléculaires et leurs principales applications.

Tableau 6: Zones rurales et nombre de prélèvements effectués.

Tableau 7: Élevages collectifs et nombre de prélèvements effectués.

Tableau 8: Age e des chevaux et des ânes prélevés.

Tableau 9 : Sexe des chevaux et des ânes prélevés.

Tableau 10: Composition du mélange de PCR (**Master mixe**) pour chaque échantillon.

Tableau 11: Prévalence globale de ***Cryptosporidium spp*** chez les chevaux et les ânes.

Tableau 12: Prévalence de ***Cryptosporidium spp*** selon l'âge des chevaux et des ânes.

Tableau 13 : Prévalence de ***Cryptosporidium spp*** chez les poulains et les jeunes ânes âgés moins de deux ans.

Tableau 14: Prévalence de ***Cryptosporidium spp*** selon le sexe des chevaux et des ânes.

Tableau 15: Espèces et génotypes de ***Cryptosporidium*** identifiés.

Tableau 16: Identité des espèces et génotypes isolés chez les équidés infectés.

Tableau 17: Subtypes des espèces et de génotypes de ***Cryptosporidium*** identifiés.

Tableau 18: Variation du taux d'infection par les microsporidies en fonction de l'âge, sexe et le système d'élevage des chevaux et des ânes prélevés.

Liste des figures

Figure 1: Cycle évolutif de ***Cryptosporidium spp***.

Figure 2: Différentes phases du cycle évolutif de ***Cryptosporidium spp***.

Figure 3: Un sporozoite excystant de l'oocyste.

Figure 4: Début de l'infection de la cellule intestinale par les sporozoites.

Figure 5: Un sporozoite au début de l'invasion de la cellule hôte.

Figure 6: Trophozoite dans son enveloppe parasitophore.

Figure 7: Schizogonie de première génération (méronte de type I) avec 8 mérozoites.

Figure 8: Schizogonie de deuxième génération (méronte de type II) avec 4 mérozoites.

Figure 9: Microgamétocyte mâle avec formation des microgamètes.

Figure 10: Macrogamète mature attachée à la surface épithéliale.

Figure 11: Zygote issu de la fécondation des gamètes femelles par les gamètes mâles.

Figure 12: Zygote avec formation des sporozoites (oocyste sporulé).

Figure 13: L'importance zoonotique des différentes espèces de ***Cryptosporidium***.

Figure14: Certaines approches utilisées dans la détection et la quantification de ***Cryptosporidium spp***.

Figure 15: Certains types de techniques moléculaires permettant l'identification des espèces, génotypes et subtypes de ***Cryptosporidium*.**

Figure 16: Distribution géographique des élevages des chevaux et les zones rurales étudiées.

Figure 17: Jument dans son box, élevée dans la jumentrie de Tiaret.

Figure 18: Poulain nouveau-né élevé dans une région rurale.

Figure 19: Ane élevé dans une région rurale.

Figure 20: Cheval pâturant à proximité des ovins dans une région rurale.

Figure 21: Culot obtenu après la technique de concentration.

Figure 22: Une goutte de culot destinée à la confection d'un frottis.

Figure 23: Frottis de fèces.

Figure 24: Frottis obtenu après la coloration avec la fuschine de Ziehl.

Figure 25: Frottis obtenu après la coloration avec le vert de Malachite.

Figure 26: Instrument FastPrep®-24.

Figure 27: Lampe UV pour la décontamination.

Figure 28: Vortex, centrifugeuse de haute performance, micropipettes, incubateur et lampe UV.

Figure 29: Phases de l'amplification par PCR nichée du fragment de gène codant pour SSU rDNA.

Figure 30: Phases de l'amplification par PCR nichée du fragment de gène codant pour Gp 60.

Figure 31: Oocystes de ***Cryptosporidium spp*** observés par la coloration de Ziehl Neelsen modifiée chez les ânes.

Figure 32: Oocystes de ***Cryptosporidium spp*** observés par la coloration de Ziehl Neelsen modifiée chez les chevaux.

Figure 33: Nested PCR de ***Cryptosporidium spp*** chez les chevaux par l'utilisation des amorces spécifiques du genre et la visualisation des produits en gel d'électrophorèse avec l'ethidium bromide sous la lumière ultraviolet.

Figure 34: Nested PCR de ***Cryptosporidium spp*** chez les ânes par l'utilisation des amorces spécifiques du genre et la visualisation des produits en gel d'électrophorèse avec l'ethidium bromide sous la lumière ultraviolet.

Figure 35 et **36:** Taux d'infestation global de ***Cryptosporidium spp*** chez les équidés par microscopie (**figure 35**) et par nested **PCR** (**figure 36**).

Figure 37 et **38:** Taux d'infestation de ***Cryptosporidium spp*** chez les chevaux par microscopie (**figure 37**) et par nested **PCR** (**figure 38**).

Figure 39 et **40:** Taux d'infestation de ***Cryptosporidium spp*** chez les ânes par microscopie (**figure 39**) et par nested **PCR** (**figure 40**).

Figure 41: Distribution du taux d'infestation de ***Cryptosporidium spp*** selon l'âge des animaux.

Figure 42: Taux d'infestation de ***Cryptosporidium spp*** chez les équidés mâles et femelles par les deux techniques.

Figure 43 et **44 :** Taux d'infestation de ***Cryptosporidium spp*** chez les deux sexes des chevaux (**figue 43**) et des ânes (**figure 44**) par les deux techniques.

Figure 45: Répartition géographique des cas positifs de ***Cryptosporidium spp*** chez les chevaux et les ânes.

Figure 46: Séquençage de l'ADN positif par l'intermédiaire **d'ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit** and an **ABI 3730XL sequence analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA**) et la lecture de la séquence par le programme **ChromasPro** (fragment de 48 bp).

Figure 47: Séquence finale d'un cas positif, obtenue après l'analyse de la séquence initiale par des programmes bioinformatiques et déposée dans la base des données génétiques (**Genbank**).

Figure 48: Alignement entre la séquence de ***Cryptosporidium*** **hedgehog genotype** obtenue dans notre étude (Seq_1) (longueur 765 bp) et une séquence de référence (Seq_2) (longueur 782 bp avec un numéro d'accès en GenBank **QG259141**).

Figure 49: Alignement entre la séquence de ***Cryptosporidium parvum*** obtenue dans notre étude (Seq_1) (longueur 720 bp) et une séquence de référence (Seq_2) (longueur 1746 bp avec un numéro d'accès en GenBank **AF093493**).

Figure 50: Alignement entre la séquence de ***Cryptosporidium hominis*** obtenue dans notre étude (Seq_1) **(**longueur 720 bp) et une séquence de référence (Seq_2) (longueur 1745 bp avec numéro d'accès en GenBank **AF093492**).

Figure 51: Alignement entre la séquence de ***Cryptosporidium muris*** obtenue dans notre étude (Seq_1) (longueur 717 bp) et une séquence de référence (Seq_2) (longueur 799 bp avec numéro d'accès en GenBank **EU245045**).

Figure 52: Relations phylogéniques entre ***Cryptosporidium*** **hedgehog genotype,** obtenu dans notre étude (numéros en surbrillance) et autres espèces de

Cryptosporidium (**gène Gp 60**). L'arbre est construit du maximum de vraisemblance (probabilité = -17,475, 61) avec Kimura modèle à 2 paramètres.

Figure 53: Arbres phylogéniques (Neighbour-joining) représentant les relations évolutives entre ***Cryptosporidium spp*** et génotypes, y compris ceux détectés dans notre étude (numéros en surbrillance), déduits à partir d'un fragment partiel de gènes **(A)** : **SSU** (743 positions de base dans l'ensemble de données finales), **(B) COWP** (384 positions de base dans l'ensemble de données finales), **(C) TRAP-C1** (523 positions de base dans l'ensemble de données finales), **(D) GP60** (859 positions de base dans l'ensemble de données finales) et **(E) HSP70** (277 positions de base dans l'ensemble de données finales). Kimura modèle à 2 paramètres a été utilisé dans tous les arbres.

Figure 54: Séquence de subtype **A22R9** appartient à la famille **XIIIa** de ***Cryptosporidium*** **hedgehog genotype**.

Figure 55: Séquence de subtype **A16G1R1** appartient à la famille **IIa** de ***Cryptosporidium parvum***.

Figure 56: Séquence de subtype **A15G1** appartient à la famille **Ika** de ***Cryptosporidium hominis***.

Figure 57: Arbre phylogénique représentant l'évolution des relations entre les génotypes d'***Enterocytozoon bieneusi***, y compris ceux détectés dans notre étude (numéros en surbrillance), déduits de l'ensemble de la région nucléotidique **ITS**.

SOMMAIRE

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION **1**

1. Généralités sur les cryptosporidies **3**

1.1. Historique 3

1.2. Taxonomie et classification 5

1.3. Morphologie et cycle évolutif 12

1.3.1. Phase endogène 14

1.3.1.1. Sites d'infection 15

1.3.1.2. Excystation 15

1.3.1.3. Stade de trophozoite et formation de la vacuole parasitophore 17

1.3.1.4. Mérogonie 19

1.3.1.5. Gamogonie 20

1.3.1.6. Sporogonie 21

1.3.2. Phase externe 23

2. Epidémiologie de la cryptosporidiose **24**

2.1. Cryptosporidiose du cheval 24

2.2. La cryptosporidiose chez les autres espèces animales 28

2.3. Cryptosporidiose humaine et risque zoonotique 32

SOMMAIRE

3. Pathogénie de la cryptosporidiose **35**

4. Symptômes et lésions de la cryptosporidiose **37**

4.1. Symptômes 37

4.2. Lésions 39

5. Diagnostic **40**

5.1. Techniques d'enrichissement 40

5.1.1. Technique de flottation 41

5.1.2. Technique de sédimentation 41

5.2. Techniques de coloration 42

5.2.1. Coloration de Ziehl Neelsen modifiée 42

5.2.2. Coloration à l'auramine phénol 42

5.2.3. Coloration de Heine 43

5.3. Techniques immunologiques 43

5.4. Cytométrie en flue 45

5.5. Les méthodes de reconnaissance de l'acide nucléique 45

5.6. Épreuves sérologiques et épreuves d'immunité cellulaire 49

SOMMAIRE

PARTIE EXPERIMENTALE

1. OBJECTIFS **50**

2. MATÉRIÈLS et MÉTHODES **50**

2.1. Description et caractéristiques des élevages étudiés 50

2.2. Animaux et collecte des échantillons de fèces 55

2.3. Techniques de prélèvement 60

2.4. Techniques d'analyses des prélèvements 61

2.4.1. L'analyse de routine (examen microscopique) 61

2.4.1.1. Technique de concentration de Ritchie simplifiée par Allen et Redly 62

2.4.1.2. Technique de coloration de Ziehl Neelsen modifiée 63

2.4.2. L'analyse moléculaire 66

2.4.2.1. Extraction de l'ADN 66

2.4.2.2. L'amplification de l'ADN par PCR 69

2.4.2.3. L'électrophorèse 73

2.4.2.4. Purification de l'ADN 74

2.4.2.5. Séquençage, analyses et phylogénie des séquences 75

3. Analyses statistiques 76

SOMMAIRE

4. RESULTATS **77**

4.1. Observation de ***Cryptosporidium spp*** par microscopie 77

4.2. Observation de ***Cryptosporidium spp*** en électrophorèse 78

4.3. Prévalence globale de l''infection par ***Cryptosporidium spp*** 80

4.4. Prévalence de l'infection par ***Cryptosporidium spp*** selon l'âge des animaux 82

4.5. Prévalence de l'infection par ***Cryptosporidium spp*** selon le sexe des animaux 85

4.6. Prévalence de l'infection par ***Cryptosporidium spp*** selon le statut clinique 88

4.7. Distribution géographique de chevaux et des ânes infectés 88

4.8. Caractérisation moléculaire de ***Cryptosporidium spp*** 90

4.8.1. Séquençage de l'ADN positif et obtention des séquences nucléotidiques 90

4.8.2. Identification des espèces et /ou de génotypes de ***Cryptosporidium*** 91

4.8.2.1. Comparaison entre les séquences obtenues et les séquences de référence 93

4.8.2.2. Analyses phylogéniques des séquences obtenues par rapport aux 101

séquences de références

4.8.3. Détermination des subtypes des espèces et de génotypes de ***Cryptosporidium*** 104

4.9. Caractérisation moléculaire de ***Microsporidia*** 107

5. DISCUSSION **110**

5.1. Prévalence globale de ***Cryptosporidium spp*** 110

5.2. Taux d'infestation par ***Cryptosporidium spp*** en fonction de l'âge des animaux 113

5.3. Pathogénécité de ***Cryptosporidium spp*** 116

5.4. Prévalence de ***Cryptosporidium spp*** en fonction des élevages 118

5.5. Prévalence de ***Cryptosporidium spp*** en fonction du sexe 119

5.6. Caractérisations moléculaires de ***Cryptosporidium spp*** 119

5.6.1. Espèces et génotypes infectants 119

5.6.2. Détermination des subtypes des espèces et génotypes infectants 123

5.6. 3. Risque zoonotique 126

5.7. Comparaison entre ***Cryptosporidium*** et ***Microsporidia*** 128

CONCLUSION **130**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **132**

Introduction

Cryptosporidium est un parasite coccidien, qui infecte le tube digestif de plusieurs espèces animales incluant les mammifères, oiseaux, poissons, reptiles et amphibiens. Ce protozoaire présente un cycle évolutif monoxène (direct), qui se déroule entre l'hôte infecté et le milieu extérieur. Après plusieurs phases de multiplication du parasite dans les cellules intestinales (développement particulier : intracellulaire mais extra-cytoplasmique), l'hôte infecté élimine dans l'environnement des éléments parasitaires directement infectants pour d'autres hôtes, caractérisant les oocystes sporulés de ***Cryptosporidium*** (Fayer, 2010; Valigurova et al,. 2008)

Au sein des protozoaires particulièrement les Apicomlexa, ces parasites font partie de la famille de ***Cryptosporididae***, dans laquelle un seul genre ***Cryptosporidium*** est connu. Au sein de ce dernier genre, l'arrivée et l'avancement des approches de la biologie moléculaire permet l'identification de plusieurs espèces parasitaires spécifiques et bien adaptées chez les différents hôtes animaux. Cependant, en raison de la description des nouvelles espèces et la découverte continue de nombreux génotypes, la taxonomie du genre ***Cryptosporidium*** est toujours en discussion (Šlapeta, 2013).

Les cryptosporidies surtout l'espèce ***Cryptosporidium parvum***, sont connus parmi les agents entéro-pathogènes les plus impliqués dans le déclenchement des diarrhées néonatales chez les animaux, particulièrement les jeunes ruminants (veaux, agneaux, chevreaux). Ces parasites en association ou non avec d'autres agents entéro-pathogènes d'origine virale ou bactérienne, engendrent dans les exploitations des ruminants des pertes économiques considérables liées à la morbidité et même la mortalité des nouveau-nés (Morin, 2002).

Actuellement, le risque zoonotique de ***Cryptosporidium spp***. est bien démontré et les cryptosporidies sont connus comme étant des agents entéro-pathogènes émergents. L'homme connu par sa réceptivité spécifique à l'espèce ***Cryptosporidium hominis***, est infecté aussi par d'autres espèces d'origine animal surtout ***Cryptosporidium parvum.*** Dans différents pays développés et même en voie de développement, l'infection par ces deux dernières espèces a été associée à des épisodes diarrhéiques chez des personnes immunocompétentes et des individus immunodéficients comme les sidéens (Šlapeta, 2013 ; Xiao, 2010)

L'épidémiologie de la cryptosporidiose incluant la prévalence, facteurs de risque, caractérisation moléculaire des espèces et génotypes infectants et détermination des variations génétiques au sein de ces derniers et l'évaluation du risque zoonotique, ont été bien documentés chez certaines espèces animales surtout les ruminants, les oiseaux et même chez le porc. Par contre, peu de données sont actuellement disponibles sur l'épidémiologie de cette maladie parasitaire chez les équidés. De plus, en Algérie un nombre très limité d'études sur la cryptosporidiose animale a été publié. A cet effet, notre étude a pour objectifs, l'estimation de la prévalence de ***Cryptosporidium spp***. chez les chevaux et chez l'espèce asine et l'étude des variations du taux d'infestation en fonction de certains facteurs particulièrement l'âge des animaux. A cet effet, des techniques usuelles de diagnostic de la cryptosporidiose et des techniques avancées de la biologie moléculaire ont été utilisées pour identifier les espèces ou génotypes infectants et pour l'évaluation du rôle zoonotique des équidés dans la dissémination des cryptosporidies. En parallèle de la recherche des cryptosporidies, d'autres parasites particulièrement les microsporidies ont été aussi identifiées par ces approches moléculaires.

Partie bibliographique

1. Généralités sur les cryptosporidies

1.1. Historique

Entre 1907 et 1912, Tyzzer met en évidence les oocystes d'un nouveau coccidien dans les glandes gastriques et l'intestin grêle de la souris de laboratoire. Il décrit son cycle parasitaire et pense qu'il vit attaché à l'épithélium des glandes gastriques et de l'intestin grêle. En se basant sur le site d'infection et la morphologie du parasite, Tyzzer classifie ce protozoaire en deux espèces distinctes ; ***Cryptosporidium muris*** pour les oocystes isolés dans les glandes gastriques et ***Cryptosporidium parvum*** pour les oocystes isolés dans l'intestin grêle (Tyzzer, 1907, 1910, et 1912).

Les critères utilisés pour identifier et nommer les espèces de ***Cryptosporidium*** ont été basées initialement sur l'hôte spécifique, la localisation des stades endogènes et la morphologie des différents stades endogènes et exogènes du parasite. La spécificité d'hôte a été appliquée pour la dénomination de certaines espèces de ***Cryptosporidium*** comme les oocystes isolés dans les fèces des ovins ont été nommés ***C. agni*** (Barker et Carbonell, 1974). Le parasite isolé dans les fèces humaines a été nommé ***C. garnahmi*** **(**Bir, 1981) ou ***C. enteriditis*** (Qadripur et Klose, 1985).

Toutefois, il manquait des données taxonomiques qui pouvaient clairement distinguer ces espèces de toutes les autres (morphologie, biologie et/ou données moléculaires), elles devenaient des dénominations non valides. La morphologie des oocystes restait insuffisante pour distinguer d'une espèce à une autre, à l'exception des parasites avec des larges et petits oocystes (Fayer, 2010).

Depuis 1970 jusqu'à 1990, seule l'espèce ***Cryptosporidium muris*** a été considérée comme le parasite de la muqueuse gastrique avec des oocystes plus larges. Tandis

que, l'autre espèce ***Cryptosporidium parvum*** considérée comme infectante de la muqueuse intestinale des mammifères avec des petits oocystes (Tzipori et al., 1980). Durant cette période, les oocystes isolés chez les différentes espèces animales et même l'homme, ont été identifiés et publiés comme ***C. parvum***, ***C. parvum like*** ou tout simplement ***Cryptosporidium*** (Fayer, 2010).

Le rôle pathogène des cryptosporidies à été signalé chez le dindon infesté par des oocystes de ***Cryptosporidium***, ayant présenté des troubles diarrhéiques sévères (Slavin, 1955).

Chez les bovins, le premier cas clinique de la cryptosporidiose a été observé chez une génisse âgée de 8 mois (Panciera et al., 1971), dont la maladie est associée à une diarrhée chronique en l'absence d'isolement d'autres agents entéropathogènes (Bourgouin, 1996 ; Fayer, 2004).

En 1976, deux cas de cryptosporidiose humaine ont été révélés chez une fille âgée de 3 ans et un adulte âgé de 39 ans **(**Meisel et al., 1976; Nime et al., 1976). Suite à l'apparition de SIDA, les rapports associés aux agents pathogènes opportunistes, ont été concentrés particulièrement sur la cryptosporidiose humaine, dont Casemore et al (1985) ont rapporté 159 cas d'infection chez des patients immunocompétents et 71 cas chez des sujets immunodéficients.

Tableau 1: Historique des découvertes des différentes espèces de ***Cryptosporidium***.

Année	Espèce décrite	Hôte	Références
1907	***Cryptosporidium muris***	souris de laboratoire	Tyzzer
1912	***Cryptosporidium parvum***	souris de laboratoire	Tyzzer
1925	***Cryptosporidium crotali***	serpent à sonnette	Triffit
1955	***Cryptosporidium meleagridis***	dindon	Slavin
1971	***Cryptosporidium wrairi***	cobaye	Vetterling et al.
1976	**Cryptosporidiose clinique**	homme	Meisel et al, Nime et al.
1979	***Cryptosporidium felis***	chat domestique	Iseki
1980	***Cryptosporidium serpentis***	serpent	Levine
1986	***Cryptosporidium baileyi***	poussin	Current et al.

Ensuite, plusieurs espèces et génotypes de ***Cryptosporidium*** ont été décrits chez les différentes espèces animales, ainsi que la détermination du rôle pathogène de ce protozoaire particulièrement chez les bovins et l'homme**.**

1.2. Taxonomie et classification

Cryptosporidium est un protozoaire coccidien qui appartient au phylum Apicomplexa, à la classe de ***Sporozoasida*** et à la famille ***Cryptosporididae*** qui comporte un seul genre (tableau 2).

L'avènement des techniques de la biologie moléculaire permet une taxonomie précise dont plusieurs espèces de ***Cryptosporidium*** sont actuellement reconnues valides chez les différentes espèces animales. Egyed et al (2003) ont proposé que seules les

espèces de ***Cryptosporidium*** acceptables, celles qui sont étudiées morphologiquement, biologiquement et elles disposent des informations génétiques. Xiao et al (2004b) ont publié le consensus pour les conditions minimales pour la validation d'une nouvelle espèce de ***Cryptosporidium***, dont ils ont indiqué des donnés morphologiques pour les oocystes, caractérisation génétique (détermination par multilocus si possible), identification des hôtes infectés naturels et expérimentales, et l'adhésion aux règles de l'**I.C.Z.N.** Tout ceci a été supporté par Jirku et al (2008).

Tableau 2 : Classification et taxonomie de ***Cryptosporidium spp*** (O'Donoghue, 1995).

Classification	**Caractéristiques**
Royaume : ***Protozoa***	Organisme unicellulaire
Phylum : ***Apicomplexa***	Présence d'un complexe apical
Classe : ***Sporozoasida***	Reproduction asexuée et sexuée avec formation d'oocystes
Sous/classe : ***Coccidiosina***	Cycle biologique comporte la mérogonie, gamogonie et sporogon.ie
Ordre : ***Eucoccidiorida***	Mérogonie présente
Sous/ordre : ***Eimeriorina***	Développement indépendant de la microgamie et la macrogamie
Famille : ***Cryptosporididae***	Cycle monoxène comporte 04 sporozoites nus
Genre: ***Cryptosporidium***	**Un seul genre**

Actuellement, au moins 26 espèces et plus de 50 génotypes au sein du genre ***Cryptosporidium*** sont reconnus et identifiés chez les mammifères dont l'homme, oiseaux, reptiles, amphibiens et poissons (Slapeta, 2013; Kvac et al., 2013a). ***Cryptosporidium parvum*** est considéré comme une multi espèce complexe, dont la plupart des génotypes isolés chez les différentes espèces animales ont été reconnus comme des variations génétiques de cette espèce. Deux génotypes majeurs de ***C. parvum*** ont été identifiés dans plusieurs études moléculaires: le génotype humain isolé chez l'homme et celui des bovins isolé chez les ruminants et l'homme (Peng et al., 1997; Xiao et al., 1999a; Fayer, 2010). Le génotype bovin a été déjà rédécrit comme ***C. parvum*** par Upton et Current (1985), Tandis que le génotype humain a été nommé ***C. hominis*** (Morgan-Ryan et al., 2002).Les données moléculaires récentes ont montré que certaines espèces ont été initialement connues valides pour certains animaux (***C.parvum, C muris, C. meleagridis***) et d'autres ont été considérées comme des génotypes, mais durant ces dernières années, elles sont étudiées et reclassées comme des espèces spécifiques et séparées chez certains hôtes(tableau 3)(Plutzer et Karanis, 2009; Fayer, 2010; Xiao, 2010). Par exemple, chez le chien, ***Cryptosporidium parvum*** dog génotype a été considéré comme une espèce valide, nommée ***Cryptosporidium canis*** (Fayer et al., 2001), ainsi chez le porc, pig genotype I et II ont été reclassés comme deux nouvelles espèces appelées ***Cryptosporidium suis*** et ***Cryptosporidium scrofarum*** (Ryan et al., 2004a; kvac et al., 2013b).

A ce jour, la taxonomie et le nombre des espèces du genre ***Cryptosporidium*** sont toujours en discussion. Certains auteurs particulièrement **Jan Slapeta** a proposé de renommer ***C. parvum*** particulièrement (bovine genotype) comme ***C. pestis*** (nouvelle espèce) et de retenir le non ***C. parvum*** pour **mouse genotype I** (Slapeta, 2006). Cependant, cette proposition a été sérieusement critiquée et refusée par Xiao et al (2007a), qui ont indiqué que ***C. pestis*** est invalide en raison que la description de cette

nouvelle espèce (ré-nomination du ***C. parvum*** bovine genotype) ne répond pas aux conditions citées préalablement (Xiao et al., 2004b; Jurki et al., 2008), permettant la validation des espèces au sein du genre ***Cryptosporidium***. Aussi, le terme ***C. parvum*** a été rarement utilisé pour la description de ces parasites jusqu'au 1985, quand Upton et Current (1985) font une taxonomie complète par la ré-description des oocystes isolés chez le veau et des patients sidéens infectés par des souches bovines, qui ont été considérés comme l'espèce ***C. parvum***. Cette taxonomie a été en accordance avec les règles de l'**I.C.Z.N** et a été acceptée par la plupart des chercheurs (avant 1985, pas de publication concernant ***C. parvum***, mais depuis cette année, plus de 3000 articles ont été publiés sur cette espèce).

Jan Slapeta (2007, 2011) a répondu à cette critique et a montré que l'appellation ***Cryptosporidium pestis*** est en accordance avec le code de l'**I.C.Z.N** et le nom ***C. pestis*** est valide pour remplacer ***C. parvum*** bovine genotype. Le problème est accentué lorsque Ren et al (2012) ont réalisé une étude morphologique, biologique et génétique détaillées sur le "**mouse genotype I**" et l'ont classé comme une nouvelle espèce nommée ***Cryptosporidium tyzzeri***. Cependant, Slapeta (2012) a accentué le débat sur l'invalidité de cette espèce proposée par Ren et al (2012), car cette appellation ***C. tyzzeri*** a été utilisée par Levine en 1961 pour ***Cryptosporidium spp*** chez le poussin, décrit à l'origine par Tyzzer en 1929. Slapeta a suggéré que l'appellation ***C. tyzzeri*** proposée par Ren et al (2012) est un homonyme primaire et synonyme juniore par rapport au ***C. tyzzeri*** Levine (1961).

A cet effet, ***C. tyzzeri*** a été considéré comme une espèce invalide (Slapeta, 2012, 2013). La validation de cette dernière espèce est confirmée par Xiao et al (2012**)** et acceptée dans les récentes publications concernant le génotypage de ***Cryptosporidium spp*** chez la souris (Kvac et al., 2013a).

Au sein de certaines espèces et génotypes de ***Cryptosporidium***, les techniques de la biologie moléculaire permettent la détermination des variations génétiques qui sont connues sous le terme anglais "**subtype families**".Contrairement à l'identification des différentes espèces et génotypes, effectuée par le séquençage du gène codant pour SSU de l'ADNr (small subunit ribosomal DNA), la détermination de ces "**subtype families**" est réalisée par le séquençage et l'analyse des séquences du gène codant pour une glycoprotéine de surface appelée GP 60 (Xiao, 2010; Feng et al., 2011).

Actuellement, l'isolement des subtypes est limité chez 9 espèces et 4 génotypes de ***Cryptosporidium***. La terminologie initiale pour designer ces différents subtypes a été développée par Sulaiman et al (2005) et actualisée aujourd'hui par plusieurs auteurs. Des numéros romains I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, et XIII ont été utilisés pour nommer les subtypes appartenant au ***C. hominis, C. parvum, C. meleagridis, C. fayeri, C. cuniculus,*** **horse genotype,** ***C. wrairi*****, ferret genotype,** ***C. tyzzeri***, **mink genotype, opossum genotype I**, ***C. ubiquitum*** et **hedgehog genotype** (***C. erinacei***) **respectivement** (Sulaiman et al., 2005; Xiao, 2010; Feng et al., 2011; Dyachenko et al., 2010; Laatamna et al, 2013 ; Li et al, 2014).

Tableau 3 : Différentes génotypes reclassés comme des nouvelles espèces valides.

Génotypes et l'animal hôte	Nouvelle espèce décrite	Références
Dog genotype chez le chien	***Cryptosporidium canis***	Fayer et al(2001)
"***C. parvum* human genotype**" ou génotype I, génotype H (homme)	***Cryptosporidium hominis***	Morgan-Ryan et al (2002)
Pig genotype I chez le porc	***Cryptosporidium suis***	Ryan et al (2004a)
***C.* Bovine genotype B**	***Cryptosporidium bovis***	Fayer et al (2005)
Marsupial genotype I chez le kangourou	***Cryptosporidium fayeri***	Ryan et al (2008)
Marsupial genotype II chez le kangourou	***Cryptosporidium macropodum***	Power et Ryan (2008)
Cervine genotype chez les mammifères	***Cryptosporidium ubiquitum***	Fayer et al (2010)
Deer like genotype chez les bovins	***Cryptosporidium ryanae***	Fayer et al (2008)
Cryptosporidium bovis*-like genotype** or ***C.bovis des ovins	***Cryptosporidium xiaoi***	Fayer et Santa (2009)
Rabbit genotype chez le lapin	***Cryptosporidium cuniculus***	Robinson et al (2010)
Mouse genotype I chez la souris	***Cryptosporidium tyzzeri***	Ren et al (2012)
Nouveau génotype chez l'homme	***Cryptosporidium viatorum***	Elwin et al (2012b)
Pig genotype II chez le porc	***Cryptosporidium scrofarum***	Kvac et al (2013b)
Hedgehog genotype chez l'hérisson	***Cryptosporidium erinacei***	Kvac et al (2014b)

Plusieurs génotypes reconnus infectants pour différents hôtes sont actuellement ré-décrits comme des nouvelles espèces au sein du genre ***Cryptosporidium***.

Tableau 4 : Différentes espèces de ***Cryptosporidium*** connues chez les différents hôtes animaux.

Espèce	Hôte majeur	Sites d'infection	Références
C. hominis	homme	Intestin grêle	Morgan-Ryan et al (2002)
C. parvum	Bovin, homme	Intestin grêle	Tyzzer (1912)
C. muris	souris	Estomac	Tyzzer(1907)
C. suis	porc	Gros et petit intestin	Ryan et al (2004a)
C. felis	chat	Intestin grêle	Iseki (1979)
C. canis	chien	Intestin grêle	Fayer et al (2001)
C. wrairi	Cobaye	Intestin grêle	Vetterling et al (1971)
C. bovis	bovin	Intestin grêle	Fayer et al (2005)
C. andersoni	bovin	Caillette	Lindsay et al (2000)
C. macropodum	kangourou	Intestin	Power et Ryan (2008)
C. fayeri	kangourou	N D	Ryan et al (2008)
C. ryanae	bovin	N D	Fayer et al (2008)
C. xiaoi	ovin	Intestin	Fayer et Santa (2009)
C. ubiquitum	bovin, autres hôtes	Intestin	Fayer et al (2010)
C. cuniculus	lapin	Intestin grêle	Robinson et (2010)
C. tyzzeri	souris	Intestin grêle	Ren et al (2012)
C. viatorum	homme	N D	Elwin et al (2012b)
C. scrofarum	porc	Intestin	Kvac et al (2013b)
C. meleagridis	dindon	Intestin	Slavin (1955)
C. baileyi	poule	Intestin	Current et al (1986)
C. galli	poule	Proventricule	Pavlasek (1999) et Ryan et al (2003c)
C. fragile	amphibien	Estomac	Jurki et al (2008)
C. serpentis	serpents, lézards	Estomac	Levine et al (1980)
C. varanii	lézard	Estomac	Pavlasek et al (1995)
C. scophthalmi	poissons	Estomac et intestin	Alvarez-Pellitero et al (2004)
C. molnari	Poissons	Estomac	Alvarez-Pellitero et Sitja-Boba (2002)

1.3. Morphologie et cycle évolutif

Cryptosporidium complète son cycle évolutif chez un seul hôte, dont tous les stades (asexués et sexués) se déroulent chez ce dernier. Donc, il est de type direct et monoxène (De Graaf et al., 1999; O'Donoghue, 1995; Xiao et Fayer, 2008).

Le cycle biologique des ***cryptosporidies*** comporte deux phases; une phase interne (endogène), qui se déroule à l'intérieur de l'organisme de l'animal infesté et une phase externe caractérisée par l'élimination dans le milieu extérieur des éléments parasitaires infectants (Naciri et al., 2007).

Durant la phase interne, quatre étapes essentielles se succèdent; l'excystation, mérogonie, gamogonie et sporogonie (De Graaf et al., 1999; Naciri et al., 2007).

Dans l'environnement, l'animal infecté élimine des oocystes sporulés (chacun contenant quatre sporozoites) qui seront infectants pour d'autres hôtes sains (Naciri et al., 2007).

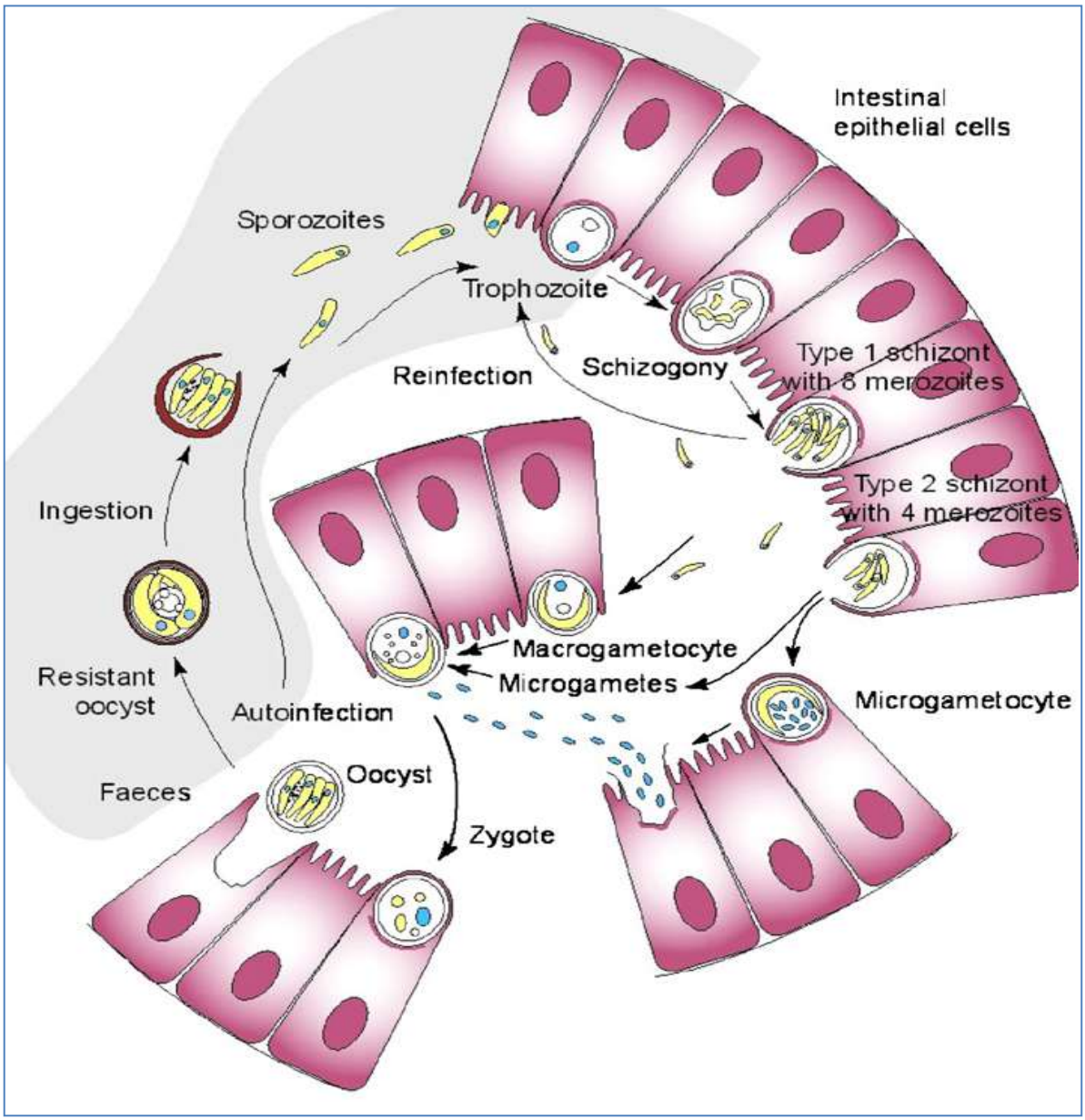


Figure 1: Cycle évolutif de ***Cryptosporidium spp*** (Smith et al., 2007).

1.3.1. Phase endogène

Microscopiquement, les stades endogènes de développement de ***Cryptosporidium*** sont les plus petits en comparaison avec ceux des autres sporozoaires infectant le tractus intestinal. Presque, tous ces différents stades se déroulent sur la surface apicale des cellules épithéliales (O'Donoghue, 1995). La localisation des stades de développement des cryptosporidies dans l'épithélium de l'hôte infecté a fait l'objet de spéculations durant plusieurs années. ***Cryptosporidium*** est considéré comme un parasite intracellulaire mais extracytoplasmique, car durant son attachement sur les cellules épithéliales, le stade invasive et mobile n'entre jamais dans le cytoplasme de la cellule hôte (Barta et Thompson, 2006; Valigurova et al., 2008). Les processus d'invasion de ce protozoaire et son attachement sur la surface de la cellule hôte ont été étudiés de manière extensive surtout chez les espèces de ***Cryptosporidium*** infectant le tractus intestinal (Valigurova et al., 2008).

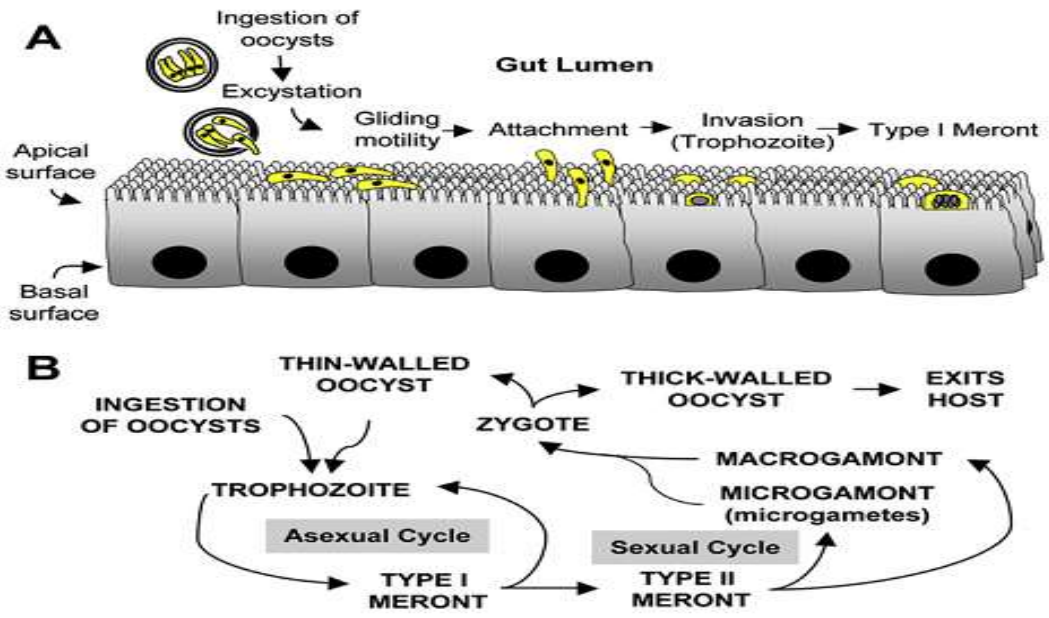


Figure 2 : Différentes phases du cycle évolutif de ***Cryptosporidium spp*** (O'hara et Chen, 2011).

1.3.1.1. Sites d'infection

Cryptosporidium envahit les cellules du tractus intestinal principalement l'intestin grêle, mais d'autres sites intestinaux sont aussi infestés comme le caecum et le colon (Euzéby, 1987; Naciri et al., 2007; O'Donoghue, 1995). Le parasite ne vit pas dans les cellules épithéliales elles même, mais à la surface des entérocytes infectées particulièrement dans la bordure en brosse de ces dernières (Euzéby, 1987; Tzipori et Ward, 2002). Le protozoaire affecte non seulement le revêtement épithélial du tractus intestinal, mais celui de l'estomac et bien que plus rarement celui des voies respiratoires notamment chez les oiseaux et celui des voies hépatobiliaires et pancréatiques chez l'homme (Euzéby, 1987).

1.3.1.2. Excystation

Une fois les oocystes sont ingérés, ils subissent le phénomène de l'excystation dans le tractus gastro-intestinal en libérant les quatre sporozoites mobiles et infectants (figure 3). Il a été rapporté que ce phénomène est déclenché sous l'action de plusieurs facteurs incluant la bile, certaines enzymes (trypsine, pepsine, protéinase K), pH, température et dioxyde de carbone (O'Donoghue, 1995; O'hara et Chen, 2011). Aussi, le processus d'excystation dépend probablement des molécules dérivées de parasite comme la cystine protéase, arginine aminopeptidase, phospholipase A2 et d'autres protéines de structure (O'hara et Chen, 2011). Les sprozoites infectants s'évadent à travers d'une fente provoquée par la dissolution d'une structure spécifique localisée dans la paroi oocystale. Cette opération débute par une fragilisation mécanique de la paroi dans la partie antérieure du tube digestif, puis en anaérobiose, se complète par l'action de la bile (Euzéby, 1987; O'Donoghue, 1995). Cependant, selon d'autres auteurs (Morin, 2000; Harris et Petry, 1999), la destruction de la paroi oocystale ne semble pas être provoquée par l'action des facteurs cités précédemment et permettrait d'expliquer les points suivants :

- La sensibilité accrue des jeunes veaux (deux semaines d'âge) à l'infection, qui sont dépourvus de conditions citées préalablement ; la pepsine est très secondaire pour le jeune veau, sa production vers deux semaines d'âge est encore pratiquement négligeable. L'activité protéolytique de la trypsine et la chymotrypsine est notable chez le fœtus de trois semaines avant la mise bas, mais elle s'effondre à la naissance, puis augmente de nouveau progressivement, il y a donc un déficit d'action protéolytique durant les premiers jours de vie. De plus, le colostrum contient des inhibiteurs de protéases en relation avec la protection des immunoglobulines.

- L'infection des sites extra-intestinaux comme le tractus respiratoire et les voies hépatobiliaires.

- Le phénomène d'auto-infection, où les oocystes endogènes qui s'éclatent dans l'intestin grêle sans subir l'action de la bile et les enzymes protéolytiques

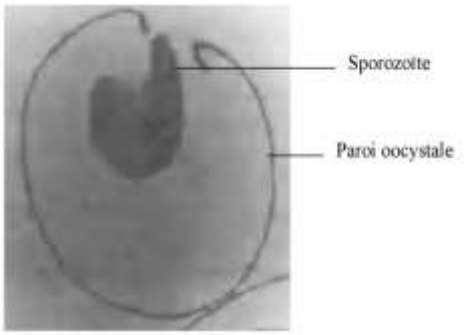


Figure 3 : Un sporozoite excystant de l'oocyste (microscopie électronique à transmission) (Petry et Harris, 1999).

1.3.1.3. Stade de trophozoite et formation de la vacuole parasitophore

Après le phénomène d'excystation, les sporozoites libres se déplacent dans la lumière intestinale vers les cellules épithéliales grâce à des mouvements de reptation par contraction de leur système microtubulaire (Euzéby, 1987) (figure 4). Durant une phase précoce d'invasion, les sporozoites infectants s'attachent sur la surface apicale des cellules épithéliales (entérocytes ou cellules gastriques) particulièrement les microvillosités (bordure en brosse).

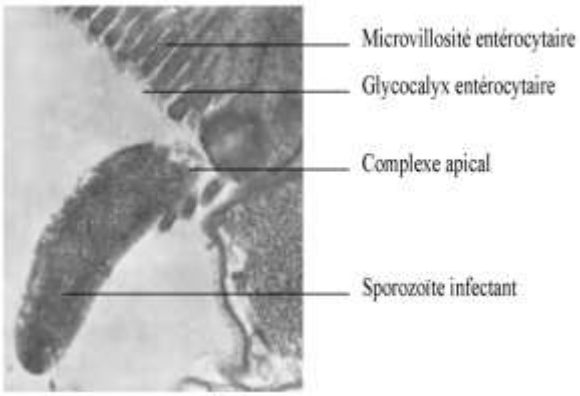


Figure 4 : Début de l'infection de la cellule intestinale par les sporozoites (Laboratoire HOECHST ROUSSEL VET, 2000).

Le contact entre la partie apicale du sporozoite infectant et la bordure en brosse de la cellule hôte induit une modulation au niveau de la membrane de cette dernière. A ce niveau, la membrane cellulaire perd ses microvillosités naturelles et forme une membrane circulaire bien serrée encerclant la partie apicale du sporozoite (Valigurova et al., 2008) (figure 5).

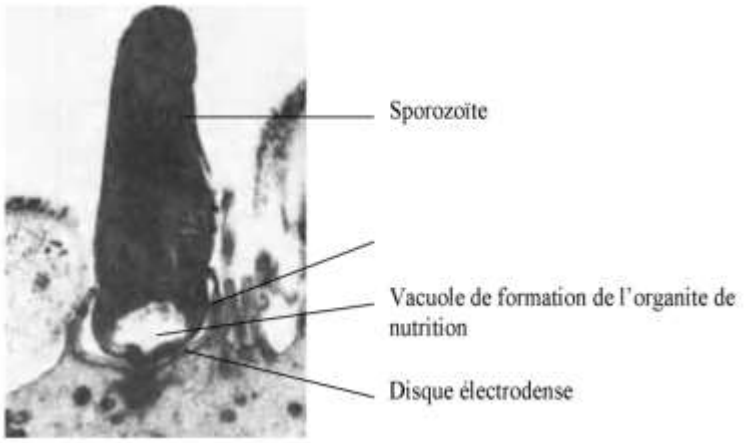


Figure 5: Un sporozoite au début de l'invasion de la cellule hôte (microscopie électronique à transmission) (Tzipori et Griffiths, 1998).

Cette membrane augmente sur le long du sporozoite. Le développement du bord de cette membrane est souvent irrégulier et ensuite enveloppe le parasite, ce qui aboutit à la formation du sac parasitophore. La formation de la vacuole parasitophore est complétée dans diverses parties du sporozoite et non nécessairement dans sa proximité distale (figure 6). A ce stade, il ya la formation du trophozoite (Valigurova et al., 2008).

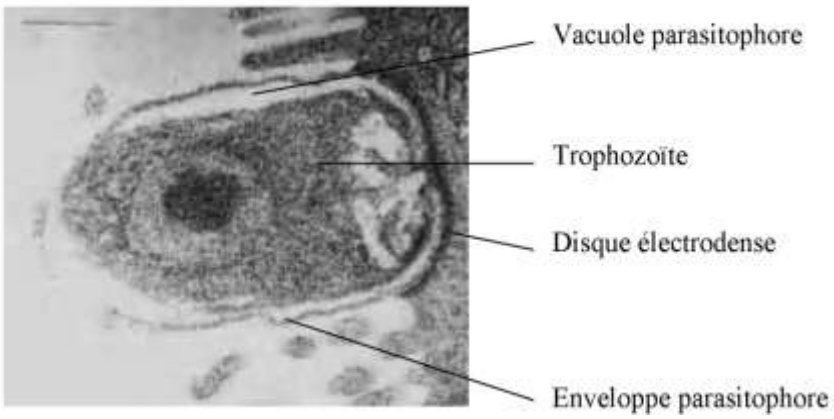


Figure 6: Trophozoite dans son enveloppe parasitophore (microscopie électronique à transmission) (Peeters et Villacorta, 1995).

1.3.1.4. Mérogonie

Les trophozoites formés subissent une reproduction asexuée par schizogonie (mérogonie) pour former les mérontes. La division cellulaire des trophozoites par endopolygenie donne naissance à des mérontes de type I, dont chaque méronte contient 8 mérozoites de type I (mérozoites de première génération), qui sont libérés après la destruction de la vacuole parasitophore (figure 7). Après maturation des mérontes, les mérozoites de première génération infectent d'autres cellules épithéliales en se transformant à nouveau en trophozoites pour donner naissance (après division cellulaire) à des mérontes de type II, dont chacun comporte 4 mérozoites de type II (ou deuxième génération) (figure 8). Après maturation des mérontes de type II, Les mérozoites de deuxième génération sont libérés pour entrer en reproduction sexuée (Tzipori et Ward, 2002; O'hara et Chen, 2011). Les mérozoites de type I peuvent se multiplient plusieurs fois (intensifient l'infection) en formant des mérontes de type I avant la formation de la mérogonie de type II; phénomène de retro-infection (O'hara et Chen, 2011).

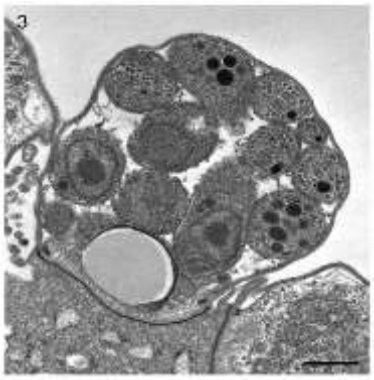


Figure 7: Schizogonie de première génération (méronte de type I) avec 8 mérozoites (Tzipori et Ward, 2002).

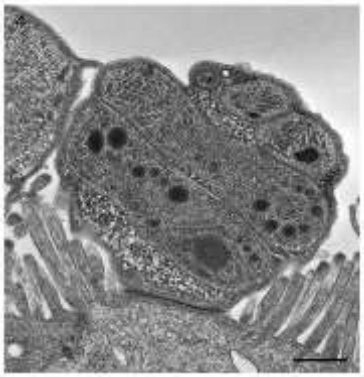


Figure 8: Schizogonie de deuxième génération (méronte de type II) avec 4 mérozoites (Tzipori et Ward, 2002).

1.3.1.5. Gamogonie

Par un mécanisme mal connu, les mérozoites de type II**,** après invasion cellulaire, produisent des microgamétocytes mâles et macrogamétocytes femelles. Les microgamétocytes subissent une division nucléaire pour donner (chacune) naissance à 16 microgamètes mâles. La division nucléaire n'est pas observée chez les macrogamétocytes femelles qui accumulent des réserves lipidiques et polysaccharidiques, puis se transforment en macrogamète qui reste attachée à la surface épithéliale.

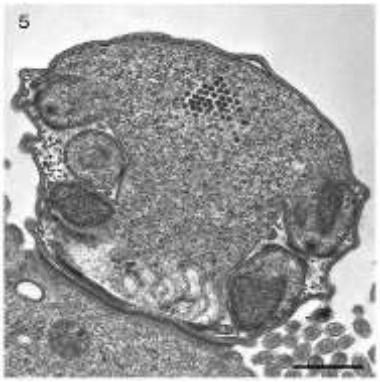


Figure 9 : Microgamétocyte mâle avec formation des microgamètes (Tzipori et Ward, 2002).

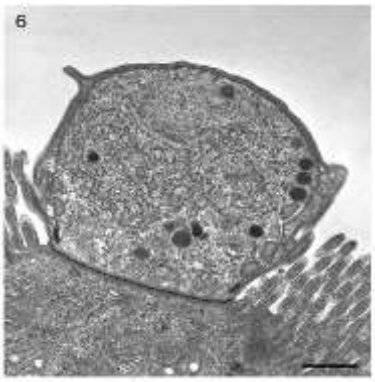


Figure 10 : Macrogamète mature attachée à la surface épithéliale (Tzipori et Ward, 2002).

Les microgamètes sont libérés des microgamétocytes et fusionnent avec les macrogamètes, d'où la fécondation de ces dernières. Cette fécondation aboutit à la formation d'un zygote fertile qui est localisé sur la surface épithéliale (bordure en brosse) et entouré par la membrane parasitophore (Tzipori et Ward, 2002; O'hara et Chen, 2011).

1.3.1.6. Sporogonie

Les zygotes fertiles issus de l'union des gamètes mâles et femelles subissent deux phases de reproduction asexuée pour donner naissance à des oocystes sporulés contenant chacun 4 sporozoites nus et falciformes. À cet effet, la sporulation est endogène (Tzipori et Ward, 2002; O'hara et Chen, 2011).

Figure 11 : Zygote issu de la fécondation des gamètes femelles par les gamètes mâles (Tzipori et Ward, 2002).

80 à 90 % des oocystes formés à la lumière intestinale sont à paroi épaisse et sont éliminés dans le milieu extérieur avec les matières fécales (O'hara et Chen, 2011). Le reste des oocystes présentent une paroi mince et peuvent rompre in situ (dans la lumière intestinale) en libérant les quatre sporozoites, qui débutent un nouveau cycle chez l'animal infecté ; c'est le phénomène d'auto-infection (O'hara et Chen, 2011).

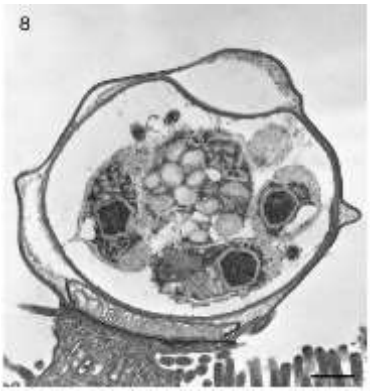


Figure 12 : Zygote avec formation des sporozoites (oocyste sporulé) (Tzipori et Ward, 2002).

La période prépatente de ***Cryptosporidium*** est comprise entre 2 à 14 jours chez la plupart des espèces animales domestiques. La période patente est variable en fonction des différents hôtes et peut durer plusieurs jours à plusieurs mois (O'Donoghue, 1995).

1.3.2. Phase externe

Cette phase est caractérisée par l'élimination dans l'environnement des éléments parasitaires via les fèces des hôtes infectés. Les oocystes éliminés dans le milieu extérieur sont sporulés et directement infectants pour d'autres hôte (Tzipori et Ward, 2002; Naciri et al., 2007). Les oocystes représentent une forme de résistance, de dissémination et de transmission des cryptosporidies. Les oocystes peuvent survivre plusieurs mois dans les effluents, les lisiers, sur les pâtures et contaminent aussi les eaux de surface et les eaux souterraines par lessivages des eaux pluviales (Naciri et al., 2007).

Contrairement aux autres coccidies, le cycle du genre ***Cryptosporidium*** présente certaines caractéristiques qui ne peuvent être observées que chez ce dernier genre :

* La mérogonie de type I peut s'amplifier plusieurs fois par reproduction asexuée avant d'entamer la mérogonie de type II; c'est le phénomène de retro-infection.

* La formation des oocystes à paroi fine qui peuvent rompre dans l'intestin et libérer les sporozoites, qui commencent à leur tour un nouveau cycle ; c'est le phénomène d'auto-infection.

Ces deux phénomènes sont probablement à l'origine de la persistance et la chronicité de l'infection chez les hôtes, sans nouvelles expositions à des oocystes exogènes (O'Donoghue, 1995; Tzipori et Ward, 2002).

* La localisation particulière du parasite sur la surface épithéliale des cellules infectées (intracellulaire mais extracytoplasmique) : cette position n'est observée que chez les cryptosporidies et explique en grande partie l'incapacité de nombreuses substances médicamenteuses à stopper ou diminuer le développement parasitaire chez l'hôte infecté (Chartier, 2003; Morin, 2002).

***** La sporulation endogène et l'élimination dans l'environnement des éléments parasitaires directement infectants.

2. Epidémiologie de la cryptosporidiose

L'épidémiologie de la cryptosporidiose a été bien documentés chez certaines espèces animales surtout les ruminants, les oiseaux et même chez le porc. Par contre, peu de données sont actuellement disponibles sur l'épidémiologie de cette maladie parasitaire chez d'autres espèces animales.

2.1. Cryptosporidiose du cheval

La cryptosporidiose des équidés a été rapportée pour la première fois aux USA chez des poulains immunodéficients (Snyder et al., 1978).Contrairement ce qui a été documenté sur la cryptosporidiose chez certaines espèces animales comme les ruminants et chez l'homme, peu d'études ont été menées sur la prévalence, les espèces et/ou génotypes de ***Cryptosporidium*** infectant les chevaux et leur risque zoonotique. Plus de 30 enquêtes sur la cryptosporidiose du cheval ont été conduites aux USA, Canada, Nouvelle Zélande, l'Europe incluant la Pologne, République tchèque, grande Bretagne, Italie et Suisse, moyen orient et l'Algérie (Laatamna et al., 2013). Seulement, quelques rapports ont été supportés par des données moléculaires.

Dans la plupart des études publiées sur la cryptosporidiose du cheval, les cryptosporidies ont été mis en évidence par les techniques de coloration et des essaies immunologiques. Certaines études, dans lesquelles ces dernières méthodes ont été utilisées dans la détection de ***Cryptosporidium*** dans les fèces des chevaux, ont rapporté une prévalence très faible variant de 0 à 4, 6 % (Atwill et al., 2000; Johnson et al., 1997; Bray et al., 1997; De souza et al., 2009; Forde et al., 1997; Burton et al., 2010). D'autres enquêtes ont signalé une prévalence élevée variant entre 12 % et 28 % (Mahdi et Ali, 2002; Coleman et al., 1989; Olson et al., 1997; Marques, 2010 ; Xiao et Herd, 1994).

Comme chez les autres espèces animales, la prévalence de la cryptosporidiose du cheval est variable en raison de l'implication de certains facteurs qui peuvent être à l'origine de chiffres différents, obtenus à travers de plusieurs enquêtes. Des facteurs liés à l'animal particulièrement l'âge des chevaux, d'autres liés à l'échantillonnage, les techniques de diagnostic utilisées et même probablement à l'espèce de ***Cryptosporidium*** en cause. L'influence des techniques de mise en évidence des cryptosporidies dans les fèces des chevaux a été observée dans certains rapports, où les techniques immunologiques (IFD) sont plus sensibles que les méthodes usuelles de coloration. A leur tour, les techniques de la biologie moléculaires sont plus sensibles que les méthodes immunologiques (Jex et al., 2008a; Veronesi et al., 2010).

L'action pathogène de ***Cryptosporidium*** chez les chevaux particulièrement chez les poulains est actuellement mal connue. La cryptosporidiose maladie a été documentée pour la première fois chez des poulains de race arabe atteints d'un syndrome d'immunodéficience (Snyder et al., 1978) et a été associée systématiquement avec ce syndrome dans diverses études (Mair et al., 1990; Bjorneby et al., 1991; Perryman et Bjorneby, 1991). Cependant, l'implication des cryptosporidies dans l'apparition des

diarrhées chez des poulains nouveau-nés immunocompétents a été révélée dans nombreux rapports (Grinberg et al., 2003, 2008, 2009).***Cryptosporidium*** a été associé avec certains agents entéropathogènes (coronavirus, rotavirus, salmonelles, clostridies) dans le déclenchement du syndrome diarrhéique (Coleman et al., 1989; Netherwood et al., 1996).

Peu de données moléculaires sont disponibles sur les espèces ou génotypes infectant le cheval et leur risque zoonotique (Laatamna et al., 2013). La première caractérisation moléculaire des cryptosporidies isolés dans les fèces des équidés a été décrite en République tchèque chez deux poulains sauvages (**Prezewalski's wild horse foal**), vivant dans un parc zoologique (Ryan et al., 2003b). Le premier poulain a été infecté par un génotype nommé en anglais "**horse genotype**", considéré comme spécifique pour les équidés. L'autre poulain a été infesté par les oocystes de ***Cryptosporidium parvum*** (Ryan et al., 2003b). Depuis l'année 2003, l'identification du **horse genotype** n'a été rapportée que récemment dans deux différentes enquêtes. Aux USA, par l'analyse RFLP et le séquençage du gène SSU rDNA, Burton et al (2010) ont obtenu chez des poulains infectés des isolats identiques (**horse genotype**) aux isolats détectés en République tchèque par Ryan et al (2003b). Récemment en Italie, le génotype du cheval a été identifié chez 11 poulains. Les séquences nucléotidiques appartiennent au **horse genotype** ont présenté une identité élevée avec l'isolat obtenu en République tchèque (Caffara et al., 2013). La plupart des autres études moléculaires ont rapporté l'infection du cheval par l'espèce ***Cryptosporidium parvum*** (Ryan et al., 2003b; Chalmers et al., 2005b ; Hajdušek et al., 2004; Imhasly et al., 2009 ; Grinberg et al., 2003, 2008, 2009; Veronesi et al., 2010 ; Caffara et al., 2013). Récemment, des chevaux adultes originaires de l'Algérie ont été infectés par un génotype inhabituel, celui de l'hérisson (***Cryptosporidium*** **hedgehog genotype)** (Laatamna et al., 2013).

Aucune étude particulièrement moléculaire n'a été menée chez les équidés sauvages et même chez les ânes.

Parmi les 9 études moléculaires de génotypage de ***Cryptosporidium spp*** chez les chevaux, seulement 5 rapports ont déterminé les subtypes des espèces et génotypes détectés chez les animaux infectés. Grinberg et al (2008) ont identifié le subtype **IIaA18G3R1** de ***C. parvum*** dans les fèces des poulains infectés. Ryan et al (2003b) ont obtenu le subtype **VIaA11G3** du **horse genotype.** Aux USA (New York), les isolats de ***Cryptosporidium*** **horse genotype** ont été identifiés comme **VIaA14G2** (Burton et al., 2010). En Italie, Caffara et al (2013) ont révélé le subtype **VIaA15G4.** Ce dernier a été isolé chez le veau dans l'Irlande du nord (Thompson et al., 2007). Les subtypes de ***Cryptosporidium*** **hedgehog genotype** originaires de l'Algérie ont été déterminés comme **XIIIaA22R9** (Laatamna et al., 2013).

En Irlande du nord, Thompson et al (2007) ont isolé le génotype équin (**horse genotype**) chez des jeunes veaux. Le même génotype a été détecté dans les eaux usées en chine (Feng et al., 2009).

Actuellement, le rôle zoonotique des équidés dans la transmission de la cryptosporidiose humaine est mal connu (Laatamna et al., 2013). Le génotype du cheval (**horse genotype**) a été impliqué dans l'infection humaine chez deux cas, l'un aux USA (New Mexico) et l'autre en grande Bretagne. Le premier cas est une fille caucasienne âgée de 18 ans, ayant présenté des diarrhées pendant 14 jours associées avec d'autres symptômes (fièvre, anorexie, nausées) (Xiao et al., 2009). Le deuxième cas ayant aussi présenté des troubles diarrhéiques, révélé chez une femme immunocompétente âgée de 30 ans, vivant dans une région rurale située dans le Nord-Ouest de la grande Bretagne (Robinson et al., 2008). Etant donner dans la littérature l'implication de ***Cryptosporidium parvum*** dans la plupart des cas humains à travers le

monde, l'isolement de cette espèce dans diverses études (Grinberg et al., 2008; Chalmers et al., 2005b; Veronezi et al., 2010) permet de considérer les chevaux comme un réservoir potentiel de ***Cryptosporidium*** pour l'homme et ces animaux peuvent contribuer à la contamination environnementale par des cryptosporidies zoonotiques.

2.2. La cryptosporidiose chez les autres espèces animales

Chez les bovins, en plus de l'implication de ***C. parvum***, l'infection est engendrée principalement par 3 autres espèces incluant ***C. andersoni*****,** ***C. bovis*** et ***C. ryanae*** **(**Xiao, 2010; Amer et al., 2013; Ye et al., 2013; Do Couto et al., 2013). D'autres espèces ont été détectées occasionnellement comme ***C. suis***, ***C. felis***, ***C. muris*** et ***C. hominis*** (Bornay-Llinares et al., 1999; Geurden et al., 2007; Smith et al., 2005). ***C. parvum*** apparaît comme étant le plus impliqué dans la cryptosporidiose maladie chez les jeunes veaux.

L'espèce ovine est actuellement infectée principalement par trois espèces de ***Cryptosporidium*** incluant ***C. parvum***, ***C. xiaoi*** et ***C. ubiquitum*** (Fayer et Santa, 2009; Fayer et al., 2010; Ye et al., 2013; Imre et al., 2013; Navarro-i-Martinez et al., 2007; Quilez et al., 2008a; Castro-Hermida et al., 2011; Geurden et al., 2008; Paoletti et al., 2009; Caccio et al., 2013; Robertson et al., 2010; Diaz et al., 2010; Majewska et al., 2000; McLauchlin et al., 2000; Leoni et al., 2007; Pritchard et al., 2007; Chalmers et al.,2002; Elwin et Chalmers, 2008; Mueller-Doblies et al., 2008; Sweeny et al., 2011, 2012; Shen et al., 2011). Cependant, d'autres espèces et génotypes ont été identifiés occasionnellement chez les ovins dans différents pays à travers nombreuses études moléculaires comme ***C. hominis***, ***C. andersoni***, ***C. scrofarum***, ***C. Fayeri***, ***C. suis***,

sheep genotype I et **Sheep genotype II** (Connelly et al., 2013; Giles et al., 2009; Ryan et al., 2005; Sweeny et al., 2011; Fiuza et al., 2011; Santin et al., 2007).

La cryptosporidiose ovine est comparable à celle des veaux, où l'infection se développe surtout chez des jeunes agneaux âgés moins d'un mois. La maladie est très grave chez les agneaux dés l'âge de 3 à 4 jours (Morin, 2002; Picoux, 2004).

Peu de données moléculaires sont actuellement disponibles concernant les espèces de ***Cryptosporidium*** infectant les caprins (Rieux et al., 2013). ***Cryptosporidium parvum*** représente l'espèce la plus impliquée dans les infections des jeunes animaux (Geurden et al., 2008; Quílez et al., 2008a), mais d'autres espèces incluant ***Cryptosporidium xiaoi*** et ***Cryptosporidium ubiquitum*** ont été isolées dans des récentes études (Cama et al., 2008; Díaz et al., 2010; Rieux et al., 2013).

La cryptosporidiose porcine a été décrite pour la première fois aux USA (Bergeland, 1977; Kennedy et al., 1977). Actuellement, deux espèces de ***Cryptosporidium*** sont adaptées pour le porc domestique et sauvage ; ***Cryptosporidium suis*** et ***Cryptosporidium scrofarum*** (Ryan et al., 2003a; Ryan et al., 2004a; Kvac et al., 2013b). D'autres espèces comme ***C. parvum***, ***C. hominis***, ***C. meleagridis***, ***C. muris*** et ***C. tyzzeri*** ont été révélées infectantes naturellement ou par des infections expérimentales (Kvac et al., 2012).

Chez l'espèce canine, les oocystes de ***Cryptosporidium*** ont été identifiés chez différentes espèces de carnivores et la prévalence observée a été généralement faible en comparaison avec celle révélée chez les autres espèces animales particulièrement les ruminants (Feng, 2010). Le chien domestique (***Canis familiaris***) est infecté par ***Cryptosporidium canis***, reconnue préalablement comme un génotype canin (Fayer et

al., 2001). Cette espèce a été détectée aussi chez le coyote (***Canis latrans***) et le renard rouge (***Vulpes vulpes***) (Trout et al., 2006).

Chez le chat, l'isolement de ***Cryptosporidium félis*** a été rapporté dans plusieurs pays comme l'USA, Australie, Colombie, Brésil et Japon (Mtambo et al., 1995; Fayer et al., 2006; Santın et al.,2006; Thomaz et al., 2007; Palmer et al.,2008 ; Ballweber et al., 2009; Yoshiuchi et al., 2010; FitzGerald et al., 2011). Le chat a été aussi infecté occasionnellement par ***Cryptosporidium muris*** (Santın et al., 2006; Pavlazek et Ryan, 2007; FitzGerald et al., 2011).

Chez les oiseaux, ***Cryptosporidium*** a été identifié chez plus de 30 espèces aviaires dans le monde entier. Parmi les trois espèces de ***Cryptosporidium*** adaptées aux oiseaux; ***C. meleagridis***, ***C. baileyi*** et ***C. galli***, chaque' une peut infecter différents types d'oiseaux, mais diffèrent entre elles selon les hôtes et le site d'infection (Pavlasek, 1999, 2001; Fayer, 2010; Ryan, 2010). Aussi, différents génotypes ont été révélés infectants pour les oiseaux (Ryan, 2010; Qi et al., 2011). 5 distincts génotypes nommés **avian genotype I, II, III, IV** et **V** ont été identifiés chez certaines espèces d'oiseaux (Meireles et al., 2006; Ng et al., 2006; Abe et Makino, 2010; Qi et al., 2011). Aux USA, quatre génotypes nommés **goose genotype I**, **II**, **III** et **IV** ont été isolés chez l'oie (Xiao et al., 2002b; Jellison et al., 2004; Zhou et al., 2004). Respectivement, Chez le canard noir et la bécasse des bois, deux génotypes ont été isolés par Morgan et al (2001) et Ryan et al (2003b). Dans la future, Ces génotypes peuvent être classés comme des espèces valides, une fois des données biologiques et morphologiques sont disponibles (Fayer, 2010; Ryan, 2010; Qi et al., 2011).

Autres espèces non adaptées comme ***C. hominis***, ***C.parvum***, ***C. serpentis***, ***C. muris*** et ***C. andersoni*** ont été aussi détectées chez un petit nombre d'oiseaux (Ryan et al., 2003b; Zhou et al., 2004; Ng et al., 2006; Plutzer et Tomor, 2009).

Le lapin est infecté par l'espèce ***Cryptosporidium cuniculus*** décrite par Inman et Takeuchi (1979). Cette espèce présente un risque zoonotique assez important pour l'homme (Slapeta, 2013). Des cas d'infection humaine ont été rapportés en grande Bretagne (Chalmers et al., 2009b, 2011).

Les cryptosporidies des reptiles ont été rapportés approximativement chez 80 espèces de serpents, lézards et tortues (Graczyk, 2008). Deux espèces de ***Cryptosporidium*** sont adaptées aux reptiles; ***C. serpentis*** à localisation gastrique et ***C. varanii*** à localisation intestinale (Xiao et al., 2004a; Pavlasek et al., 1995; Koudela et Modry, 1998; Pavlasek et Ryan, 2008; Fayer, 2010).

Chez les poissons, Relativement peu de données sont disponibles sur la taxonomie, épidémiologie, pathologie, différents hôtes et le risque zoonotique des cryptosporidies (Zanguee et al., 2010). Actuellement deux espèces de ***Cryptosporidium*** sont reconnues infectantes pour les poissons; ***Cryptosporidium molnari*** chez les deux poissons **gilthead sea bream** (***Sparus aurata***) et **European sea bass** (***Dicentrarchus labarx***) et ***Cryptosporidium scophthalmi*** chez le turbot ***(scophthalmus maximus***) (Alvarez-pellitero et Sitja-Bobadilla, 2002; Alvarez-pellitero et al., 2004). ***Cryptosporidium molnari*** se développe préférentiellement dans les cellules épithéliales de la muqueuse gastrique (Alvarez-pellitero et Sitja-Bobadilla, 2002). Par contre, ***Cryptosporidium scophthalmi*** se développe dans l'intestin distal et rarement dans les cellules épithéliales de l'estomac (Alvarez-pellitero et al., 2004).

En plus des deux espèces citées, différents types de poissons sont infectés par 8 génotypes différents nommés **piscine genotype** "1, 2, 3, 4, 5, 6,7, 8" et certains autres espèces comme ***C. parvum***, ***C. hominis***, ***C. xiaoi*** et ***C. scrofarum*** (Ryan et al., 2004b;

Murphy et al., 2009; Reid et al., 2010; Zanguee et al., 2010; Morine et al., 2012, Koinari et al., 2013).

2.3. Cryptosporidiose humaine et risque zoonotique

Six (06) principales espèces de ***Cryptosporidium*** ont été responsables pour la plupart des cas de la cryptosporidiose humaine incluant ***C. hominis***, ***C. parvum***, ***C. meleagridis***, ***C. viatorum***, ***C. felis*** et ***C. canis*** (Cacciò et al., 2002 ; Xiao et Feng, 2008; Xiao, 2010; Xiao et al., 2007b ; Elwin et al., 2012b). Parmi ces espèces, ***C. hominis*** et ***C. parvum*** sont les plus impliqués dans les infections humaines particulièrement dans les pays développés (figue 13).

Aussi, d'autres espèces et génotypes de ***Cryptosporidium*** ont été isolés occasionnellement chez l'homme incluant ***C. muris***, ***C. suis***, ***C. scrofarum***, ***C. tyzzeri***, ***C. fayeri***, ***C. andersoni***, ***C. ubiquitum, C. cuniculis,*** **hedgehog**, **horse, skunk** et **chipmunk I genotypes** (Guyot et al., 2001; Xiao et al., 2002a; Palmer et al.,2003; Robinson et al., 2008; Xiao et Feng, 2008; Xiao et Ryan, 2008; kvac et al., 2009b; Xiao, 2010, Xiao et al., 2009; Chalmers et al., 2009a; Waldron et al., 2010; Insulander et al., 2013; Slapeta, 2013; Rašková et al.,2013; Kvac et al., 2014a).

Cryptosporidium viatorum a été connu comme un nouveau génotype identifié chez des personnes anglaises ayant présenté des signes gastro-intestinaux et qui ont effectué un voyage entre l'inde et grande Bretagne (Elwin et al., 2012a).

Ensuite ce génotype a été classé après une étude morphologique, biologique et génétique comme une nouvelle espèce spécifique à l'homme (Elwin et al., 2012b). Cette espèce a été aussi détectée chez deux patients suédois ayant effectué un voyage vers Kenya et Guatemala (Insulander et al., 2013). Le site d'infection de ***Cryptosporidium***

viatorum et son épidémiologie de transmission reste aujourd'hui mal connus (Slapeta, 2013).

La distribution de ***C. hominis*** et ***C. parvum*** chez l'homme est variable selon les régions géographiques. En Europe, les deux espèces sont communes dans les cas d'infection, en moyen orient, ***C. parvum*** domine et dans le reste des pays du monde particulièrement les pays développés, ***C. hominis*** représente habituellement l'espèce la plus impliquée dans la cryptosporidiose humaine (Xiao, 2010).

La contamination humaine par ces deux dominantes espèces a été associée à une transmission d'origine alimentaire (aliments, eaux) et à une transmission interhumaine ou d'origine animale (Xiao et Ryan, 2008; Xiao, 2010).

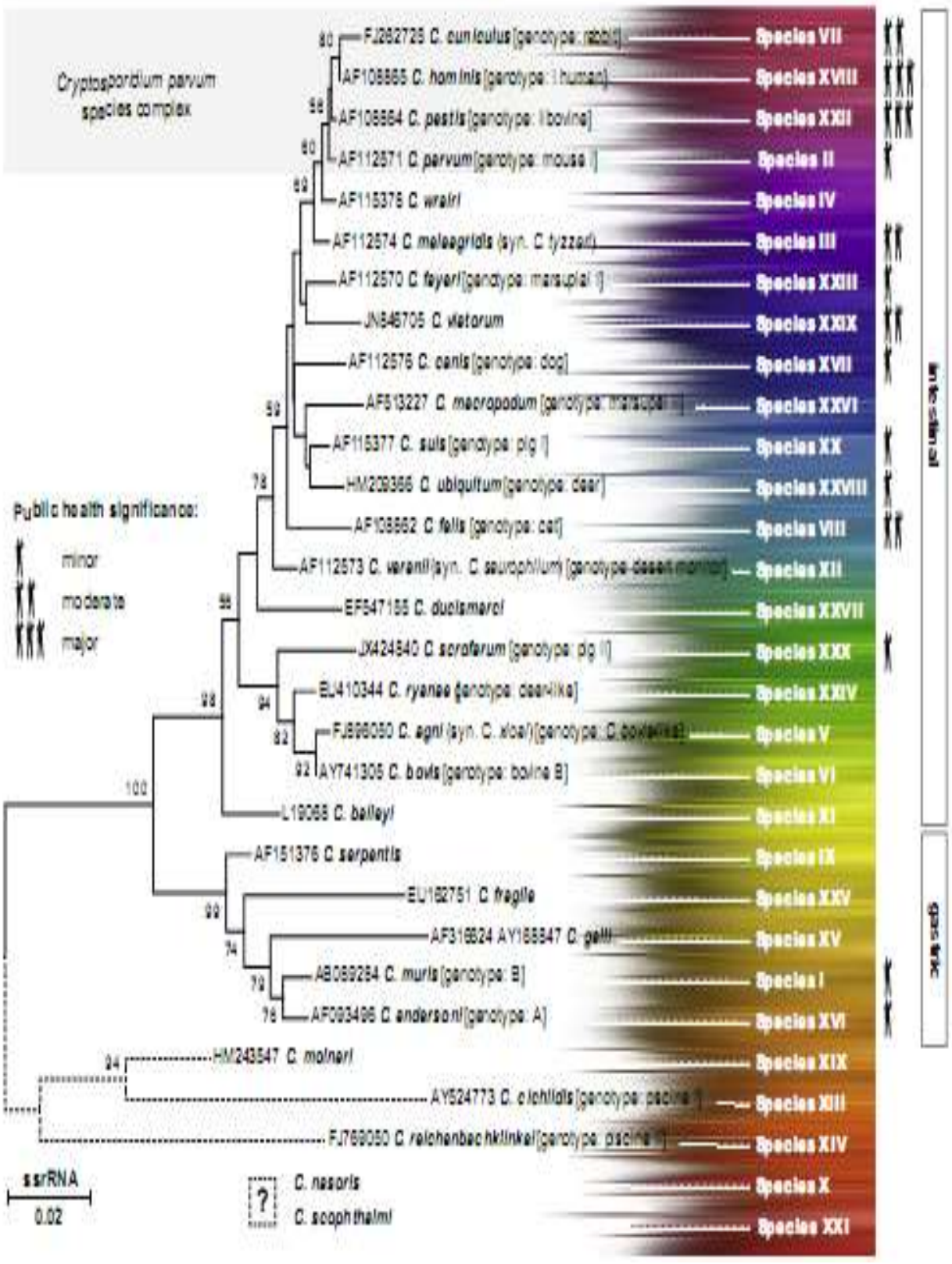


Figure 13: L'importance zoonotique des différentes espèces de ***Cryptosporidium***

(Slapeta, 2013).

3. Pathogénie de la cryptosporidiose

Les mécanismes par lesquels ***Cryptosporidium*** provoque des troubles diarrhéiques sont mal connus. (Tzipori et Ward, 2002). Le principal site d'infection par les cryptosporidies est représenté par l'intestin grêle, mais le parasite peut se développer dans d'autres parties de l'intestin, tractus gastrique et sites extra-intestinaux. Il a été rapporté que chez des patients sidéens, les diarrhées sévères sont liées à des infections dans l'intestin grêle par rapport aux infections localisées dans les autres parties intestinales comme le colon par exemple. L'absence de développement des cryptosporidies dans l'intestin grêle peut conduire à une diarrhée intermittente ou à une infection asymptomatique (Chalmers et Davies, 2010).

Les interactions initiales entre le parasite et la cellule hôte, qui sont caractérisées par l'attachement, l'invasion et la formation de la vacuole parasitophores, représentent les premiers événements de la pathogénie de la cryptosporidiose. Ces interactions sont facilitées par l'intermédiaire de certaines organelles appartiennent au parasite (rhoptries, micronèmes et granules denses), qui secrètent certaines protéines permettant la fixation du parasite (phénomène d'attachement) et l'invasion de la cellule hôte (Tzipori et Ward, 2002). Cette invasion cellulaire est limitée à la bordure en brosse des entérocytes et conduit au déplacement des microvillosités et à l'abrasion de la surface épithéliale, ce qui entraine un changement de l'architecture des villosités intestinales, leur atrophie et leur destruction, hyperplasie cellulaire (cryptes glandulaires),l'infiltration des cellules mononuclées dans lamina propria et aussi l'altération de la perméabilité de la barrière intestinale et des modifications dans le flux d'ions (Chalmers et Davies, 2010; Naciri et al., 2007). En culture cellulaire, il a été montré que les cryptosporidies sont impliqués dans un phénomène d'apoptose cellulaire (Griffiths et al., 1994; Laurent et al., 1997; Ojcius et al., 1999).

L'aspect osmotique, inflammatoire et sécrétoire de la diarrhée provoquée par l'action des cryptosporidies ont été bien étudiés, mais les mécanismes impliqués restent mal connus. Cependant, il s'agit d'un phénomène multifactoriel consistant en l'effet du parasite et ses produits sur la surface épithéliales et la réponse immunitaire de l'hôte infecté. Ce phénomène conduit à une malabsorption et à une hypersécrétion. La réponse immunitaire particulièrement à médiation cellulaire (LT CD4+), qui joue un rôle important dans la défense contre les cryptosporidies a été associée à la pathogénie de l'infection (Chalmers et Davies, 2010). Aussi, l'augmentation de la perméabilité intercellulaire et la réaction inflammatoire dans lamina propria contribuent à une diarrhée sécrétoire via les cytokines et les neuropeptides.

Les diarrhées profuses permettent la présomption de la présence et l'implication des endotoxines, mais in vitro, l'évidence de l'activité de ces molécules n'a été pas observée (Chalmers et Davies, 2010).

Les troubles hydro-électrolytiques caractérisés par un dysfonctionnement des entérocytes ont été bien démontrés chez des porcs infectés expérimentalement, où il y a diminution de l'absorption du Na+ due à un émoussement des villosités et augmentation de la sécrétion du Cl- provoquée par l'hyperplasie des cryptes cellulaires (Argenzio et al., 1990).

Toutes les altérations et les perturbations observées au niveau de la bordure en brosse sont à l'origine d'une diminution de surface d'absorption, diminution de l'absorption des eaux, électrolytiques et nutriments, augmentation des secrétions et une diminution des capacités enzymatiques. Tout ceci aboutit à une malabsorption, mal nutrition et à l'apparition de la diarrhée (Chalmers et Davies, 2010).

4. Symptômes et lésions de la cryptosporidiose

4.1. Symptômes

Cryptosporidium est considéré comme un agent entéropathogène important chez les bétails. Ce protozoaire joue un rôle majeur dans le déclenchement du syndrome diarrhéique néonatal chez différentes espèces animales particulièrement les ruminants. Chez les bovins, les signes cliniques sont variables et dépendent principalement sur les espèces infectantes et le statut immunitaire de l'hôte. L'espèce ***Cryptosporidium parvum*** apparait la plus pathogène et les veaux âgés moins d'un mois sont les plus sensibles à l'infection. La maladie est caractérisée souvent par des diarrhées jaunes de nature liquide, déshydratation, anorexie, douleur abdominale, morbidité et même la mortalité avec des pertes économiques considérables au sein des élevages bovins. Les bovins adultes sont généralement des porteurs asymptomatiques (Do Couto et al., 2013; Tomazic et al., 2013).

Même observation chez les petits ruminants, où les agneaux et les chevreaux sont atteints des diarrhées associées à des signes cliniques généraux comme l'apathie, dépression, anorexie, douleur et gène abdominale. Les fèces diarrhéiques présentent une couleur jaune avec une consistance pâteuse ou de nature liquide. La diarrhée persiste généralement 3 à 5 jours, mais dans des cas sévères, elle peut rester 7 à 15 jours. L'infection clinique est accompagnée d'une importante excrétion parasitaire dans les fèces. Les animaux atteints ont souvent une perte de poids et un retard de croissance (Noordeen et al., 2012).

Aussi, les signes diarrhéiques engendrés par les cryptosporidies ont été rapportés chez d'autres espèces animales comme des porcelets, jeunes carnivores, poulains et même des hérissons.

Pour l'homme, nombreux rapports ont été publiés sur la clinique de l'infection aussi bien chez des sujets immunocompétents que chez des individus immunodéficients. Chez des personnes immunocompétentes, ***Cryptosporidium*** provoque une diarrhée intense mais limitée. La survenue de la diarrhée a été documentée dans le monde entier chez des différentes classes d'âge. Cependant, les enfants particulièrement ceux âgés moins de deux ans sont les plus touchés et les plus sensibles. Les diarrhées peuvent survenir brutalement et elles sont généralement de nature liquide et volumineuse, même peuvent contenir du mucus (Casemore, 2000). D'autres symptômes peuvent être associés à la diarrhée incluant douleur abdominale, nausées, vomissement, gonflement abdominal, production de gaz, fièvre, anorexie, malaise, fatigue et perte de poids parfois considérable. La toux a été rapportée dans certains cas, mais son origine n'a été pas expliquée. Typiquement, le pus et le sang ne sont pas présents dans les selles diarrhéiques (Chalmers et Davies, 2010).

Les signes cliniques particulièrement la diarrhée restent habituellement trois semaines avant de disparaitre spontanément, surtout si les réponses immunitaires sont stimulées. Certains patients peuvent développer une diarrhée chronique durant un mois ou plus. L'excrétion des oocystes peut se continuer 1 à 15 jours après la disparition des troubles diarrhéiques (Chalmers et Davies, 2010).

Contrairement aux personnes immunocompétentes, les sujets immunodéficients comme les sidéens et des patients atteints du cancer du sang, souffrent des diarrhées prolongées et chroniques avec parfois des effets graves. L'extension de l'infection est observée presque sur l'ensemble du tractus gastro-intestinal (pancréas, vésicule biliaire) et dans le système respiratoire (bronches). Des pertes de poids importantes peuvent être associées aux diarrhées chroniques. Chez les patients HIV, La cryptosporidiose a

été associée avec d'autres maladies bactériennes et mycosiques (Chalmers et Davies, 2010).

4.2. Lésions

L'infection du tractus intestinal par les cryptosporidies se traduit particulièrement par des lésions microscopiques. Au plan macroscopique, aucun élément lésionnel pathognomonique n'est signalé (Chartier, 2003). A l'autopsie, les lésions observées signent d'une entérite et de colite (Bourgouin, 1996). Le contenu intestinal est plus ou moins liquide avec un caecum et un colon souvent distendus. Parfois, une inflammation hémorragique dans le dernier tiers de l'iléon associée à une hypertrophie des ganglions mésentériques sont observées (Chartier, 2003).

Au plan microscopique, les lésions sont surtout présentes dans la partie terminale de l'intestin grêle (Chartier, 2003). Elles sont caractérisées par l'atrophie et la fusion des villosités, un raccourcissement et une abrasion des microvillosités. Egalement, une nécrose des entérocytes, une hyperplasie des cryptes glandulaires, une métaplasie des cellules épithéliales et une infiltration plus ou moins importante de lamina propria par des cellules inflammatoires (macrophages, éosinophiles et lymphocytes) (Bourgouin, 1996; Chartier, 2003; O.I.E., 2005).

Chez des patients sidéens, d'autres altérations comme des lésions bronchiques, dilatation des voies biliaires, pancréatite, cholécystite, cholangite sclérosante, sténose du canal biliaire terminal et cirrhose des voies biliaires, peuvent être associées à l'infection extra-intestinale par les cryptosporidies (Chalmers et Davies, 2010).

5. Diagnostic

La recherche des cryptosporidies dans les fèces des animaux infestés est réalisée par plusieurs techniques, dont certaines sont considérées comme des méthodes de routine applicables dans la plupart des laboratoires de parasitologie (figure 14). Ces techniques consistent en des méthodes d'enrichissement (flottation, sédimentation) et surtout des techniques de coloration permettant la mise en évidence des oocystes de ***Cryptosporidium***, sans détermination des différentes espèces et génotypes infectants. En plus de ces techniques, d'autres moyens ont été développés en se basant sur des réactions immunologiques permettant la détection des antigènes des cryptosporidies dans les matières fécales des hôtes infestés. Citant par exemple la technique E.L.I.S.A et I.F, sans identification des espèces ou génotypes de ***Cryptosporidium***. L'arrivée et le développement de la biologie moléculaire permettent de résoudre plusieurs problèmes en domaine de diagnostic de la cryptosporidiose animale et humaine, d'une part par l'obtention des résultats mieux que ceux obtenus par les autres techniques et d'autre part par la détermination des espèces et génotypes en cause.

5.1. Techniques d'enrichissement

Ces méthodes consistent en la séparation et la concentration des parasites dans un faible volume de matières fécales à partir d'un volume initial élevé. Aucune méthode de flottation ou de sédimentation n’est spécifique pour la recherche des oocystes de ***Cryptosporidium*** (O.I.E., 2005). Plus souvent, ces techniques sont associées avec des méthodes de coloration pour la mise en évidence du parasite dans les fèces.

5.1.1. Technique de flottation

L'utilisation d'un milieu liquide plus dense que les oocystes du parasite à concentrer permet aux oocystes de remonter à la surface du liquide, ensuite ils sont récupérés et détectés selon une méthode appropriée. Plusieurs solutions denses sont utilisées dans ce principe de flottation : solution au saccharose et au sucrose, solution de chlorure de sodium, solution de sulfate de zinc et solution d'iodomercurate de potassium. Pour un liquide de flottation utilisable en diagnostic, lorsque la morphologie et la morphométrie sont les facteurs limitants, le milieu de suspension ne doit pas seulement être plus dense que l'objet flottant, mais doit ne pas produire de rétraction qui rendrait l'objet méconnaissable (O.I.E., 2005). Parmi ces techniques, la flottation au sucrose est la méthode de référence. En plus de son caractère quantitatif, sa sensibilité est plus élevée que les techniques de coloration avec un seuil de détection de 4000 O.P.G. (Morin, 2002).

5.1.2. Technique de sédimentation

Cette méthode est basée sur l'utilisation des liquides de mélange comme formol/éther ou formol/acétate d'éthyle. Elle est souvent associée à une centrifugation des prélèvements analysés, où les parasites seront plus rapidement déposés, tendant à l'amélioration du rondement de cette technique (O.I.E., 2005).Un examen microscopique direct du prélèvement concentré est réalisé pour visualiser les oocystes de ***Cryptosporidium***. Cependant, la lecture directe reste difficile à réaliser, nécessitant un œil exercé. Parmi les techniques d'enrichissement par sédimentation, celle de Ritchie simplifiée par Allen et Redly utilisant le formol / éther, qui sera décrite dans notre partie expérimentale. Le seuil de détection fournis par la sédimentation est de l'ordre de 10000 à 500000 O.P.G. (Morin, 2002).

5.2. Techniques de coloration

Nombreuses méthodes de coloration ont été utilisées pour la mise en évidence des cryptosporidies dans les fèces des différentes espèces animales et l'homme, dont certaines ont été développées spécifiquement pour détecter les oocystes fécaux de ce protozoaire.

5.2.1. Coloration de Ziehl Neelsen modifiée

Cette technique est considérée comme la coloration de référence pour la mise en évidence des cryptosporidies. Il existe plusieurs types de cette coloration, tel que celle modifiée par Henriksen et Pohlenz (1981), qui sera utilisée et décrite dans notre travail expérimental.

5.2.2. Coloration à l'auramine phénol

Cette technique de coloration consiste en l'utilisation d'un fluorochrome composé d'auramine et de phénol. Les frottis préparés soit par les techniques d'enrichissement, soit directement sont colorés avec ce réactif. Ensuite, une phase de décoloration avec l'alcool acide et une contre coloration par le permanganate de potassium succèdent à la coloration des lames. La lecture se fait avec un microscope à épifluoréscence (O.I.E., 2005).

5.2.3. Coloration de Heine

Décrite par Heine en 1982, elle est basée sur l'utilisation d'un colorant de fuschine de Ziehl pour préparer les frottis fécaux. Les frottis préparés sont examinés à l'aide d'un microscope à contraste de phase. Cette méthode est douée d'un caractère semi-quantitatif et le nombre d'oocystes est compté par champ microscopique. Une note de 0 à 5 est attribuée : 0 : (absence d'oocystes) ; 1 : (moins d'un oocyste par champ) ; 2 : (1-10 oocystes) ; 3 : (11-20 oocystes) ; 4 : (21-30 oocystes); 5 : (plus de 30 oocystes).

Autres techniques de coloration comme celle de dimethyl sulphoxide carbol fuschine, carbol analine methyl violet et la coloration de Giemsa ont été utilisées aussi pour la mise en évidence des oocystes de ***Cryptosporidium***.

Les techniques de coloration apparaissent simples, peu onéreuses, mais requièrent un œil exercé, nécessitent beaucoup de temps, elles sont caractérisées par une relative subjectivité de la lecture, pouvant entraîner des défauts de spécificité et s'accompagner d'une faible sensibilité et un résultat de type qualitatif, sans détermination des espèces et génotypes (Jex et al., 2008a).

5.3. Techniques immunologiques

Les méthodes immunologiques peuvent offrir certains avantages par rapport aux techniques de coloration pour la détection des oocystes de ***Cryptosporidium*** et le diagnostic de la cryptosporidiose. Ces techniques sont basées sur l'utilisation des anticorps polyclonaux ou monoclonaux capables de reconnaitre les antigènes de surface des cryptosporidies dans les fèces ou dans des échantillons environnementaux (Jex et al., 2008a). Ces anticorps sont conjugués aux différents marqueurs comme des enzymes (technique E.L.I.S.A) ou des substances fluorescentes (technique de l'I.F)

La méthode E.L.IS.A. a été utilisée pour révéler les oocystes des cryptosporidies et/ou leurs antigènes dans les fèces des bovins et l'homme. Elle utilise des anticorps monoclonaux dirigés contre un antigène de surface de poids moléculaire de 20 kda. Cette technique apparaît plus simple que l'observation microscopique et reste un test de confirmation par rapport aux techniques de coloration (El Shewy et al., 1994).

L'immunofluorescence directe a le même principe que celui de l'E.L.IS.A. Elle dispose des anticorps spécifiques du genre et des épitopes de surface des cryptosporidies, qui sont marqués avec un fluorogène. La fixation des anticorps avec les antigènes des oocystes est révélée par la visualisation sous un microscope particulier la substance fluorescente en cas où les cryptosporidies sont présents dans l'échantillon analysé (O.I.E., 2005).

D'autres techniques immunologiques ont été développées pour la recherche des cryptosporidies dans les fèces, notant la technologie d'agglutination au latex, qui est basée sur l'utilisation des particules microsphères de latex sensibilisées par des anticorps anticryptosporidiens obtenus à partir des lapins hyperimmunisés par des oocystes de ***Cryptosporidium***. L'avantage de cette technique consiste en d'autre part de la mise en évidence des parasites dans les fèces, la détection des fragments et des antigènes pariétaux. En outre, elle est utilisée pour la recherche de ces parasites dans l'eau après filtration (Tee et al., 1993). Ainsi, l'hémaagglutination passive vise à la détection des oocystes et leurs antigènes dans les fèces surtout des veaux. Elle implique l'utilisation des hématies sensibilisées par des anticorps anticryptosporidiens, dirigés contre les antigènes de surface des cryptosporidies. Cette technique apparaît simple et objective (Farrington et al., 1995).

Les techniques immunologiques restent plus sensibles et plus spécifiques que les méthodes d'enrichissement et de coloration. De plus, elles permettent la quantification des parasites dans les échantillons analysés (Jex et al., 2008a).

5.4. Cytométrie de flue

Il s'agit d'une autre méthode de détection des oocystes des cryptosporidies. Cette technique a été adoptée et évaluée pour la première fois par Vesey et al (1991). Elle permet la mise en évidence et la quantification des cryptosporidies particulièrement dans les eaux. Des développements récents apportés à cette approche permettant la détection et la quantification des sporozoites dans des cultures cellulaires, ce qui aide à la connaissance de la dynamique de l'infection et même à la quantification des cellules infectées (Jex et al., 2008a).

5.5. Les méthodes de reconnaissance de l'acide nucléique

En raison de la capacité limitée des méthodes de coloration, les techniques immunologiques et même les autres méthodes pour une identification spécifique des cryptosporidies, plusieurs techniques basées sur la connaissance de l'acide nucléique du parasite ont été développées et évaluées pour la détermination des espèces de ***Cryptosporidium***, la mise en évidence des variations génétiques chez ces différentes espèces et un diagnostic spécifique de la cryptosporidiose humaine et animale (Jex et al., 2008a; Smith et al., 2006).

Ces techniques sont basées essentiellement sur l'amplification spécifique par réaction PCR d'un ou plusieurs gènes, qui font partie de l'ADN du ***Cryptosporidium***.

Plusieurs marqueurs ont été ciblés par différents types de PCR et autres méthodes moléculaires (Tableau 5).

L'amplification de certains gènes permet seulement l'identification des espèces ou génotypes de ***Cryptosporidium*** éventuellement présents dans les fèces ou les prélèvements d'eaux, et d'autres gènes sont spécifiques pour la détermination des subtypes qui représentent des variations génétiques au sein des espèces et génotypes (Caccio et al., 2005).

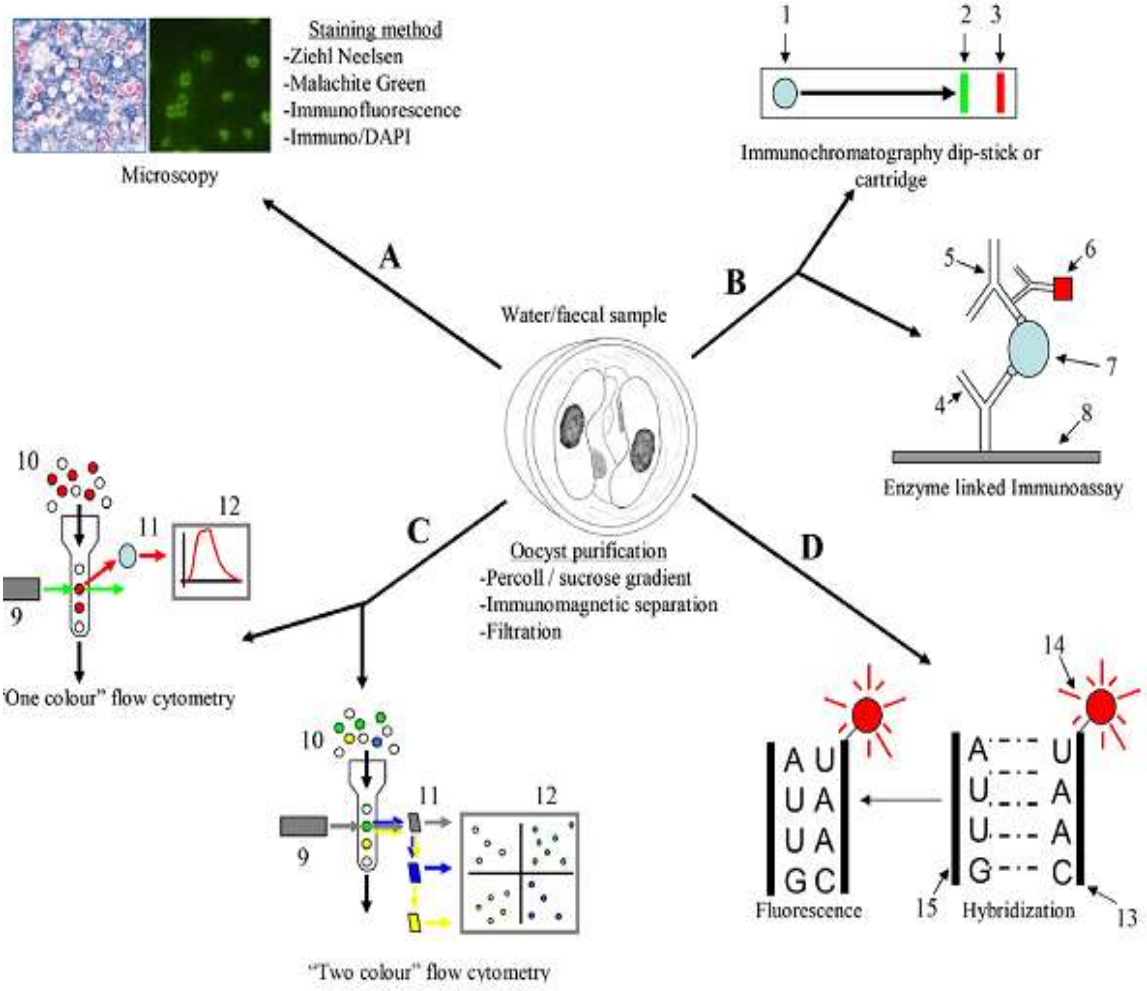


Figure 14 : Certaines approches utilisées dans la détection et la quantification de ***Cryptosporidium spp*** (Jex et al., 2008a).

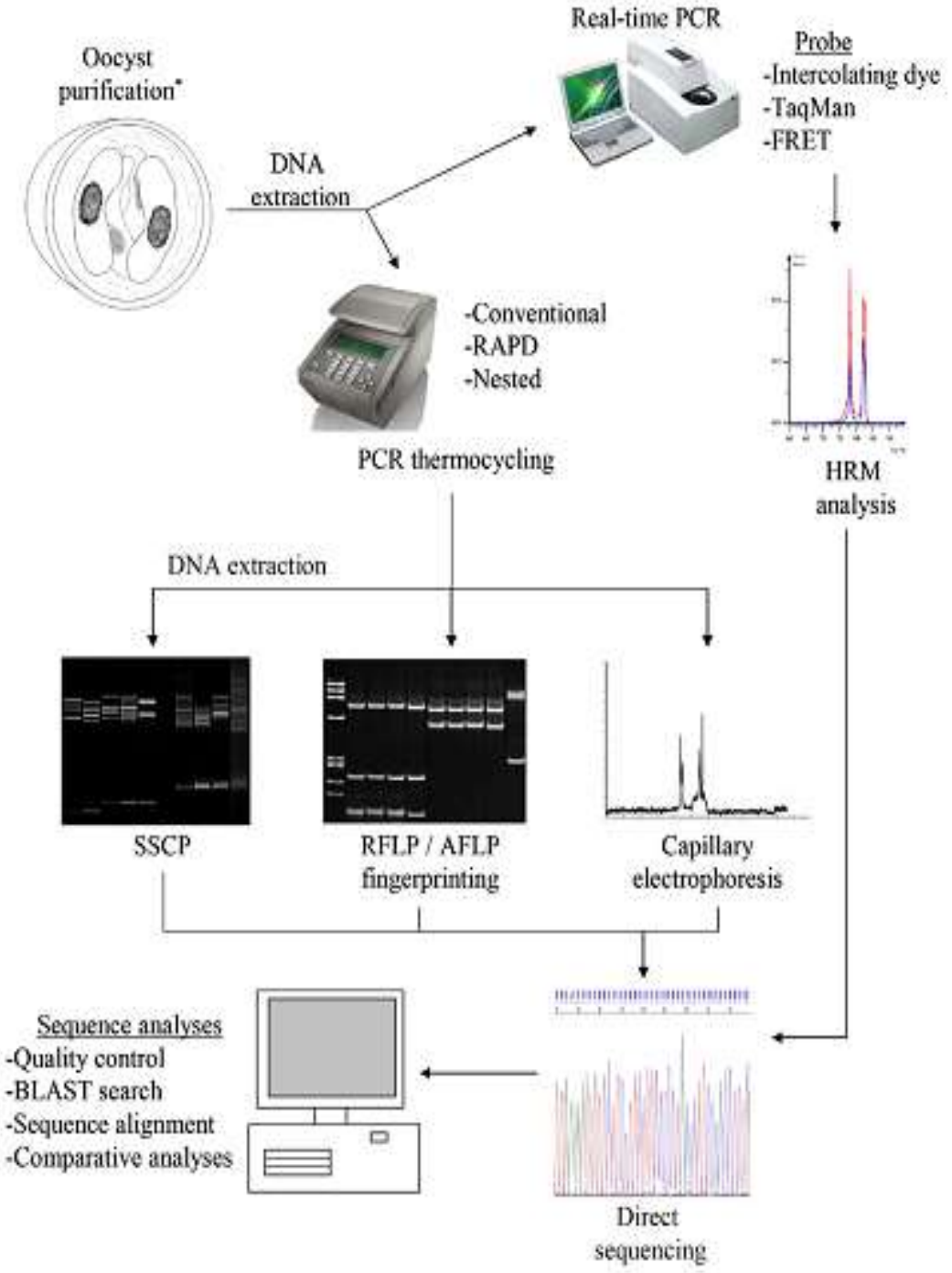


Figure 15 : Certains types de techniques moléculaires permettant l'identification des espèces, génotypes et subtypes de ***Cryptosporidium*** (Jex et al., 2008a).

Tableau 5 : Différentes techniques moléculaires et leurs principales applications (Caccio et al., 2005).

Gène d'amplification	Type d'essaie	Principale application
18S rDNA	PCR, nested PCR, sequencing, PCR-RFLP, real-time PCR, microarray	Identification des espèces et génotypes
Hsp70	PCR, nested PCR, sequencing, real-time PCR, microarray	Identification des espèces et génotypes
COWP	PCR, nested PCR, sequencing, PCR-RFLP, microarray	Identification des espèces et génotypes
Actin	PCR, nested PCR, sequencing	Identification des espèces et génotypes
B-Tubulin	PCR, nested PCR, sequencing, PCR-RFLP	Identification des espèces et génotypes
GP60	PCR, nested PCR, sequencing	Détermination des subtypes
Microsatellites	PCR, nested PCR, sequencing, fragment typing	Détermination des subtypes
Minisatellites	PCR, nested PCR, sequencing, fragment typing	Détermination des subtypes
Extrachromosomal double-stranded RNA	Reverse transcriptase, PCR, sequencing, heteroduplex mobility assays	Détermination des subtypes

Les techniques moléculaires sont plus sensibles que les tests conventionnels et immunologiques pour détecter les oocystes fécaux et même qui sont présents dans les échantillons hydriques. La sensibilité des méthodes publiées est évaluée entre 1 et 106 oocystes. Ces techniques sont souvent restreintes à des laboratoires spécialisés (O.I.E., 2005).

5.6. Epreuves sérologiques et épreuves d'immunité cellulaire

La cryptosporidiose est souvent une maladie du nouveau-né et à moins qu'il n'y ait suffisamment de preuves pour exclure la présence d'oocystes infectants, les épreuves sérologiques ne présentent aucun avantage. Elles peuvent être utilisées pour des études épidémiologiques : la plupart sont basées sur des tests E.L.I.S.A, utilisant différents extraits aqueux d'oocystes de ***Cryptosporidium parvum***. Les épreuves d'immunité cellulaire n'apparaissent pas avoir d'avantages spécifiques et ne sont pas disponibles (O.I.E., 2005).

.

Partie expérimentale

1. OBJECTIFS

Notre enquête a visé l'estimation de la prévalence de ***Cryptosporidium spp.*** chez la population équine (chevaux et ânes) et l'étude de l'influence de certains facteurs (incluant l'âge, sexe et le statut Clinique) sur les variations de cette prévalence chez les animaux étudiés. Ainsi, le principal but de ce travail est l'investigation sur les espèces et/ou génotypes de ***Cryptosporidium*** éventuellement infectants pour les chevaux et les ânes, par l'utilisation des techniques avancées de la biologie moléculaire et l'évaluation du rôle zoonotique des équidés dans la dissémination des cryptosporidies.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Description et caractéristiques des élevages étudiés

Les élevages des chevaux concernés dans cette étude sont représentés essentiellement par la grande ferme située dans la Wilaya de Tiaret (jumentrie de Tiaret) et certains centres hippiques situés dans la Wilaya d'Alger. Les prélèvements n'ont pas pu être effectués sur tout l'effectif de chaque élevage, sauf pour les élevages où l'accès était facile. Des élevages privés de chevaux, répartis dans certaines zones rurales localisées dans deux Wilayas (Sétif et Bordj Bou Arreridj) ont été inclus aussi dans notre enquête. La récolte des prélèvements chez les ânes a été également réalisée dans les régions rurales localisées dans les deux Wilayas précédentes.

La ferme localisée dans la région de Tiaret est une grande jumentrie en Afrique et parmi les plus importantes fermes dans le monde. Ce centre national comprend approximativement un cheptel de 267 chevaux (juments, poulains, étalons) et consiste en un élevage de reproduction, qui produit chaque année entre 45 et 50 poulains de

race pur sang arabe et barbe. Cette jumentrie est le principal fournisseur des chevaux pour les autres centres du pays en maintenant le model et le type original à travers un capital génétique de grande valeur. Le système d'élevage dans cette jumentrie est combiné entre le pâturage et la stabulation et tout dépend de la saison. En été, les juments et les poulains passent toute la nuit en pâture et entrent leurs boxes la matinée du lendemain. Durant les autres saisons, ils pâturent le matin et retournent à leurs boxes le soir. Les étalons surtout utilisés dans l'accouplement sont maintenus pour la plupart du temps dans leurs boxes et sortent durant la période de coït.

Les poulains sont maintenus dans des boxes individuels avec leurs mères (chaque box comporte une jument avec son poulain) pendant la période qui s'étend de la naissance jusqu'à l'âge de 6 mois (correspondant au sevrage). Ensuite, les poulains sont isolés de leurs mères et sont regroupés en pair (chaque boxe contient deux poulains) dans des boxes spécifiques de sevrage (âge de 6 mois jusqu'à un an). A partir de l'âge d'un an, les poulains sont maintenus dans des boxes individuels. Les conditions d'hygiène dans cette jumentrie sont assez acceptables dans la plupart des boxes.

Les autres élevages localisés dans la Wilaya d'Alger sont des centres équestres, dont le nombre des chevaux est variable d'un élevage à un autre. Les animaux sont maintenus dans des boxes individuels et sont utilisés particulièrement dans l'équitation, la course et la saute des obstacles. Les mesures hygiéniques dans ces centres hippiques sont acceptables.

Dans les zones rurales, les chevaux sont élevés traditionnellement avec d'autres animaux (bovins, ovins, caprins, poules, chiens) et sont surtout de race pur sang arabe et barbe (détermination de la race seulement par observation). Les ânes prélevés vivent

aussi à proximité des animaux cités précédemment, dont certains sont utilisés comme des moyens de travail, de transport et de service. Généralement, les animaux pâturent durant l'été, le printemps et à moindre degré l'automne. Durant l'hiver, les chevaux sont maintenus dans des boxes spécifiques ou dans les bâtiments d'élevage des ruminants. Les ânes sont souvent entravés dans des boxes spécifiques.

La localisation des élevages, les zones rurales étudiées et le nombre de prélèvements récoltés sont rapportés dans la figure 16 et les tableaux 6 et 7 (le numéro de chaque élevage ou zone rurale est mentionné à la fois dans la carte géographiques et dans les tableaux).

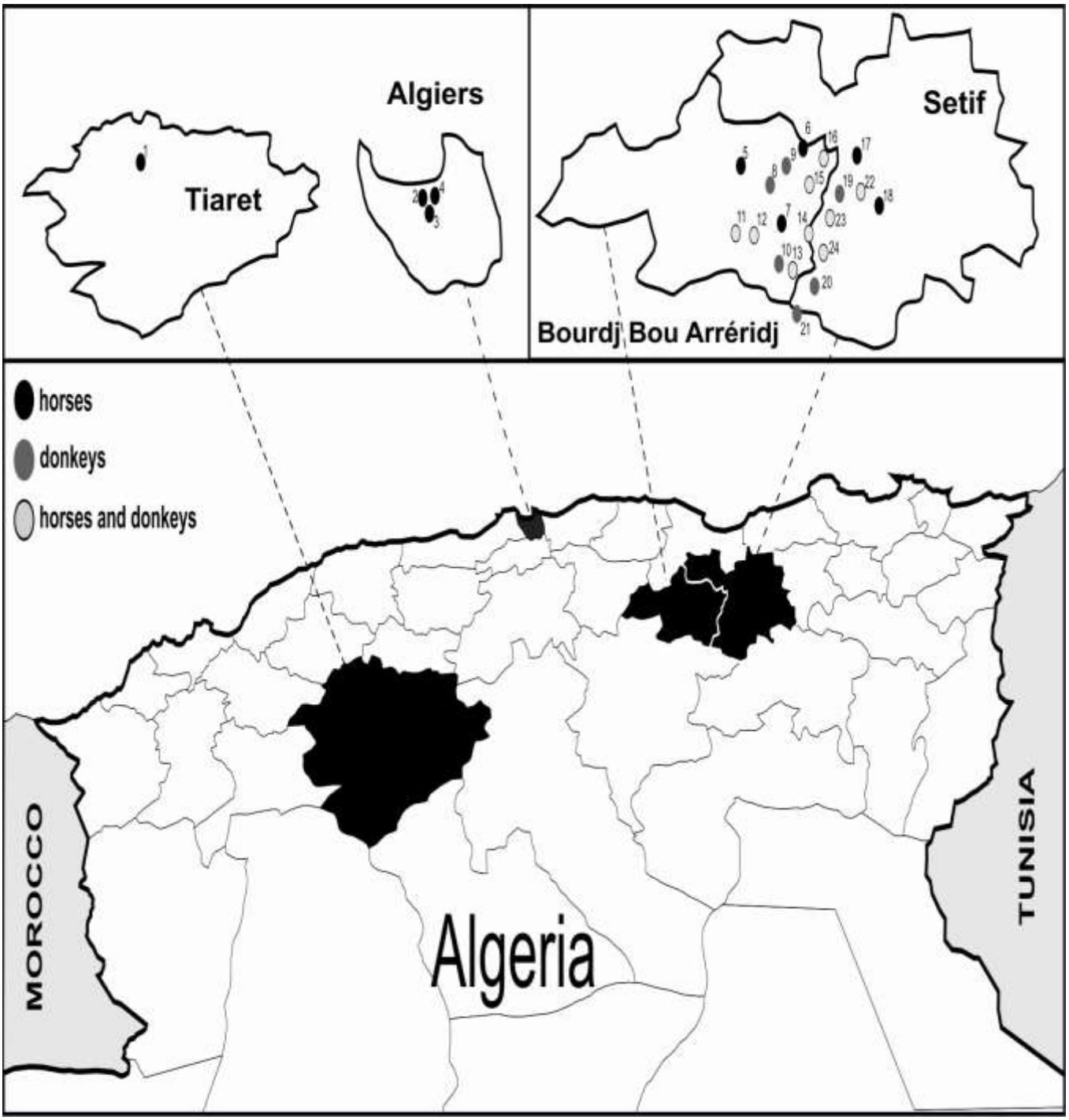


Figure 16: Distribution géographique des élevages des chevaux et les zones rurales étudiées (la figure a été établie par Corel Draw X5).

Tableau 6 : Zones rurales et nombre de prélèvements effectués.

Zone rurale	Nombre de prélèvements effectués
TWANNE (**14**)	3 chevaux et 3 ânes
SADRATA (**9**)	3 ânes
OULED SI HMED (**24**)	4 ânes et 3 chevaux
RMAILN (**15**)	2 chevaux et 4 ânes
OULED AMARA (**11**)	29 ânes et 8 chevaux
OULED TABANE (**20**)	23 ânes
TIXTARE et ses environs (**16**)	2 chevaux et 13 ânes
OULED THLIJANE (**12**)	6 chevaux et 3 ânes
OULED BRAHEME (**13**)	7 chevaux et 28 ânes
OULED HANACHE (**21**)	1 âne
BOUGBISSE (**8**)	3 ânes
OULED BOUNAB (**6**)	6 chevaux
DJRABAA (**7**)	5 chevaux
BIR CHHAME (**10**)	5ânes
AYADATE (**23**)	3 chevaux et 1 âne
OULED M'HALA (**19**)	3ânes
ZMALA (**22**)	11chevaux et 1 âne
ELKHARBA (**18**)	7 chevaux
OULED BOUTARA (**17**)	5 chevaux
LAWAZI (**5**)	2 chevaux

Tableau 7: Elevages collectifs et nombre de prélèvements effectués.

Elevage	Nombre de prélèvements effectués
Jumentrie de Tiaret (**1**)	**184**
Centre de kharouba (**2**)	**15**
Centre de kharouba (**3**)	**33**
Centre de kharouba (**4**)	**55**

2.2. Animaux et collecte des échantillons de féces

Au total, 481 échantillons (**357 chevaux** et **124 ânes)** de fèces ont été récoltés au niveau des différents élevages et régions rurales décrits préalablement.

Les chevaux prélevés au niveau de la jumentrie de Tiaret sont représentés par différentes catégories d'âge (juments, poulinières, étalons, poulains mâles et femelles).

Ces chevaux sont de race pur sang arabe et barbe. Par contre, dans les centres hippiques d'Alger, les chevaux prémevés sont des adultes (juments et étalons) de différentes races (pur sang arabe, barbe, races étrangères comme selle français, selle anglais, poney).

Tableau 8 : Age des chevaux et des ânes prélevés.

Fermes	Age des animaux		Nombre
Jumentrie de Tiaret (1)	Poulains (< 2ans)		**110**
	adultes		**74**
Centre de kharouba (2)	Poulains (< 2ans)		**0**
	adultes		**15**
Centre de kharouba (3)	Poulains (< 2ans)		**0**
	adultes		**33**
Centre de kharouba (4)	Poulains (< 2ans)		**0**
	adultes		**55**
Régions rurales	Chevaux	poulains (<2ans)	**15**
		adultes	**55**
	Anes	jeunes (< 2ans)	**10**
		adultes	**114**

Les chevaux et les ânes prélevés dans les régions rurales sont surtout des animaux adultes, excepté, les fèces de quelques poulains et jeunes ânes ont été obtenus. La race des chevaux apparait comme pur sang arabe et barbe, mais celle des ânes est indéterminée.

Sur l'ensemble des poulains âgés moins de 2 ans, 99 sont âgés moins de 6 mois et 26 sont superieurs à 6 mois. Aussi, pour les jeunes ânes agés moins de 2 ans, 8 sont moins de 6 mois et 2 sont superieurs à 6 mois.

Tableau 9 : Sexe des chevaux et des ânes prélevés.

Fermes		**Sexe des animaux**	**Nombre**
Jumentrie de Tiaret (1)		mâle	**74**
		femelle	**108**
Centre de kharouba (2)		mâle	**6**
		femelle	**9**
Centre de kharouba (3)		mâle	**19**
		femelle	**14**
Centre de kharouba (4)		mâle	**34**
		femelle	**16**
Régions rurales	**chevaux**	mâle	**15**
		femelle	**54**
	Anes	mâle	**10**
		femelle	**110**

Remarque : le sexe de 12 sujets (8 chevaux et 4 ânes) n'a été pas déterminé.

L'ensemble des animaux examinés n'ont pas présenté de diarrhée au moment de la récolte de leurs matières fécales.

Figure 17 : Jument dans son box, elevée dans la jumentrie de Tiaret.

Figue 18 : Poulain nouveau-né élevé dans une région rurale.

Figure 19 : Ane élevé dans une région rurale.

Figure 20 : Cheval pâturant à proximité des ovins dans une région rurale

2.3. Techniques de prélèvement

Les fèces des chevaux sont récupérées directement du rectum des animaux ou sur le sol juste après la défécation des chevaux. Par contre, les matières fécales des ânes ont été obtenues pour la plupart des cas sur le sol. Les fèces de 4 ou 5 ânes ont été récupérées directement du rectum. Noter que, seules les fèces fraiches ont été retenues dans les zones rurales. Les prélèvements ont été déposés dans des pots, hermétiquement fermés et étiquetés et ont été mis dans une glacière et conservés dans une température de réfrigération (+4 C°) jusqu'à leur analyse microscopique.

L'échantillonnage a été réalisé une seule fois pour chaque animal et une partie de chaque échantillon a été conservée dans le bichromate de potassium (2,5 %) à +4 C° pour l'analyse moléculaire.

Chaque prélèvement a été identifié par une étiquette collée au pot. Les informations sont résumées dans une fiche de renseignement où figurent :

*Pour chaque animal : âge, sexe, race, nature des selles (selles diarrhéiques ou non, diarrhée auparavant)

*Pour chaque élevage : état d'hygiène, type d'élevage, nombre des animaux.

2.4. Techniques d'analyses des prélèvements

L'analyse des échantillons de fèces a été réalisée dans le laboratoire de Parasitologie Mycologie de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger et dans l'institut de parasitologie, République tchèque, pour l'étude moléculaire. Les prélèvements fécaux ont subis deux types d'analyses :

***** L'analyse de routine (examen microscopique) pour la mise en évidence de ***Cryptosporidium spp***.

***** L'analyse moléculaire pour la détection des espèces et /ou génotypes et subtypes de ***Cryptosporidium***.

2.4.1. L'analyse de routine (examen microscopique)

Tous les échantillons ont été analysés pour la recherche des oocystes de ***Cryptosporidium spp*** par l'utilisation de la technique de concentration formol-éther (**Ritchie simplifiée par Allen et Redly**) et la coloration de **Ziehl Neelsen modifiée** spécifique pour les cryptosporidies.

2.4.1.1. Technique de concentration de Ritchie simplifiée par Allen et Redly

Elle permet de concentrer les oocystes de ***Cryptosporidium*** dans un petit volume de matières fécales par rapport au volume total analysé.

***Mode opératoire**

- 5 à 6 grammes de fèces sont déposés dans un verre à pied conique. Si la quantité obtenue au moment des prélèvements est minime, 1 à 3 grammes suffisent pour réaliser la technique.
- Verser dans le verre à pied conique un volume de formol (10 %), 2 à 3 fois supérieur à la quantité de faces déposées (le formol à 10 % est préparé à partir d'une solution formolée de 37 %).
- Agiter le tout à l'aide d'un agitateur en verre, jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.
- Laisser la solution décanter quelques secondes pour l'obtention d'un surnageant dépourvu de gros débris.
- Verser directement une quantité de ce surnageant dans les 2/3 du volume d'un tube conique en plastique. Si la quantité du surnageant ne suffit pas pour remplir les 2/3 du volume du tube, cette quantité doit être versée complètement dans ce dernier.
- Ajouter un volume d'éther équivalent au 1/3 du volume total du tube dans le cas où la quantité du surnageant ajouté représente 2/3 du volume du tube. Si le tube est complètement rempli, on doit laisser un espace d'environ 1 cm de l'ouverture du tube qui permet l'émulsion de matières fécales pendant l'agitation du tube.
- Préparer plusieurs tubes de la même manière (chacun de ces tubes correspond à un prélèvement unique).

- Peser les tubes pour équilibrer avant la centrifugation.

- Centrifuger à 2500 tours/m pendant 3 à 5minutes.

- Après la centrifugation, on obtient dans chaque tube, 04 couches qui sont du haut vers le bas (**Figure 21)** :

* Une couche d'éther de couleur jaune constituée de graisse

* Un anneau composé de gros débris

* Une couche aqueuse

* Le culot dans lequel les éléments parasitaires se sont concentrés

- Jeter le surnageant composé des 03 couches superficielles et garder le culot.

- Á l'aide d'une pipette pasteur, bien mélanger le culot et aspirer quelques gouttes pour préparer les frottis puis appliquer la coloration de Ziehl Neelsen modifiée.

2.4.1.2. Technique de coloration de Ziehl Neelsen modifiée

La technique de coloration utilisée dans notre étude est celle modifiée par Henriksen et Pohlenz (1981). Cette méthode de coloration est spécifique pour la mise en évidence des oocystes des cryptosporidies dans les matières fécales ou tout autre produit corporel (ex : liquide trachéal).

*** Mode opératoire**

- Confection d'un frottis : sur une lame bien dégraissée, on dépose à l'aide d'une pipette pasteur une goutte du culot obtenu par la technique de concentration. Ensuite, à l'aide d'une autre lame, on étale la goutte le long de la lame.

- Laisser le frottis sécher à l'air.

- Fixation du frottis dans le méthanol pur pendant 5 minutes.

- Laisser sécher à l'air.

- Colorer par la fuschine phéniquée de Ziehl pendant une heure.

- Rincer la lame sous l'eau de robinet (tout en faisant attention de ne pas décoller le frottis).

- Décoloration avec l'acide sulfurique à 2 % pendant 20 secondes.

- Rincer sous l'eau de robinet.

- Colorer avec le vert de Malachite (5 %) pendant 5 minutes.

- Rincer sous l'eau de robinet.

- Sécher à l'air.

- La lecture du frottis coloré se fait au grossissement x 40, puis x 100 avec l'huile d'immersion

- La lecture doit se faire sur toute la surface du frottis coloré.

Les oocystes de ***Cryptosporidium*** sont colorés en rouge vif ou rose sur un fond vert. Le degré et la proportion de couleur varient avec les oocystes. En outre, les structures internes prennent le colorant de façon variable. Certains peuvent apparaître vides alors que d'autres peuvent contenir les éléments en croissant caractéristiques des sporozoites. Les oocystes de ***Cryptosporidium*** apparaissent sous la forme de disque de 4 à 6 µm de diamètre. Les levures, Certaines spores de bactéries et les débris fécaux se colorent également en rouge vif ou rose.

La présence d'un seul oocyste sur toute la surface de la lame suffit pour considérer le prélèvement comme positif (animal infecté).Les échantillons négatifs doivent être déclarés comme "aucun oocyste de cryptosporidies n'est observé" (O.I.E., 2005).

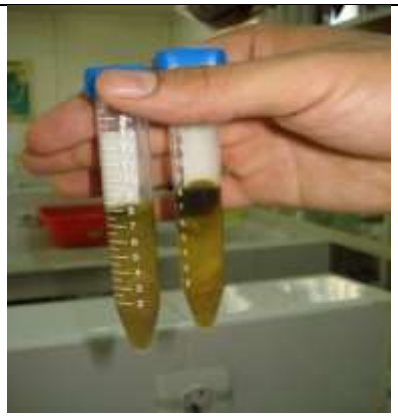


Figure 21 : Culot obtenu après la technique de concentration

Figure 22 : Une goutte de culot destinée à la confection d'un frottis

Figure 23 : Frottis de fèces

Figure 24 : Frottis obtenu après la coloration avec la fuschine de Ziehl

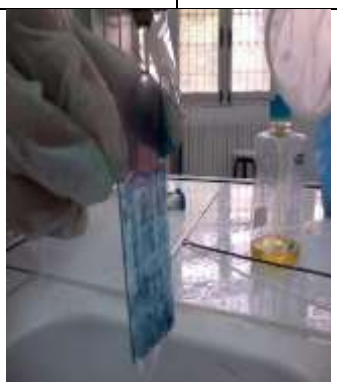


Figure 25 : Frottis obtenu après la coloration avec le vert de Malachite

2.4.2. L'analyse moléculaire

La recherche des cryptosporidies par les techniques de la biologie moléculaire passe par plusieurs étapes, qui nécessitent l'utilisation des appareils spécialisés et des réactifs spécifiques. Ces étapes commencent par l'extraction de l'ADN du parasite éventuellement présent dans les échantillons prélevés et se terminent par le séquençage de l'ADN positif et l'analyses des séquences d'ADN obtenues. Tous nos échantillons récoltés ont été analysés par ces méthodes moléculaires.

2.4.2.1. Extraction de l'ADN

200 à 400 mg de fèces ont été homogénéisés par **"bead disruption"** en utilisant le **FastPrep®-24 instrument (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA)** (Figure 26) et l'ADN total a été extracté avec un Kit commercial d'isolation **QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)** en suivant les instructions du fabricant.

*** Mode opératoire**

- Peser 200 à 400 mg de fèces dans un tube **safe-lock** à 2 ml

- Ajouter le **"glasse beads"** avec 1,4 ml de solution **lysis buffer P** dans le tube, ensuite mixer par vortex et faire la **disruption** avec une vitesse maximale pendant 2 minutes.

- Incubation du tube à 95 C° pendant 10 minutes.

-Centrifuger les prélèvements à 20000 g (14000 rpm) pendant 1 minute.

- Pipeter tout le surnagent obtenu, dans un tube **InviAdsorb-tube**, vortex 15 secondes, incubation à température ambiante pendant une minute, centrifuger à 20000 g (14000 rpm) pendant 3 minutes.

- Pipeter tout le surnagent dans un nouvel tube microcentrifuge, centrifuger à 20000 g (14000 rpm) pendant 3 minutes.

- Pipeter 25 µl de la **protéinase K** dans un nouvel tube microcentrifuge à 1,5 ml, ajouter 400 µl du surnagent, vortex 15 secondes**.**

- Incubation à 70 C° pendant 10 minutes**.**

- Ajouter 400 µl **du binding buffer P,** vortex 15 secondes

- Appliquer la lyse complète dans un **spin filter +tube,** incubation à température ambiante pendant une minute et centrifuger à 20000 g (14000 rpm) pendant 1 minute.

-Eliminer la collection du tube**,** ajouter 500 µl de solution **WASH I dans le spin filter membrane,** centrifugation à 20000 g (14000 rpm) pendant 1 minute.

- Eliminer la collection du tube**,** ajouter 800 µl de solution **WASH II dans le spin filter membrane,** centrifugation à 20000 g (14000 rpm) pendant 1 minute.

- Eliminer la collection du tube et centrifuger à 20000 g (14000 rpm) encore une fois pendant 3 minutes**.**

- Transférer le **spin filter** dans un nouvel tube microcentrifuge, ajouter 200 µl de **Elution buffer D** (incubée préalablement à 70 C°), incubation à température ambiante pendant 3 minutes, centrifuger à 6000 g (8000 rpm) pendant une minute pour séparer **l'ADN.**

L'ADN extracté de tous les prélèvements est conservé dans des eppendorfs à -20 C° et utilisé lors de la réaction PCR.

***Matériel utilisé**

-FastPrep®-24 instrument (bead disruption), centrifugeuses de haute performance, vortex, lampes ultraviolets pour la décontamination, incubateurs, micropipettes de bonne qualité.

Figure 26 : Instrument FastPrep®-24

Figure 27 : Lampe UV pour la décontamination

Figure 28 : vortex, centrifugeuse de haute performance, micropipettes, incubateur et lampe UV

2.4.2.2. L'amplification de l'ADN par PCR

Nous avons utilisé au cours de notre manipe la PCR nichée ou (nested PCR), qui est plus sensible et plus efficace que la PCR simple. La PCR nichée se déroule en deux temps : PCR primaire et PCR secondaire.

Pour déterminer la présence éventuelle des espèces et/ou génotypes de ***Cryptosporidium,*** nested PCR a été performée par l'amplification du fragment du gène codant pour l'SSU de l'ADNr (small subunit of ribosomal DNA)***.*** L'amplification du fragment du gène codant pour GP60 (glycoprotéine de surface 60) a été développée pour l'isolement des subtypes des espèces et/ou génotypes de ***Cryptosporidium***.

***Amplification du gène SSU de l'ADNr**

Approximativement une longueur de 830 bp du fragment du gène codant pour SSU de l'ADNr, a été amplifiée par **nested PCR** selon (Jian et al., 2005).

Deux phases de la PCR nichée (PCR primaire et PCR secondaire) ont été achevées par l'utilisation des amorces spécifiques du genre ***Cryptosporidium*** (des amorces spécifiques de la PCR primaire F1 et R1 et des amorces spécifiques de la PCR secondaire F2 et R2). L'amplification est réalisée dans le thermocycleur et la réaction PCR (soit primaire ou secondaire) comporte 35 cycles, dont chaque cycle consiste en trois phases: phase de dénaturation (94 C° pendant 45 secondes), phase d'hybridation (55 C° pendant 45 secondes) et phase d'extension (72 C° pendant 60 secondes).

Aussi, l'amplification est précédée par une phase initiale de dénaturation (94 C° pendant 3 minutes) et terminée par une phase finale d'extension (72 C° pendant 7 minutes) (figure 17).

Le mélange de PCR (**Master mixe**) pour chaque échantillon contient les éléments cités dans le tableau **(9)** avec la quantité utilisée pour chaque réactif. Nous avons inclus dans chaque analyse un contrôle positif (***Cryptosporidium suis*** et ***Cryptosporidium andersoni)*** et un contrôle négatif (l'eau de PCR).

*__Amplification du gène Gp 60 (glycoprotéine de surface 60)__

Une longueur approximative de 830 bp du fragment du gène codant pour la glycoprotéine de surface 60 a été amplifiée par **nested PCR** en utilisant des amorces spécifiques du genre (AL3531et AL3535 dans la PCR primaire et AL3532 et AL3534 dans la PCR secondaire) selon (Alves et al., 2003).

Ainsi, l'amplification (soit primaire ou secondaire) comporte 35 cycles avec des variations de température dans la seconde phase de chaque cycle : phase de dénaturation (94 C° pendant 45 secondes), phase d'hybridation (50 C° pendant 45 secondes) et phase d'extension (72 C° pendant 60 secondes).

L'amplification est précédée par une phase initiale de dénaturation (94 C°pendant 3 minutes) et terminée par une phase finale d'extension (72 C° pendant 7 minutes)(figure18).

Le mélange de PCR (**Master mixe**) pour chaque prélèvement est celui utilisé dans l'amplification du gène codant pour SSU de l'ADNr avec des variations dans les amorces **(tableau 10)**.

Nous avons inclus dans chaque analyse un contrôle positif (***Cryptosporidium hominis)*** et un contrôle négatif (l'eau de PCR).

***Amplification d'autres genes**

Trois autres gènes incluant **COWP (**fragment de longueur de 384 bases), **TRAP-C1** (523 bases) et **HSP70** (277 bases**)** ont été amplifiés par Nested PCR (même protocole cité préalablement).

L'amplification a été limitée à certains échantillons positifs pour le gène SSU de l'ADNr.

Tableau 10 : Composition du mélange de PCR (**Master mixe**) pour chaque échantillon.

***CRYPTOSPORIDIUM* (Amplification du gène SSU de l'ADNr)**					
PCR Primaire			**PCR Secondaire**		
H2O	……	**12,30**	**H2O**	……	**13,10**
MgCl2	(25 mM)	**1,2**	**MgCl2**	(25 mM)	**1,2**
10× buffer	……	**2, 00**	**10× buffer**	……	**2, 00**
DNTP	10 mM	**0,40**	**DNTP**	10 mM	**0,40**
Forward	10 µM	**0,40**	**Forward**	10 µM	**0,40**
Reverse	10 µM	**0,40**	**Reverse**	10 µM	**0,40**
BSA	(10 mg/ml)	**0,80**	**BSA**	……	……..
Taq polymérase	(1 U/1µl)	**0,50**	**Taq polymérase**	(1 U/1µl)	**0,50**
DNA	…….....	**2, 00**	**DNA**	…….....	**2, 00**
Total	……	**20,00**	**Total**	……	**20,00**

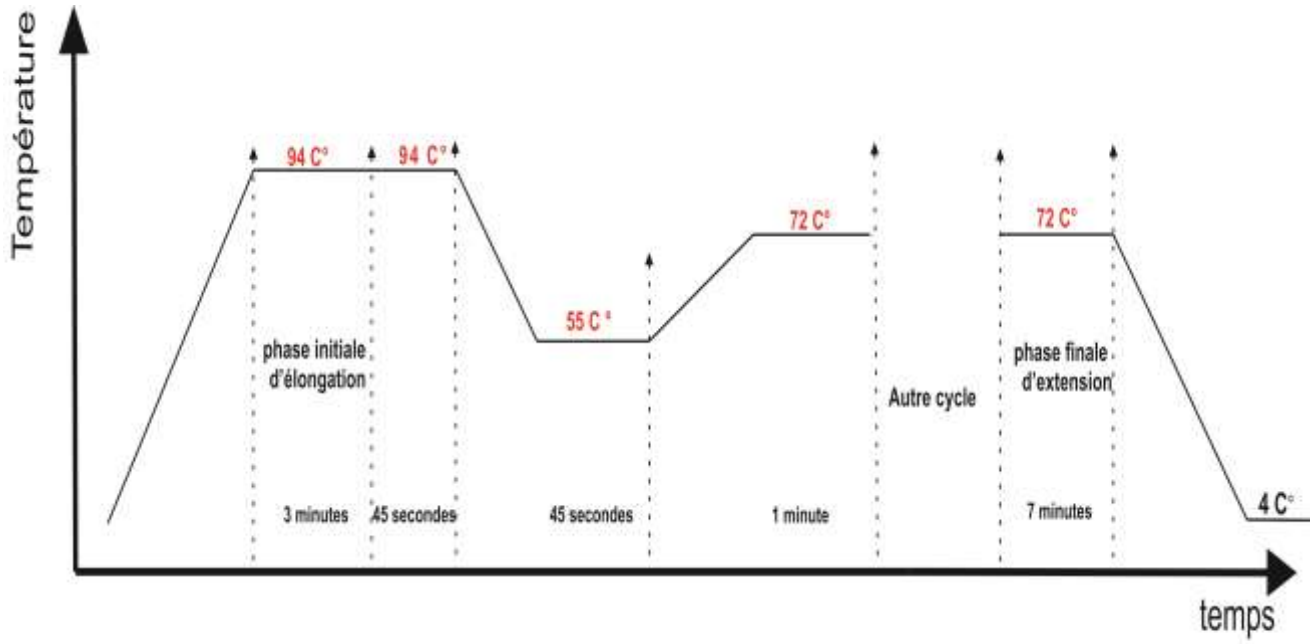


Figure 29 : Phases de l'amplification par PCR nichée du fragment de gène codant pour SSU rDNA
(La figure a été établisse par Corel Draw X5)

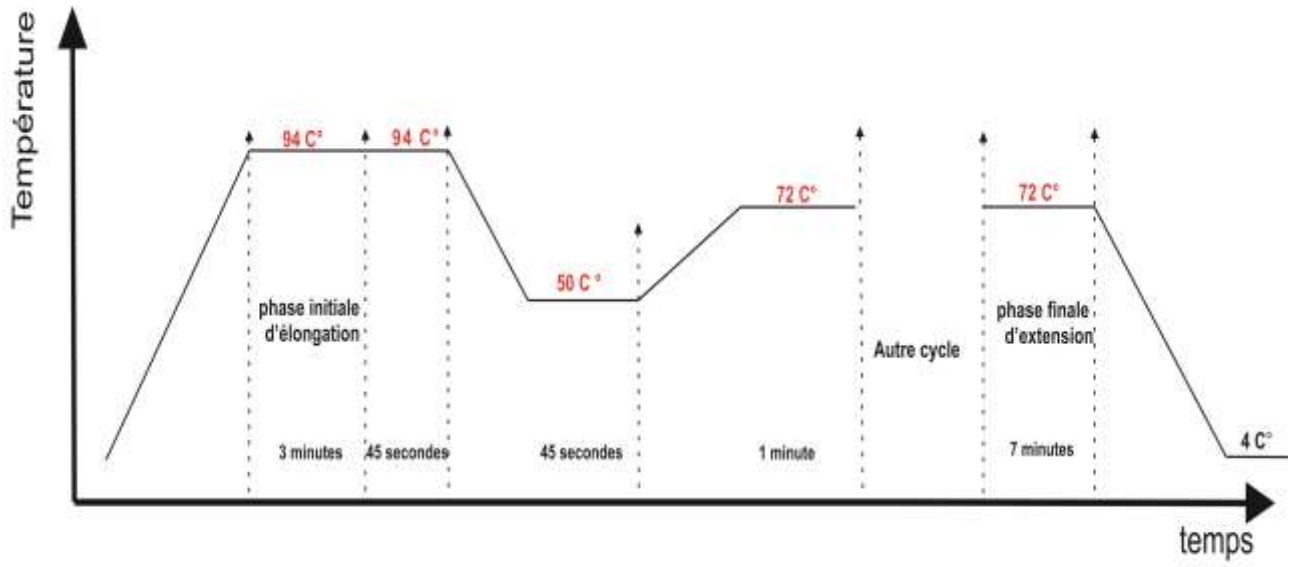


Figure 30 : Phases de l'amplification par PCR nichée du fragment de gène codant pour Gp 60

(La figure a été établisse par Corel Draw X5)

Identification moléculaire de *Microsporidia

Au cours de la recherche et l'isolement des cryptosporidies par les techniques moléculaires, un autre parasite (***Microsporidia***) a été identifié par l'utilisation du même protocole de la PCR nichée avec des variations de température et du temps dans les phases des cycles de la réaction PCR. L'identification de ces microorganismes a été réalisée par l'amplification du fragment ITS (**internal transcribed spacer**) du gène rRNA.

La recherche des microsporidies a concerné deux principales espèces incluant ***Encephalitozoon cuniculus*** et ***Entérocytozon bieneusi***.

La réaction PCR a été réalisée par l'utilisation des amorces spécifiques d'espèce pour ***Entérocytozon bieneusi*** et de genre pour ***Encephalitozoon*** **spp**. Contrairement aux cryptosporidies, où tous les échantillons de fèces (481) ont été amplifiés, seulement 343 prélèvements ont été analysés, uniquement par PCR pour la mise en évidence d'***Encephalitozoon*** **spp** et ***Entérocytozon bieneusi***.

2.4.2.3. Electrophorèse

Tous les produits ampliffiés, issus de la PCR secondaire de ***Cryptosporidium spp*** et ***Microsporidia*** ont été fractionnés en champs de gel d'agarose à 2 % avec 0.2mg/ml de bromide d'ethidium. Ensuite, les amplicons ont été visualisés sous la lumière ultraviolet.18 µl de chaque produit de la PCR secondaire ont été utilisés dans le gel d'agarose avec un 5µl de l'ADN marqueur (**DNA lader**).

2.4.2.4. Purification de l'ADN

Les produits de la PCR secondaire positifs au ***Cryptosporidium spp*** en électrophorèse (fragment du gel positif) ont été coupés de gel d'agarose et ont été mis dans des eppendorfs. La purification de l'ADN positif a été réalisée par l'utilisation d'un **"MinElute gel extraction kit"** en suivant les instructions du fabricant.

- Ajouter 400 µl de **Tampon QG** au eppendorf comportant le fragment du gel d'agarose, qui contient l'ADN positif.

- Incubation à 50 C° pendant 10 minutes, puis à température ambiante pour 2 à 3 minutes.

- Transférer la solution dans un tube à **spin filter**

- Centrifuger le tube pendant une minute

- Eliminer le contenu du tube et garder le filtre

- Ajouter dans le même tube 500 µl **Tampon QG**

- Centrifuger encore une fois le tube pendant une minute

- Eliminer le contenu du tube et garder le filtre

-Ajouter 750 µl **de Tampon PE**

- Incubation à température ambiante pour 2 à 5 minutes, Centrifuger pendant une minute

-Eliminer le contenu du tube et garder le filtre

- Centrifuger encore une fois pendant une minute

- Transférer le filtre dans un eppendorf et ajouter 30 à 50 µl de **solution "Elution EB"**

- Incubation à température ambiante pour une minute et centrifuger pendant une minute.

- Récupération de L'ADN.

2.4.2.5. Séquençage, analyses et phylogénie des séquences

Les produits de la PCR secondaire purifiés (ADN purifié à partir des échantillons positifs) ont été séquencés par l'intermédiaire de **ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and ABI 3730XL sequence analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA)**. Le séquençage préalablement précédée par la quantification de l'ADN, a été performé en double direction par l'utilisation des amorces de la PCR secondaire. Les séquences nucléotidiques obtenues (pour les deux gènes SSU et GP 60) ont été éditées et alignées avec elles par l'utilisation du programme **ChromasPro 1.5 (Technelysium, Pty, Ltd.)**. L'alignement avec les séquences de références téléchargées initialement de la base des donnés génétiques (GenBank), a été effectué par le **ClustalX 2.0.6.**

Les ajustements de l'alignement ont été réalisés manuellement pour enlever les gaps artificiels par l'intermédiaire du programme **Bio Edit.** L'analyse phylogénique a été étudiée par le programme **TREECON.** Le joint **Neighbour** et le maximum likelihood des arbres phylogéniques ont été construits. Toutes les positions ambigües ont été enlevées de chaque paire de séquences. La fiabilité des branches de l'arbre

phylogénique a été évaluée par **bootstrap analysis avec** 1000 **pseudo-replicates,** associées à des valeurs supérieures à 50 % rapportées. Les phylogrammes ont été dessinés par l'utilisation de **MEGA 5** et ont été ajustés par l'intermédiaire de **CorelDrawX5.**

3. Analyses statistiques

Nos résultats sont traités par le logiciel «Excel STAT 2007 ». Trois tests ont été utilisés pour analyser ces résultats : le test khi deux d'indépendance, la correction de Yates et le test de Fisher exact.

Ces tests traitent des résultats de nature qualitative et permettent la comparaison des résultats en fonction des différents paramètres étudiés dans notre investigation. Ils sont basés sur la calcule des valeurs théoriques à partir de nos valeurs observées sur le terrain pour donner un seuil de signification (valeur P) qui représente l'élément clé de cette comparaison.

4. RÉSULTATS

4.1. Observation de *Cryptosporidium spp* par microscopie

Les oocystes de ***Cryptosporidium spp*** apparaissent colorés en rouge vif ou rose sur un fond vert. Le degré et la proportion de couleur varient avec les oocystes.

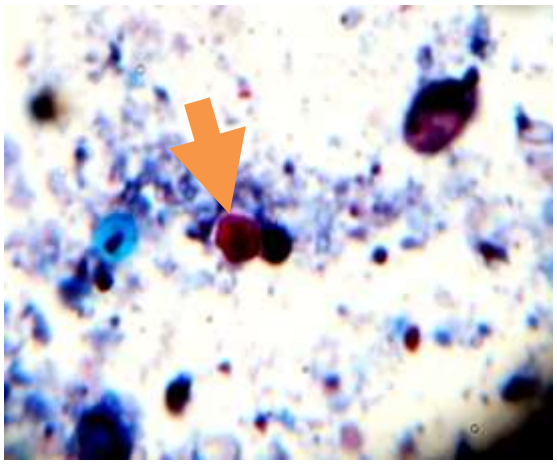


Figure 31: Oocystes de ***Cryptosporidium spp*** observés par la coloration de Ziehl Neelsen modifiée chez les ânes (G x100).

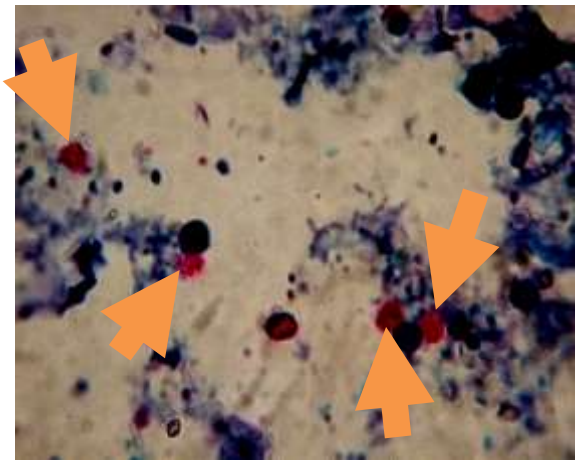


Figure 32 : Oocystes de ***Cryptosporidium spp*** observés par la coloration de Ziehl Neelsen modifiée chez les chevaux (G x100).

4.2. Lecture de *Cryptosporidium spp* en électrophorèse

L'ADN des échantillons positifs migre en même niveau que les contrôles positifs (830 bp). Les contrôles négatifs (l'eau de PCR) permettent de contrôler les réactions d'amplification par l'observation de l'absence des traces d'ADN dans les bandes correspondantes.

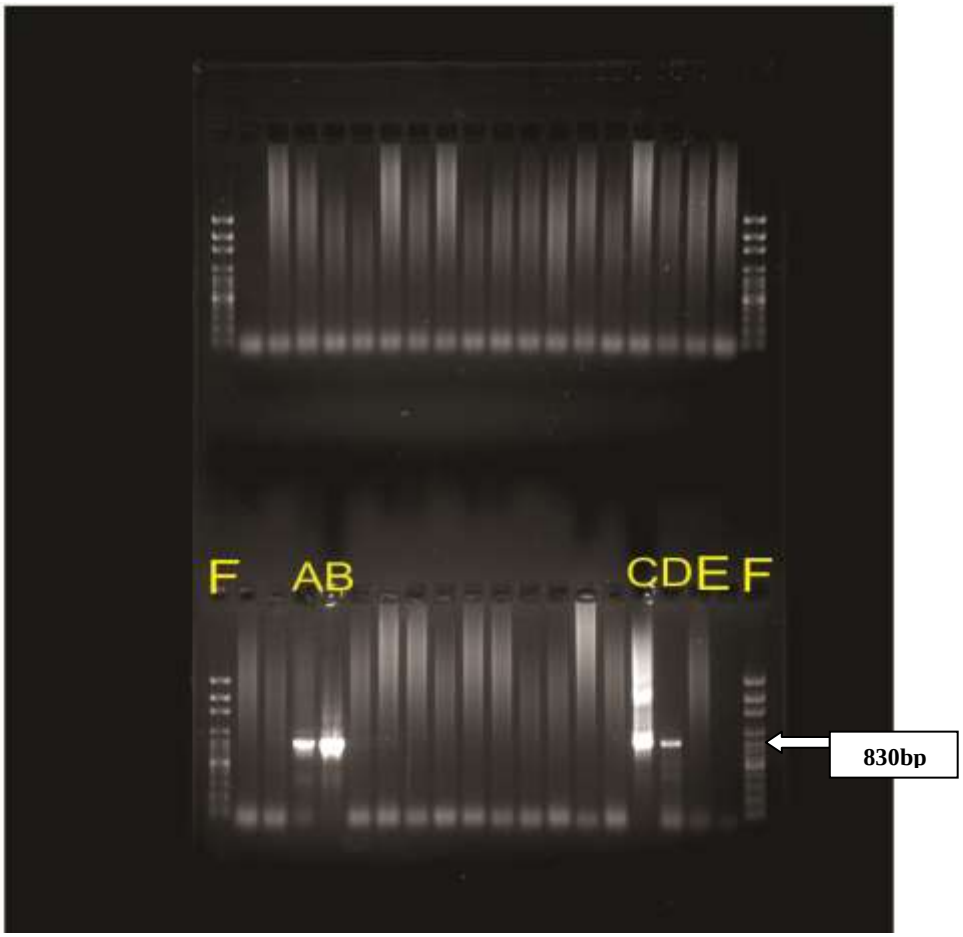


Figure 33: Nested PCR de ***Cryptosporidium spp*** chez les chevaux par l'utilisation des amorces spécifiques du genre et la visualisation des produits en gel d'électrophorèse avec l'ethidium bromide sous la lumière ultraviolet. (Bande A et B : prélèvements positifs, bande C et D : contrôles positifs, bandes E : contrôle négatif (eau de PCR), bande F : **DNA lader** (ADN marqueur).

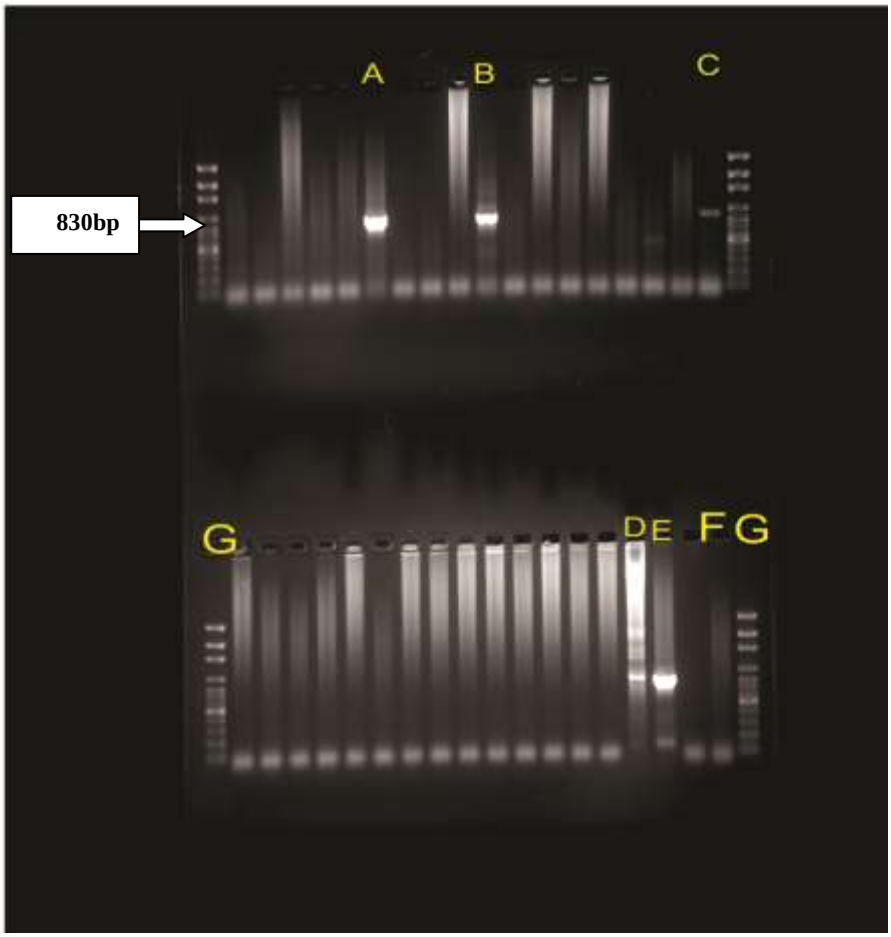


Figure 34 : Nested PCR de ***Cryptosporidium spp*** chez les ânes par l'utilisation des amorces spécifiques du genre et la visualisation des produits en gel d'électrophorèse avec l'ethidium bromide sous la lumière ultraviolet. (Bande A, B, C : prélèvements positifs, bande D et E : contrôles positifs, bandes F : contrôle négatif (eau de PCR), bande G : **DNA lader** (ADN marqueur).

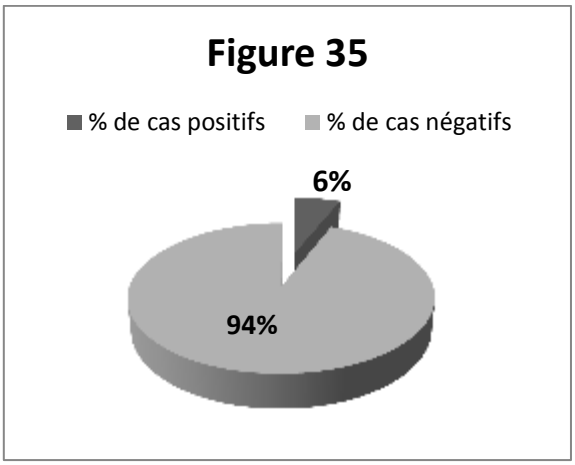
4.3. Prévalence globale de l'infection par *Cryptosporidium spp*

Le taux d'infestation par les cryptosporidies chez l'ensemble des animaux examinés a été estimé par les deux techniques. Sur le nombre total des équidés prélevés, 29 cas étaient positifs par microscopie et 13 cas par la PCR nichée, ce qui correspond un taux d'infestation de 6,02 % (29/481) et 2,70 % (13/481) respectivement (figure 23 et 24).

Tableau 11: Prévalence globale de ***Cryptosporidium spp*** chez les chevaux et les ânes.

Animaux	**Nombre de prélevements**	**Nombre de cas positifs (%) par microscopie**	**Nombre de cas positifs (%) par PCR nichée**
Chevaux	357	26 (7, 28 %)	9 (2, 52 %)
Anes	124	3 (2, 41 %)	4 (3, 22 %)
Total	481	29 (6, 02 %)	13 (2, 70 %)

Statistiquement, la comparaison entre la prévalence globale chez la population équine obtenue par l'observation microscopique et celle obtenue par les techniques de la biologie moléculaire a montré une différence significative ($p < 0,05$).



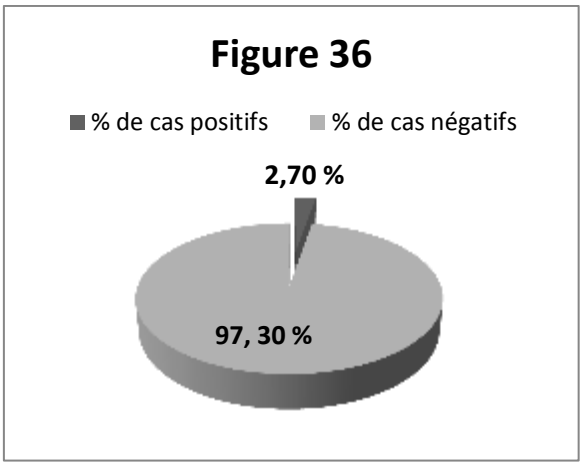
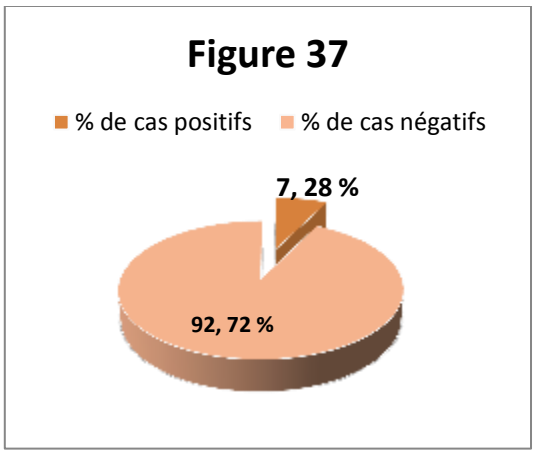


Figure 35 et 36 : Taux d'infestation global de ***Cryptosporidium spp*** chez les équidés par microscopie (figure 35) et par nested PCR (figure 36).



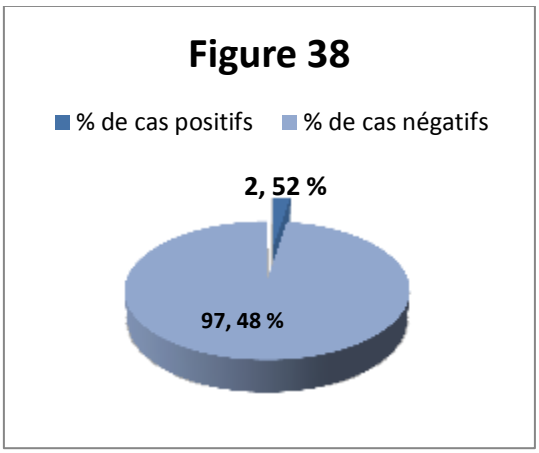


Figure 37 et 38 : Taux d'infestation de ***Cryptosporidium spp*** chez les chevaux par microscopie (figure 37) et par nested PCR (figure 38).

Chez les chevaux, le taux d'infestation a été 7,28 % (26/357) par microscopie et 2,52 % (9/357) par l'amplification PCR (figure 37 et 38).Parmi 26 cas positifs par coloration, seulement 6 cas sont postifs par PCR et parmi 9 chevaux positifs par PCR nichée, 3 cas (deux adultes et un poulain âgé plus de 6 mois) ont été négatifs par l'observation microscopique.

Chez les ânes, l'examen microscopique et la PCR nichée ont révélé respectivement un taux d'infestation de 2, 41 % (3/124) et 3,22 % (4/124) (figure 39 et 40). Les 3 cas qui sont positifs par la coloration, ils sont négatifs par PCR et un seul cas (jeune) a été positif par nested PCR, mais négatif par microscopie.

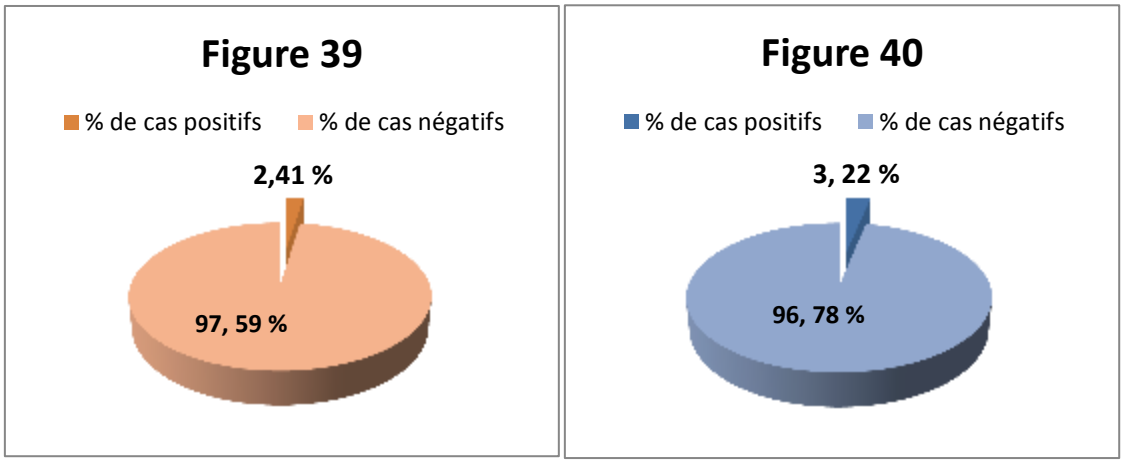


Figure 39 et 40 : Taux d'infestation de ***Cryptosporidium spp*** chez les ânes par microscopie (figure 39) et par nested PCR (figure 40).

La comparaison statistique entre le taux d'infestation obtenu chez les chevaux par microscopie (association entre concentration et coloration) et celui obtenu par PCR, a révélé une différence significative ($P < 0,05$). Chez les ânes, aucune différence significative n'a été observée entre les deux techniques dans la détection des cryptosporidies dans les fèces.

4.4. Prévalence de l'infection par *Cryptosporidium spp* selon l'âge des animaux

Par microscopie, parmi 135 jeunes équidés examinés (âgés moins de 2 ans), seulement 12 poulains ont été infectés, ce qui correspond un taux de 8,88%. Chez

l'ensemble des chevaux et des ânes adultes, l'observation microscopique a noté un taux d'infestation de 4, 91 % (17/346). Aucune différence significative (P> 0,05) n'a été observée dans l'isolement des cryptosporidies par la technique de coloration chez l'ensemble des jeunes et des adultes examinés. La réaction PCR a montré seulement 4 cas positifs (3 poulains et 1 jeune âne) chez les jeunes (2,96 %) et 9 cas positifs (6 chevaux et 3 ânes) chez les équidés adultes (2,60%). Comme l'examen microscopique, aucune différence significative (P> 0,05) n'a été révélée par la PCR nichée entre le taux d'infestation chez les jeunes et celui des adultes.

Tableau 12 : Prévalence de ***Cryptosporidium spp*** selon l'âge des chevaux et des ânes.

Animaux		**Nombre de prélevements**	**Nombre de cas positifs (%) par microscopie**	**Nombre de cas positifs (%) par PCR**
Chevaux	Poulains agés < 2 ans	125	12/125 (9, 6%)	3/125 (2,4 %)
	Adultes	232	14/232 (6,03%)	6/232 (2,58%)
Anes	Jeunes agés < 2 ans	10	0/10 (0,0 %)	1/10 (10%)
	Adultes	114	3/114 (2,63%)	3/114 (2,63%)
Total	Jeunes équidés	135	12/135(8, 88 %)	4/135 (2, 96 %)
	Adultes équidés	346	17/346 (4, 91 %)	9/346 (2, 60%)

Chez les chevaux, l'analyse statistique a montré une différence non significative entre le taux d'isolement des cryptosporidies chez les poulains âgés moins de 2 ans et celui chez les adultes, quelque soit la méthode utilisée.

Tableau 13 : Prévalence de ***Cryptosporidium spp*** chez les poulains et les jeunes ânes âgés moins de deux ans.

	Age	% par microscopie	% par PCR nichée
Poulains âgés < 2ans	Inferieurs à 6 mois	12/99 (12, 12%)	2/99 (2, 02 %)
	Supérieurs à 6 mois	0/26 (0%)	1/26 (3,84)
Anes âgés < 2ans	Inferieurs à 6 mois	0/8 (0,0 %)	1/8 (12,5 %)
	Supérieurs à 6 mois	0/2 (0,0 %)	0/2 (0,0 %)

Par l'examen microscopique, les poulains âgés moins de 6 mois sont plus infectés que ceux âgés plus de 6 mois (différence significative). Cependant, les résultats sont presque identiques par PCR.

Chez les ânes, l'échantillonnage très faible rend les analyses statistiques difficiles à réaliser. Cependant par les deux techniques, l'application du test Fisher exact a montré que les jeunes sont infectés indifféremment par rapport aux adultes.

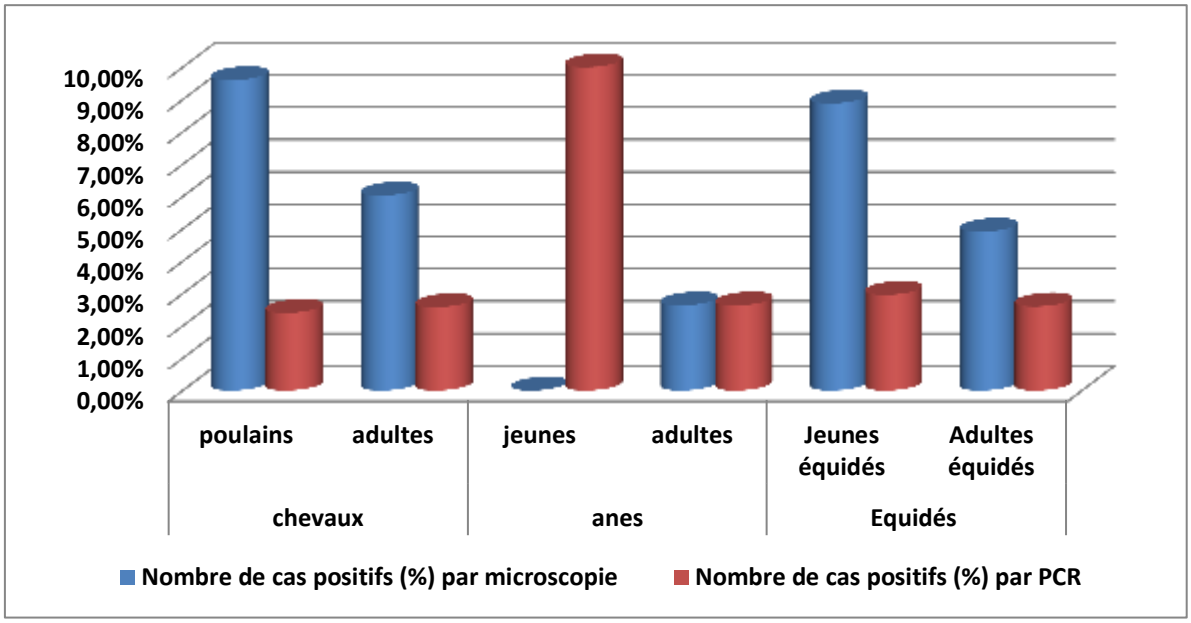


Figure 41 : Distribution du taux d'infestation de ***Cryptosporidium spp*** selon l'âge des animaux.

4.5. Prévalence de l'infection par *Cryptosporidium spp* selon le sexe des animaux.

Le nombre total des mâles infestés a été 13 cas par l'observation microscopique et 4 cas par la réaction PCR. Parmi 311 femelles examinées, 16 cas ont été positifs par microscopie et 9 cas par PCR.

Tableau 14: Prévalence de ***Cryptosporidium spp*** selon le sexe des chevaux et des ânes.

Animaux		**Nombre de prélevements**	**Nombre de cas positifs (%) par microscopie**	**Nombre de cas positifs (%) par PCR**
Chevaux	mâles	148	13 (8, 78%)	4 (2,70 %)
	femelles	201	13 (6,64 %)	5 (2,48 %)
Anes	Mâles	10	0 (0%)	0(0%)
	femelles	110	3 (2, 72 %)	4 (3,36%)
Total	mâles	158	13 (8, 22 %)	4 (2, 53%)
	femeles	311	16 (5, 14%)	9 (2,89 %)

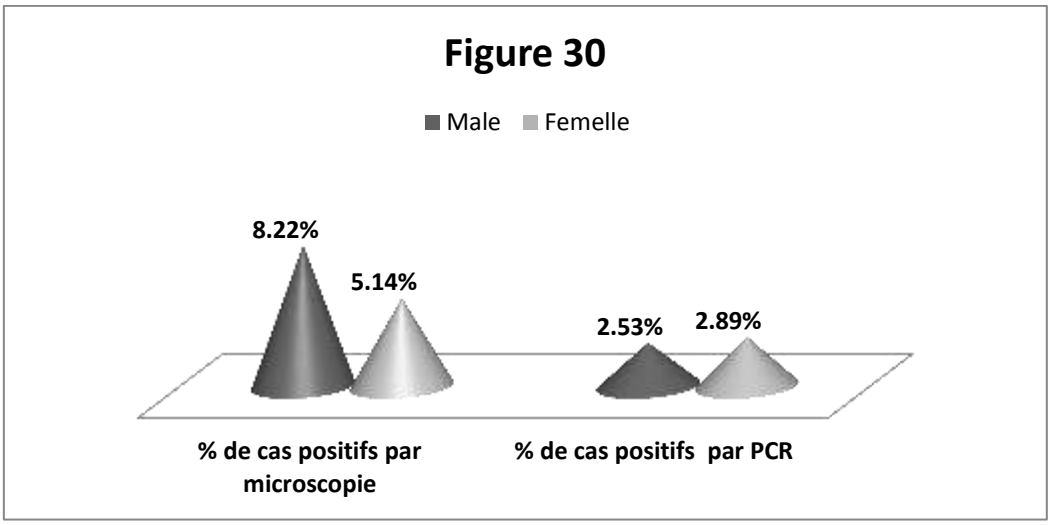
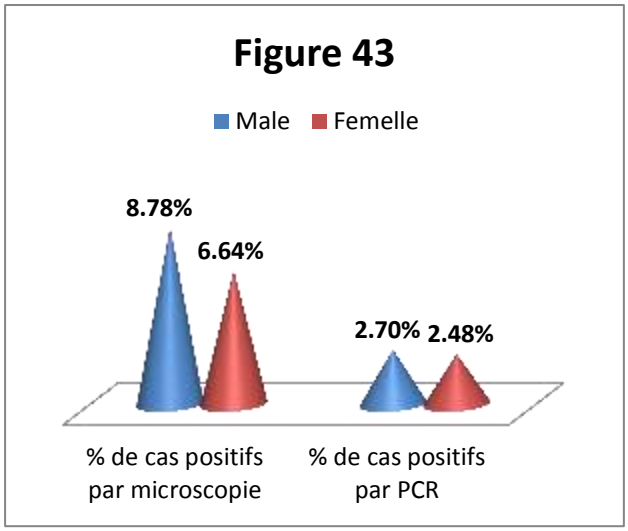


Figure 42 : Taux d'infestation de ***Cryptosporidium spp*** chez les équidés mâles et femelles par les deux techniques.

Aucune différence significative n'a été observée dans l'isolement des cryptosporidies en fonction du sexe chez l'ensemble des équidés examinés.



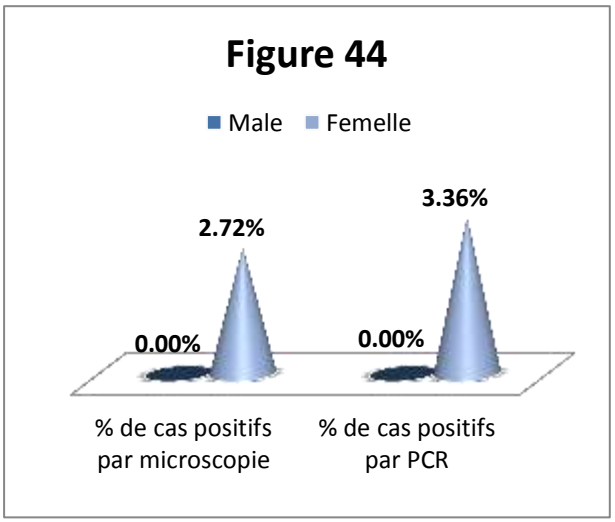


Figure 43 et 44 : Taux d'infestation de ***Cryptosporidium spp*** chez les deux sexes des chevaux (figue 43) et des ânes (figure 44) par les deux techniques.

Par les deux techniques de diagnostic utilisées, aucune différence significative n'a été notée dans l'isolement des cryptosporidies chez les chevaux en fonction du sexe. Même observation a été constatée chez les ânes.

4.6. Prévalence de l'infection par *Cryptosporidium spp* selon la présence ou l'absence des diarrhées

Tous les chevaux prélevés au niveau des élevages de Tiaret et de Kharouba n'ayant pas présenté des signes diarrhéiques au moment de la récolte des fèces et même 15 jours auparavant. Chez les chevaux et les ânes récoltés dans les régions rurales, aucun animal n'a été signalé diarrhéique au moment du prélèvement des fèces, à l'exception d'une ânesse ayant présenté une diarrhée liquide. A cet effet, l'implication des cryptosporidies chez les animaux infectés n'a été pas associée avec des diarrhées.

4.7. Distribution géographique de chevaux et des ânes infectés

Les équidés infectés particulièrement par les techniques moléculaires sont répartis sur quatre régions situées dans deux wilayas (Tiaret et Bourdj Bou Arréridj) (figure 45). 7 cas positifs de chevaux ont été isolés dans la jumentrie de Tiaret (N°1 dans la carte) et aucun cas n'a été détecté dans les autres fermes collectives (élevages de Kharouba) situées dans la Wilaya d'Alger (N°2, 3, 4 dans la carte). Statistiquement, il peut être difficile d'évaluer l'influence du type d'élevage sur la répartition des cas positifs en raison de l'échantillonnage faible observé dans certaines fermes. Cependant, la comparaison statistique entre deux fermes avec un échantillonnage élevé (élevage de

Tiaret et **centre de Kharouba 4**) a montré une différence significative (P= 0.03). Donc, tous les chevaux infectés ont été trouvés au niveau de la ferme de Tiaret.

Un cas positif chez les ânes a été détecté dans la région rurale Bougbisse (N°8 dans la carte). Dans les régions rurales Ouled Brahem (N°13) et Textere (N°16), l'infection a été observée aussi bien chez les chevaux que chez les ânes (un cheval et deux ânes dans la région Ouled Brahem, un cheval et un âne dans la région de Texter).

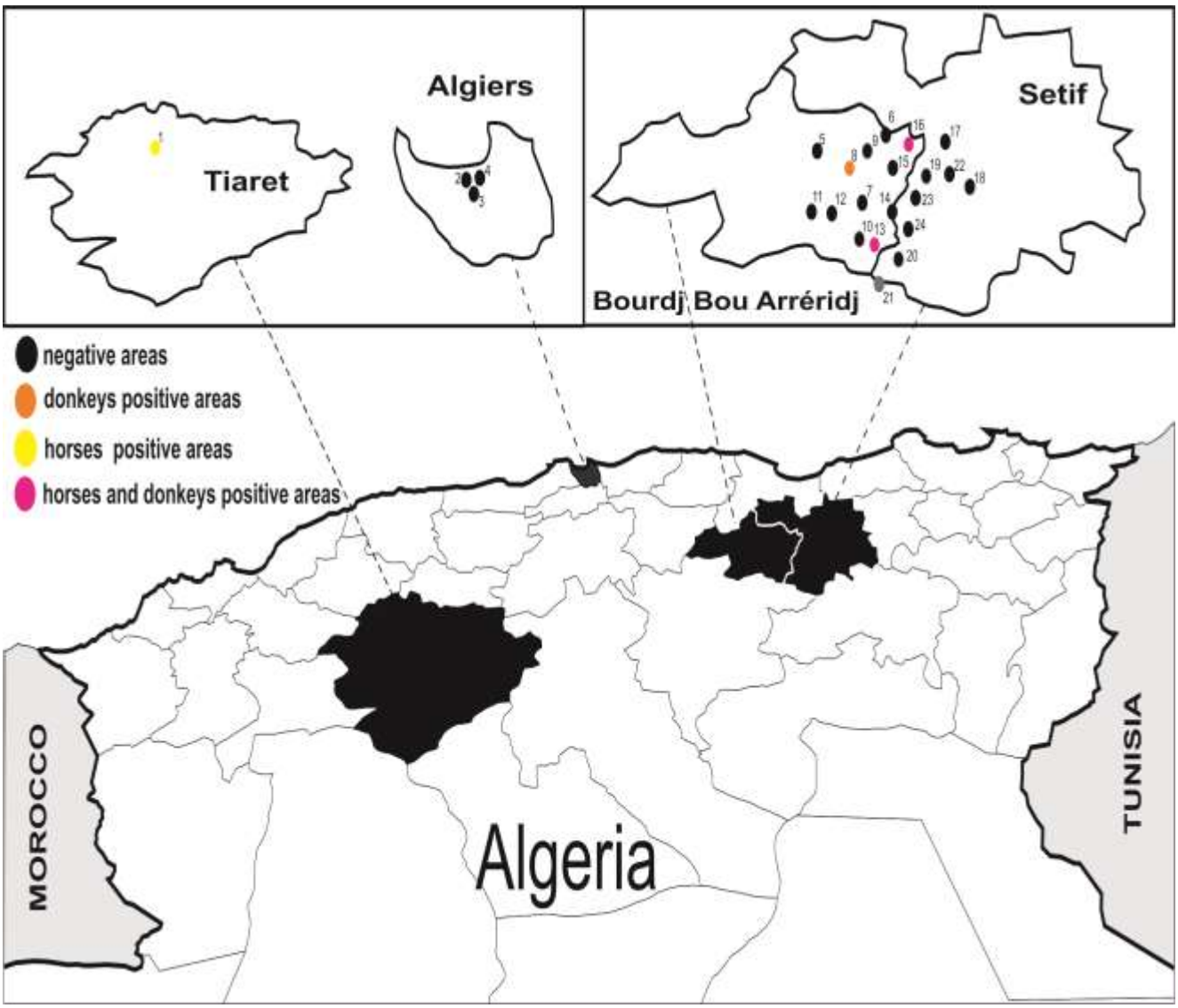


Figure 45 : Répartition géographique des cas positifs de ***Cryptosporidium spp*** chez les chevaux et les ânes.

4.8. Caractérisation moléculaire de *Cryptosporidium spp*

4.8.1. Séquençage de l'ADN positif et obtention des séquences nucléotidiques

Le séquençage de **l'ADN** des cas positifs a été performé en double direction par l'utilisation des Kits spécifiques et les amorces de la PCR secondaire. Le séquençage est réalisé par un appareil spécifique (**sequence analyser**), qui permet la visualisation de l'ADN sous forme d'un chromatogramme. La lecture de ce dernier se fait par un programme spécifique **chromasPro**. La figure 34 représente le chromatogramme de l'AND positif (fragment de 48 bp), dont chaque onde avec sa couleur correspond à un nucléotide.

L'ensemble des nucléotides obtenus constitue une séquence initiale qui sera analysée pour donner une séquence finale (figure 35), qui représente l'espèce ou le génotype de ***Cryptosporidium*** identifié.

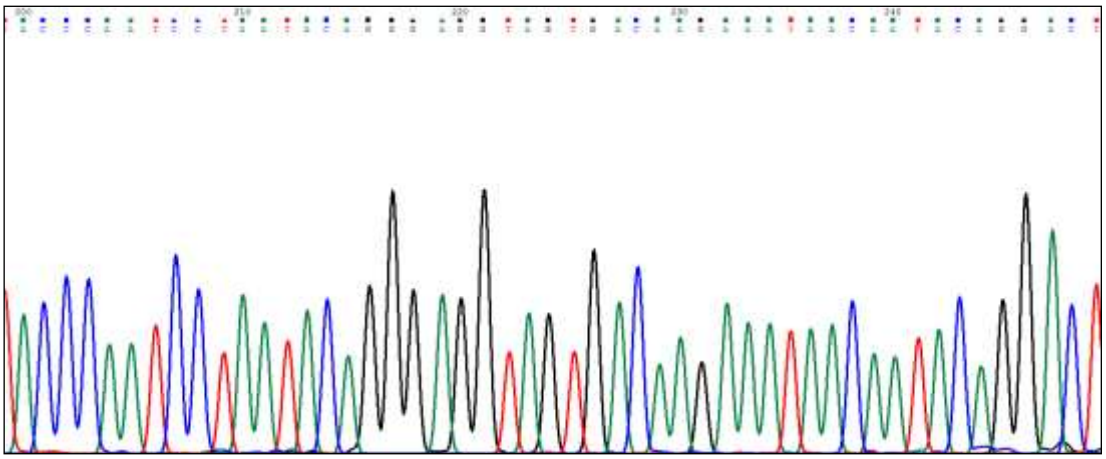


Figure 46 : Séquençage de l'AND positif par l'intermédiaire d'ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and an ABI 3730XL sequence analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA) et la lecture de la séquence par le programme **ChromasPro** (fragment de 48 bp).

> [karim SSU 765 (1).fasta - 765 bp] gi|464907985|gb|KC305647.1| Cryptosporidium sp. hedgehog genotype isolate M1029 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence –

GGTGACTCATAATAACTTTACGGATCACATTAAATGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGA
CGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT
GAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATGCAGGGAGGTAGT
GACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTAT
CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCA
GTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTAATGAATATTTATATAATATTAACA
TAATTCATATTACTATATTTTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATG
CCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAAGATTTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATT
AATAGGGACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTTAAAGACAAACTAAT
GCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACC
GTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAA

Figure 47 : Séquence finale d'un cas positif, obtenue après l'analyse de la séquence initiale par des programmes bioinformatiques et déposée dans la base des données génétiques (**GenBank**).

La séquence finale est obtenue après l'analyse de la séquence initiale par des programmes bioinformatiques comme **ClustalX** et **Bio Edit**. Elle représente l'amplification par Nested PCR d'un fragment (longueur = 830bp) du gène codant pour SSU rDNA. La longueur du fragment obtenu après l'analyse est de 765 bp, qui correspondent le nombre des nucléotides. Ensuite, Cette séquence finale est déposée dans une base des données génétiques (**GenBank**) sous un numéro d'accès par lequel elle est reconnue.

4.8.2. Identification des espèces et /ou de génotypes de *Cryptosporidium*

L'analyse des séquences nucléotidiques du gène codant pour SSU rDNA, obtenues à partir des prélèvements positifs, permet l'identification de différents types de

Cryptosporidium ; ***"Cryptosporidium* hedgehog genotype**, ***Cryptosporidium parvum***, ***Cryptosporidium hominis*** et ***Cryptosporidium muris".*** La détermination de ces derniers génotypes et espèces a été réalisée par la comparaison des séquences nucléotidiques obtenues dans notre étude avec des séquences de références déposées dans les bases de données génétiques comme **Genbank**.

Tableau 15: Espèces et génotypes de ***Cryptosporidium*** identifiés.

Animaux	Espèces ou génotypes infectants	Nombre de cas
Chevaux	***Cryptosporidium* hedgehog genotype**	**4**
	Cryptosporidium parvum	**3**
	Cryptosporidium hominis	**1**
	Cryptosporidium muris	**1**
Anes	***Cryptosporidium parvum***	**1**
	Cryptosporidium muris	**1**
Total	**11**	

Les chevaux ont été révélés infectés par 3 espèces différentes et un seul génotype, dont 4 cas (3 juments et un étalon) ont été infectés par le génotype de l'hérisson (***Cryptosporidium* hedgehog genotype**), 3 cas par ***Cryptosporidium parvum*** (un poulain et 2 juments), un cas (poulain) par ***Cryptosporidium hominis*** et un autre cas (poulain) par ***Cryptosporidium muris***.

Chez les ânes, parmi les quatre cas positifs par l'amplification PCR, le séquençage des produits de la PCR secondaire a été obtenu seulement avec succès en deux cas. Ces deux dernies ont été identifiés comme ***C. parvum*** et ***C. muris*** chez deux ânesses.

4.8.2.1. Comparaison entre les séquences obtenues et les séquences de référence

Les séquences d'ADN du gène codant pour SSU rDNA des différentes espèces et génotypes identifiés dans notre étude ont été comparées avec des séquences de référence publiées dans différentes études et déposées dans la base de données génétiques **GenBank** sous des numéros d'accès. Les résultats sont mentionnés dans le **tableau16**.

Tableau 16: Identité des espèces et génotypes isolés chez les équidés infectés.

Animaux	Espèces ou génotypes infectants	Séquence de référence (numéro d'accès)	Origine des isolats de référence	%de similarité
	***Cryptosporidium* hedgehog genotype**	**QG214078, QG214082, QG259137,QG259141**	Hérisson	**99,2-99,8%**
Chevaux	***Cryptosporidium parvum***	**AF093493**	Bovine	**100%**
	Cryptosporidium hominis	**AF093492**	Humaine	**99,44%**
	***Cryptosporidium muris* (souche RN66)**	**EU245045**	rat	**100 %**
Anes	***Cryptosporidium parvum***	**AF093493**	Bovine	**100 %**
	***Cryptosporidium muris* (souche TS03)**	**EU245043**	rat	**100 %**

Les séquences du gène SSU de l'ADNr des cas positifs de ***Cryptosporidium* hedgehog genotype** isolés chez les chevaux ont présenté une similarité comprise entre 99,2-99,87% (figure 48) avec des séquences de référence du même génotype (numéro d'accès en GenBank: **QG214078**, **QG214082**, **QG259137**, **QG259141**), originaire des cas d'infection de l'hérisson. Les isolats identifiés comme ***Cryptosporidium parvum*** et ***Cryptosporidium muris*** ont une identité de 100 % avec les isolats de références **AF093493** et **EU245045** des deux espèces respectivement (figure 49 et 51).

L'isolat de ***Cryptosporidium hominis*** détecté chez un poulain est apparenté au ***Cryptosporidium hominis*** de référence **AF093492** (**similarité de 99,44%**) (figure 50) et au ***Cryptosporidium cuniculus*** de référence **FJ262724** (**similarité de 99,3%**). Le génotypage de cet isolat réalisé par d'autres gènes (COWP, HSP70, TRAP-C1) a permis la confirmation de la présence de ***Cryptosporidium hominis*** chez le poulain infecté.

```
Seq_1  1     ---------GGTGACTCATAATAACTTTACGGATCACATTAAATGTGACATATCATTCAA  51
                      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  1     AATATAATTGGTGACTCATAATAACTTTACGGATCACATTAAATGTGACATATCATTCAA  60

Seq_1  52    GTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGGGTAA  111
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  61    GTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGGGTAA  120

Seq_1  112   CGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGA  171
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  121   CGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGA  180

Seq_1  172   AGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATGCAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACA  231
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  181   AGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATGCAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACA  240

Seq_1  232   ATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTAT  291
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  241   ATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTAT  300

Seq_1  292   CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATAT  351
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  301   CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATAT  360

Seq_1  352   TAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATA  411
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  361   TAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATA  420

Seq_1  412   TTTTAATGAATATTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTATATTTTTTAGTATATG  471
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  421   TTTTAATGAATATTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTATATTTTTTAGTATATG  480

Seq_1  472   AAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGC  531
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  481   AAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGC  540

Seq_1  532   ATGGAATAATATTAAAGATTTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTA  591
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  541   ATGGAATAATATTAAAGATTTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTA  600

Seq_1  592   ATAGGGACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTTA  651
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  601   ATAGGGACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTTA  660

Seq_1  652   AAGACAAACTAATGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTT  711
             ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  661   AAGGCAAACTAATGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTT  720

Seq_1  712   AGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAA------  765
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  721   AGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAG  780

Seq_1  766   --  765

Seq_2  781   AT  782
```

Figure 48 : Alignement entre la séquence de ***Cryptosporidium*** **hedgehog genotype** obtenue dans notre étude (Seq_1) (longueur 765 bp) et une séquence de référence (Seq_2) (longueur 782 bp avec un numéro d'accès en GenBank **QG259141**).

```
Seq_1  1     ------------------------------------------------------------  0
Seq_2  1     AACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCT  60

Seq_1  1     ------------------------------------------------------------  0
Seq_2  61    AAGTATAAACTTTTATACGGTTAAACTGCGAATGGCTCATTATAACAGTTATAGTTTACT  120

Seq_1  1     ------------------------------------------------------------  0
Seq_2  121   TGATAATCTTTACTTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCGAAAAAA  180

Seq_1  1     ------------------------------------------------------------  0
Seq_2  181   CTCGACTTTATGGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAGAACCAATATAATTGGTGACTCAT  240

Seq_1  1     ---------------------------------ATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTT  28
                                               ||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  241   AATAACTTTACGGATCACATTAAATGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTT  300

Seq_1  29    TAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGAT  88
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  301   TAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGAT  360

Seq_1  89    TCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAAT  148
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  361   TCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAAT  420

Seq_1  149   TACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGTTT  208
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  421   TACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGTTT  480

Seq_1  209   TGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTG  268
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  481   TGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTG  540

Seq_1  269   GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAA  328
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  541   GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAA  600

Seq_1  329   AAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATATTTATAT  388
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  601   AAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATATTTATAT  660

Seq_1  389   AATATTAACATAATTCATATTACTATATATTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAAA  448
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  661   AATATTAACATAATTCATATTACTATATATTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAAA  720

Seq_1  449   TTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAAGAT  508
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  721   TTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAAGAT  780

Seq_1  509   TTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCA  568
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  781   TTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCA  840

Seq_1  569   TTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTTAAAGACAAACTAATGCGAAA  628
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  841   TTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTTAAAGACAAACTAATGCGAAA  900

Seq_1  629   GCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCA  688
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  901   GCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCA  960
```

```
Seq_1  689   GATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGC----------------------------  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  961   GATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTTCCTTAC  1020

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1021  TCCTTCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGAGTATGGTCGCAAG  1080

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1081  GCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATT  1140

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1141  TGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGGTCCAGACATAGGAAGGATTGACAGATTGATAGC  1200

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1201  TCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTC  1260

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1261  TGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATAGACATAAGAAATATTATA  1320

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1321  TTTTTTATCTGTCTTCTTAGAGGGACTTTGTATGTTTAATACAGGGAAGTTTTAGGCAAT  1380

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1381  AACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCCGCGCGCGCGCTACACTGATGCATCCA  1440

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1441  TCAAGTATATATTCCTGTTTCGAAGGAAATGGGTAATCTTTTGAATATGCATCGTGATGG  1500

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1501  GGATAGATCATTGCAATTATTGATCTTGAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCATCA  1560

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1561  GCTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGAA  1620

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1621  TGATCCGGTGAATTATTCGGACCATACTTTGTAGCAATACATGTAAGGAAAGTTTCGTAA  1680

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1681  ACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCAGAA  1740

Seq_1  721   ------  720

Seq_2  1741  GGATCA  1746
```

Figure 49 : Alignement entre la séquence de ***Cryptosporidium parvum*** obtenue dans notre étude (Seq_1) (longueur 720 bp) et une séquence de référence (Seq_2) (longueur 1746 bp avec un numéro d'accès en GenBank **AF093493**).

```
Seq_1  1     ------------------------------------------------------------  0

Seq_2  1     AACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCT  60

Seq_1  1     ------------------------------------------------------------  0

Seq_2  61    AAGTATAAACTTTTATACGGTTAAACTGCGAATGGCTCATTATAACAGTTATAGTTTACT  120

Seq_1  1     ------------------------------------------------------------  0

Seq_2  121   TGATAATCTTTTACTTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCGAAAAA  180

Seq_1  1     ------------------------------------------------------------  0

Seq_2  181   ACTCGACTTTATGGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAGAACCAATATAATTGGTGACTCA  240

Seq_1  1     ----------------------------------ATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCT  27
                                                |||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  241   TAATAACTTTACGGATCACAATTAATGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCT  300

Seq_1  28    TTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGA  87
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  301   TTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGA  360

Seq_1  88    TTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAA  147
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  361   TTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAA  420

Seq_1  148   TTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGTT  207
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  421   TTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGTT  480

Seq_1  208   TTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCT  267
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  481   TTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCT  540

Seq_1  268   GGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAA  327
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  541   GGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAA  600

Seq_1  328   AAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATATTTATA  387
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  601   AAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATATTTATA  660

Seq_1  388   TAATATTAACATAATTCATATTACTATTTTTTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAA  447
             |||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  661   TAATATTAACATAATTCATATTACTATTTTTT--AGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAA  718

Seq_1  448   ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAAGA  507
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  719   ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAAGA  778

Seq_1  508   TTTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGC  567
             |||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  779   TTTTTATCTTTTTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGC  838

Seq_1  568   ATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTTAAAGACAAACTAATGCGAA  627
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  839   ATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTTAAAGACAAACTAATGCGAA  898

Seq_1  628   AGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGATCGAAGACGATC  687
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Seq_2  899   AGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATC  958
```

```
Seq_1  688   AGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGC----------------------------  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  959   AGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTTCCTTA  1018

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1019  CTCCTTCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGAGTATGGTCGCAA  1078

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1079  GGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAAT  1138

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1139  TTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGGTCCAGACATAGGAAGGATTGACAGATTGATAG  1198

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1199  CTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGT  1258

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1259  CTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATAGACATAAGAAATATTAT  1318

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1319  ATTTTTTATCTGTCTTCTTAGAGGGACTTTGTATGTTTAATACAGGGAAGTTTTAGGCAA  1378

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1379  TAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCCGCGCGCGCGCTACACTGATGCATCC  1438

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1439  ATCAAGTATATATTCCTGTTTCGAAGGAAATGGGTAATCTTTTGAATATGCATCGTGATG  1498

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1499  GGGATAGATCATTGCAATTATTGATCTTGAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCATC  1558

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1559  AGCTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGA  1618

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1619  ATGATCCGGTGAATTATTCGGACCATACTTTGTAGCAATACATGTAAGGAAAGTTTCGTA  1678

Seq_1  721   ------------------------------------------------------------  720

Seq_2  1679  AACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCAGA  1738

Seq_1  721   -------  720

Seq_2  1739  AGGATCA  1745
```

Figure 50 : Alignement entre la séquence de ***Cryptosporidium hominis*** obtenue dans notre étude (Seq_1) (longueur 720 bp) et une séquence de référence (Seq_2) (longueur 1745 bp avec un numéro d'accès en GenBank **AF093492**).

```
Seq_1  1     ------------------------------------------------------ATC  3
                                                                    |||
Seq_2  1     AACCAATGAGCTTGGTGATTCATAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGCGACATATC  60

Seq_1  4     ATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGAC  63
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  61    ATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGAC  120

Seq_1  64    GGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC  123
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  121   GGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC  180

Seq_1  124   TAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAA  183
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  181   TAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAA  240

Seq_1  184   ATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTAC  243
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  241   ATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTAC  300

Seq_1  244   GAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGC  303
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  301   GAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGC  360

Seq_1  304   GTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATCTATA  363
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  361   GTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATCTATA  420

Seq_1  364   ATATTACTAAGGTATATATTATATTATCAACATCCTTCCTATTATATTTCTAAATATATA  423
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  421   ATATTACTAAGGTATATATTATATTATCAACATCCTTCCTATTATATTTCTAAATATATA  480

Seq_1  424   GGAAACTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCA  483
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  481   GGAAACTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCA  540

Seq_1  484   GCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGG  543
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  541   GCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTTATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGG  600

Seq_1  544   TTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTCGTATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTG  603
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  601   TTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTCGTATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTG  660

Seq_1  604   TTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAA  663
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Seq_2  661   TTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAA  720

Seq_1  664   GTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTAT-CC-----  717
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Seq_2  721   GTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTA  780

Seq_1  718   ------------------  717

Seq_2  781   GAGATTGGAGGTTGTTCCT  799
```

Figure 51 : Alignement entre la séquence de ***Cryptosporidium muris*** obtenue dans notre étude (Seq_1) (longueur 717 bp) et une séquence de référence (Seq_2) (longueur 799 bp avec un numéro d'accès en GenBank **EU245045**).

4.8.2.2. Analyses phylogéniques des séquences obtenues par rapport aux séquences de références.

Les analyses phylogéniques des séquences d'ADN des différents gènes d'amplification ont été obtenues par l'utilisation de logiciel bioinformatique **TREECON.** Pour plus de précision concernant la détermination des espèces ou génotypes infectants, différents arbres phylogéniques de chaque gène ont été construits pour montrer la liaison entre les séquences obtenues dans notre enquête et les séquences de références. Nos isolats de ***Cryptosporidium*** **hedgehog genotype** représentés dans la figure 52 par les numéros (**M1029, M1045, M1046, M1047**) sont étroitement liés aux isolats de référence du même génotype originaire de l'hérisson (numéro d'accès en GenBank : **GQ259140**, **GQ214081**, **GQ214085**).

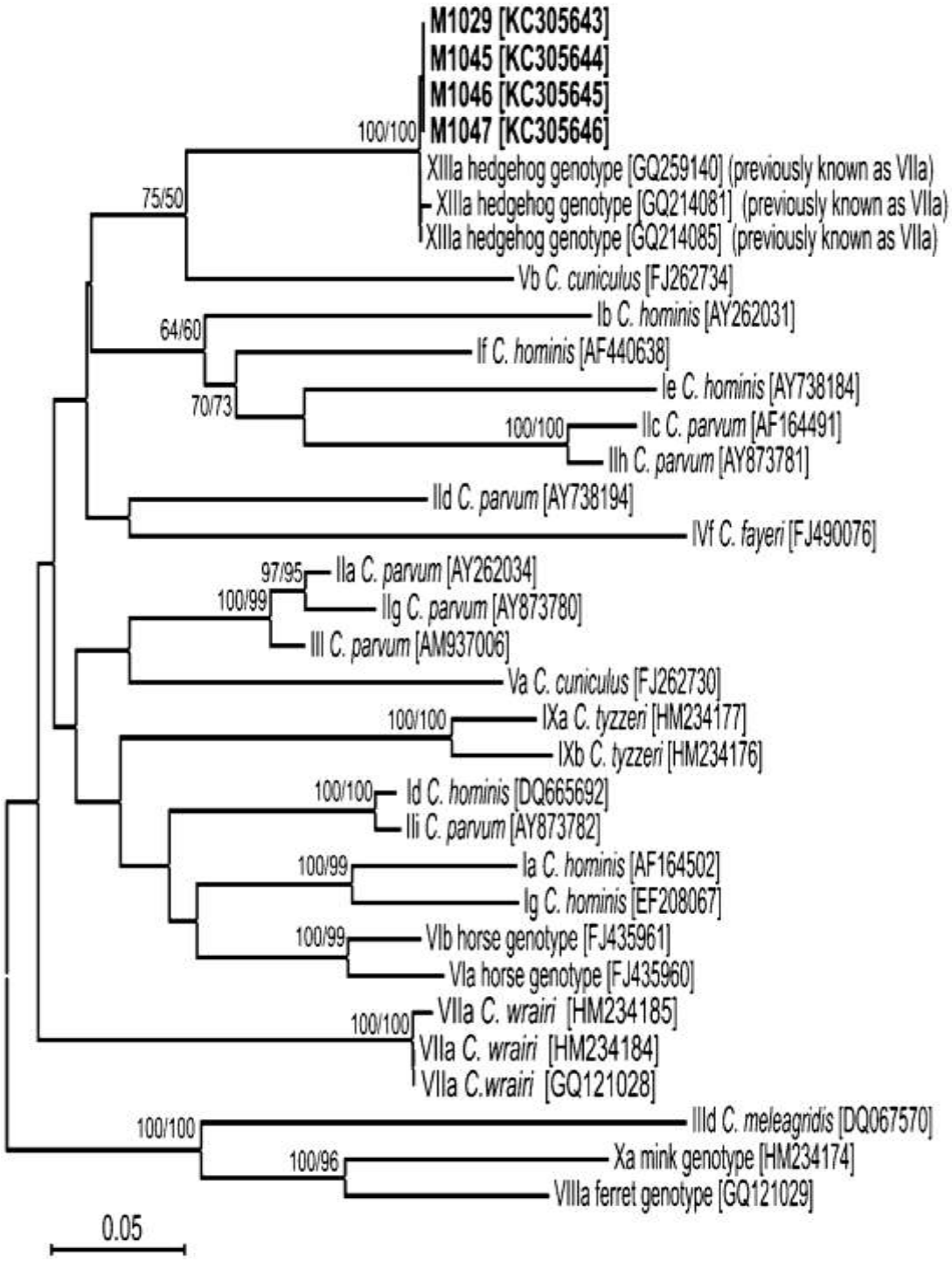


Figure 52: Relations phylogénétiques entre ***Cryptosporidium*** **hedgehog genotype** obtenu dans notre étude (numéros en surbrillance) et autres espèces de ***Cryptosporidium*** (gène Gp 60). L'arbre est construit du maximum de vraisemblance (probabilité = -17,475, 61) avec Kimura modèle à 2 paramètres.

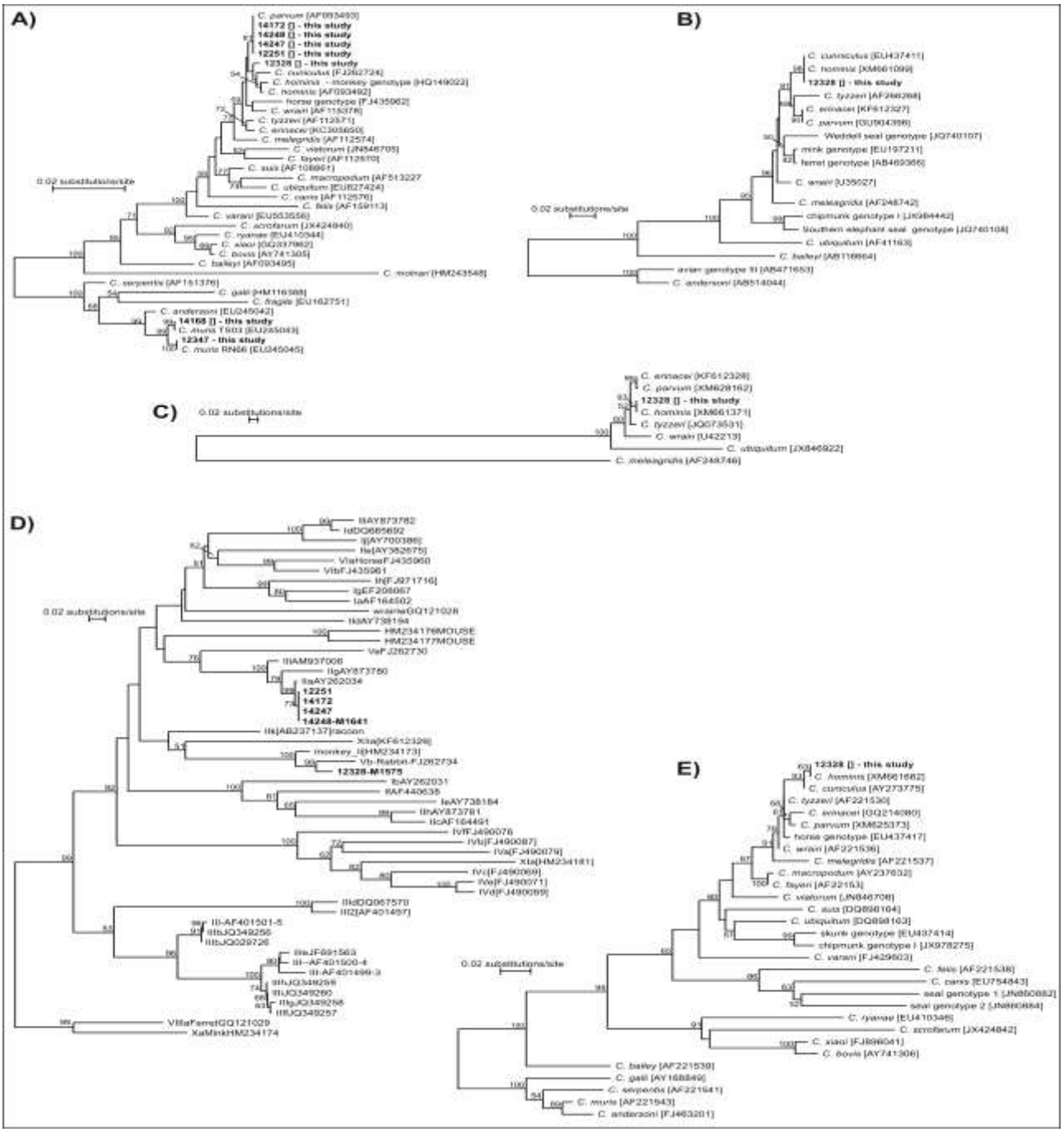


Figure 53 : Arbres phylogéniques (Neighbour-joining) représentant les relations évolutives entre ***Cryptosporidium spp*** et génotypes, y compris ceux détectés dans notre étude (numéros en surbrillance), déduits à partir d'un fragment partiel de gènes **(A)** : **SSU** (743 positions de base dans l'ensemble de données finales), **(B) COWP** (384 positions de base dans l'ensemble de données finales), **(C) TRAP-C1** (523 positions de base dans l'ensemble de données finales), **(D) GP60** (859 positions de base dans l'ensemble de données finales) et **(E) HSP70** (277 positions de base dans l'ensemble de données finales). Kimura modèle à 2 paramètres a été utilisé dans tous les arbres.

Les séquences nucléotidiques des cas positifs, identifiés comme ***Cryptosporidium parvum*** sont représentées dans l'arbre phylogénique (figure 53, **section A et D)** par les numéros **(14172,14247, 14248, 12251).** Ces séquences sont étroitement liées aux séquences de références déposées sous le numéro d'accès **AF093493** pour le gène SSU rDNA et **AY262034** pour le gène GP 60.

L'échantillon **14168** identifié comme ***Cryptosporidium muris*** chez l'âne **(souche TS03)** est étroitement en relation avec l'isolat de référence **EU245043** pour le gène SSU rDNA**.** L'échantillon **12347** identifié comme la **souche RN66** du ***Cryptosporidium muris*** chez le cheval est également très lié à la séquence de référence **EU245045** (figure 53, section A).

L'isolat identifié comme ***Cryptosporidium hominis*** est montré dans la figure 41 sous le numéro **12328** dans tous les arbres phylogéniques. Pour le gène SSU rDNA (section A), cet isolat est étroitement lié au ***Cryptosporidium cuniculus*** (numéro d'accès **FJ262724**) et au ***Cryptosporidium hominis*** (**AF093492**). Pour le gène Gp 60 (section D), cet isolat est lié surtout aux subtypes de ***Cryptosporidium cuniculus*** (**Vb-Rabbit-FJ262734).** Cependant, l'amplification de cet échantillon par d'autres gènes (section B, C, E) a indiqué que cet isolat est étroitement lié au ***Cryptosporidium hominis***.

4.8.3. Détermination des subtypes des espèces et de génotypes de *Cryptosporidium*

L'analyse des séquences nucléotidiques du gène codant pour Gp 60, obtenues à partir des prélèvements positifs en SSU rDNA, permet la détermination des différents subtypes cités dans le **tableau 17**.

Tableau 17: Subtypes des espèces et de génotypes de ***Cryptosporidium*** identifiés.

Animaux	Espèces ou génotypes infectants	Subtypes
Chevaux	***Cryptosporidium* hedgehog genotype** ***Cryptosporidium parvum*** ***Cryptosporidium hominis***	**XIIIa A22R9** **IIa A16G1R1** **IkA15G1**
Anes	***Cryptosporidium parvum***	**IIa A16G1R1**

L'analyse des séquences nucléotidiques du gène Gp60 de ***Cryptosporidium* hedgehog genotype** permet la détermination de la famille **XIIIa**, le nombre de trinucléotides répétés de type **TCA** dans les quatre cas positifs a été 22 (figure 54 en jaune), suivi par 9 répétitions des trinucléotides de type **ACATCA** (figure 54 en rouge). Ceci permet l'identification du subtype **XIIIa A22R9**.

XIIIa A22R9 de ***Cryptosporidium hedgehog*** **genotype**

TAAGGATGTTTCTGTTGAGGGCTCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATC
ATCATCATCATCAACATCAACATCAACATCAACATCAACATCAACATCAACATCAACATCAACATCAACTGCC
GCACCAGCTCAAAATAAGGCAGGAACTACAGAAGGTGAAGGTGAAGGAGAGGAGGTGGAAGGCGGTCAAA
GTTCTAGTGGTACTGAATCTTCTGGCAGCCAGGACAGTGAGGGAAGTGAGGGAAGTGAAGGAAGTGAGGGA
AGTGAAGACGGTGCCCAAGCCACTACTGCTTCCGAATCCACTACAACTCAAGGTAGTGACGCAGCTACCGTTT
CCACAGAAGCTACTCCAAAGAAAGAGTGCGGTACTTCATTTGTTATGTGGTTCGGGGAGGGTGTTCCAGTTGC
AACTTTGAAGTGTGGCGATTATACTATGGTCTATGCACCAGAAAAGGACAAAACAGATCCCGCACCAAGATAT
ATCTCTGGTGAAGTAAAGGATGTATCCTTCCAAAAAGAAGGTGATAGTACAATTAAAATCAAGATCGAAGATA
AGGAGTTCAATTCTCTCTCTACTAACTCAAGCACTCCAACTGAAAATAACGGATCTGCGGGCAAGGTTTCATC
AAGATCAAGAAGATCGCTCTCAGAGGAAACTAGTGAAACTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTCACCCTT
GATGGTGGTAAAAGAATTGAAGTTGCTGTACCAAGAGTCGAAGATGCATCCAAAAGAGACAAGTACAGTTTG
GTTGCAGACAATAAGCCTTTCTATACCGGCACAAACAGCGGCACTACTAATGGTGTCTACAAGTTGAATGAGG
ACGGAGACTGGT

Figure 54: Séquence de subtype **A22R9** appartient à la famille XIIIa de ***Cryptosporidium* hedgehog genotype**.

IIa A16G1R1 de ***Cryptosporidium parvum*.**

GCTCATCATCGTCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCAACATCAACCGTCGCACCAGCA
AATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCTAGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAG
GGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGGCGATGGCCAAACTAGTGCTGCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAA
AGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAAGAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGG
TTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTACACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACC
AAACA

Figure 55: Séquence de subtype **A16G1R1** appartient à la famille IIa de ***Cryptosporidium parvum***.

Les subtypes isolés de l'espèce ***Cryptosporidium parvum*** font partie de la famille **IIa.** Au niveau de la région de répétition des trinucléotides du gène Gp 60, le nombre de répétions **TCA** a été **16** (figure 55 en jaune) avec une seule répétition des trinucléotides de type **TCG** (figure 55 en rouge) et **ACATCA** (figure 55 en bleu).

Ika A15G1 de ***Cryptosporidium hominis*.**

GCTCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCGTCATCATCAACAACAACCGTTGCACCAGCTTCA
AATAAGGCAAGAAATGCAGAGGAAGAAGGAAAGATCGATGAAGGCAGTCAAAGTCCTAGTGATGTTCCTGGA
TCTTCTGACAGTCAAGACACTGAAGAAAGTGAGGACAGTACTCAATCTAGTGCTGCTGCTGATTCCCAAACTT
CTGCTCCAGCTCAAGAATCCGAGAAAACCGAATCCACAGAAACTGCTCCAAAGGAAGAGTGCGGTACTTCAT
TTGTTATGTGGTTTGGAGAGGGTGTTCCAGTTGCAACTTTGAAGTGTGGTGACTATACTATGGTCTATGCACCA
GAAAGTGGCAAAACA

Figure 56: Séquence de subtype **A15G1** appartient à la famille Ika de ***Cryptosporidium hominis***.

Pour l'espèce ***Cryptosporidium hominis***, le nombre de répétions des trinucléotides **TCA** a été **15** (figure 56 en jaune) avec une seule répétition des trinucléotides de type **TCG** (figure 56 en rouge), ce qui identifie un nouvel subtype appartient à la famille **Ik A15G1.**

4.9. Caractérisation moléculaire de *Microsporidia*

Chez les chevaux, parmi 219 échantillons analysés, 19 cas ont été détectés positifs au ***Microsporidia***, dont 15 cas (6,8 %) ont été infectés par ***Entérocytozoon bieneusi*** et 4 cas (1.8%) par ***Encephalitoozon spp***. Chez les ânes, deux cas (1,6 %) ont été positifs, aussi bien pour ***Entérocytozoon bieneusi*** et ***Encephalitoozon spp***. Statistiquement, le taux d'infection par les microsporidies ne varie pas significativement en fonction de l'âge, sexe et le système d'élevage chez les chevaux et même chez les ânes pour les deux premiers facteurs (âge, sexe) (tableau 18).

Chez les chevaux, le taux d'infestation par les microsporidies est plus élevé (8,67 %) en comparaison avec le taux d'isolement des cryptosporidies (2,52 %). Chez les ânes, les deux parasites ont été isolés avec une même prévalence (3,22 %). Contrairement aux cryptosporidies, le type d'élevage n'a pas d'influence sur la variation de la prévalence de l'infection par ***Microsporidia*** dans les différentes fermes étudiées. Comme ***Cryptosporidium***, l'excrétion des microsporidies par les chevaux et les ânes infectés n'a été pas associée avec l'apparition des diarrhées surtout chez les jeunes chevaux. Tous les chevaux infectés par ***Entérocytozoon bieneusi*** et ***Encephalitoozon spp*** ont été négatifs au ***Cryptosporidium*** (absence de coïnfection). Même constatation a été observée chez les ânes, dont l'infestation par les cryptosporidies est absente chez les quatre cas infectés par les deux espèces de ***Microsporidia***.

L'analyse des séquences nucléotidiques obtenues après l'amplification du fragment ITS du gène codant pour rRNA a révélé la présence de l'espèce ***Encephalitoozon cuniculi*** avec trois génotypes distincts: **génotype I (**chez deux chevaux), **génotype II** (chez deux ânes et un cheval) e**t génotype III** (chez un cheval).

Tableau 18 : Variation du taux d'infection par les microsporidies en fonction de l'âge, sexe et le système d'élevage des chevaux et des ânes prélevés.

Animal	Variable	Nombre de prélevements		*Microsporidia*		
				Nombre des cas positifs (%)	O.R.	p-value
Chevaux	**sexe**					
	Mâle	98		8 (8.2)	0.89	0.5024
	Female	121		11 (9.1)		
	Age					
	>3 ans	147		10 (6.8)	0.51	0.1258
	<3 ans	72		9 (12.5)		
	>6 mois	26		2		
	< 6 mois	46		7		
	élevages					
	collectifs	149		12 (8.1)	0.79	0.4036
	Regions rurales	70		7 (10.0)		
Ânes	**sexe**					
	Mâle	11		0 (0.0)	ND	0.6863
	Female	113		4 (3.5)		
	Age					
	>3 ans	114		4 (3.5)	ND	0.6167
	<3 ans	10		0 (0.0)		
	>6 mois	2		0		
	<6 mois	8		0		

ND : non déterminé

P-value: valeur p de signification

Chez les chevaux, l'analyse phylogénique (figure 57) des séquences nucléotidiques obtenues à partir des cas infectés par ***Entérocytozoon bieneusi*** a montré la présence de 8 génotypes, dont 4 sont considérés comme des nouveaux génotypes (**horse 12, 13, 14, 15** dans la figure 57). Aussi, les deux ânes infectés ont été identifiés comme des nouveaux génotypes (numéros **B1250** et **B1203** dans la figure 57).

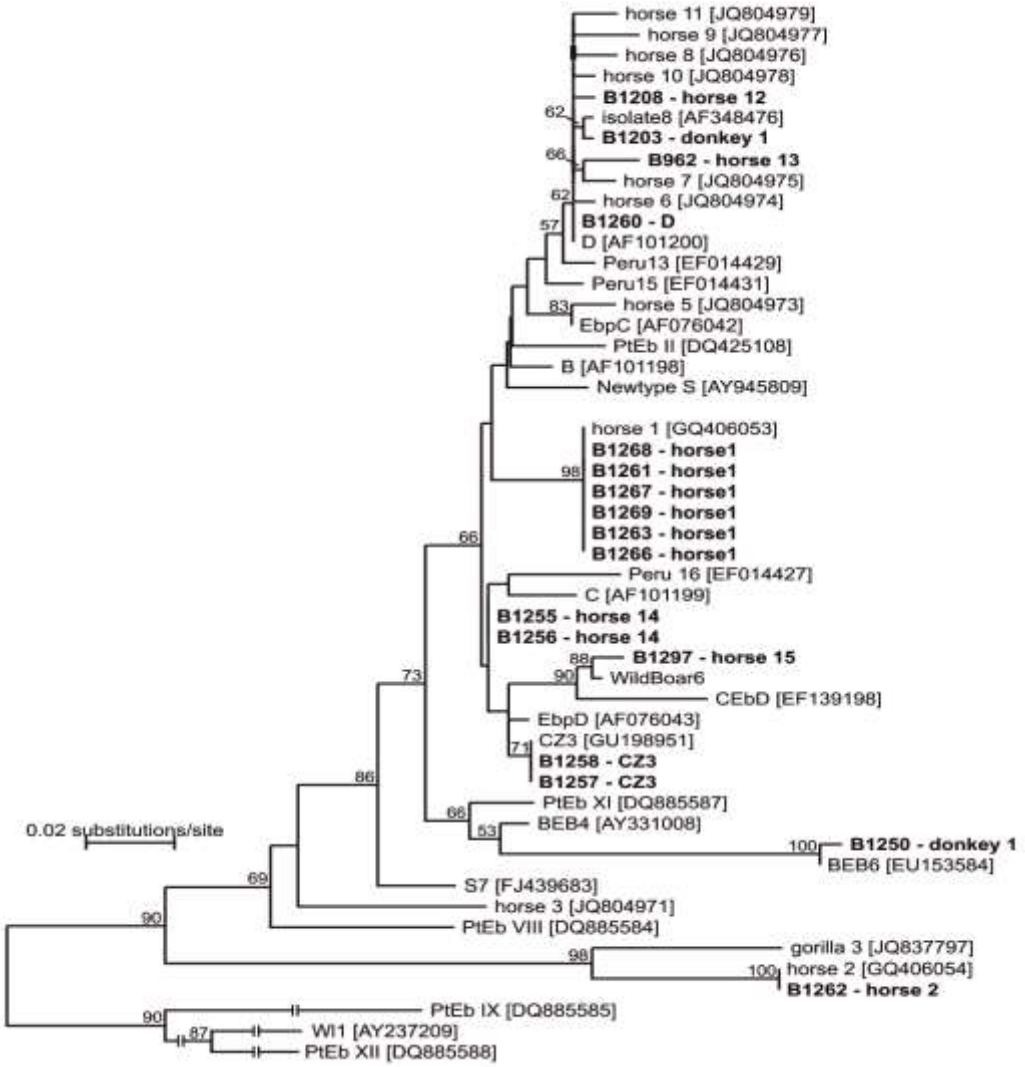


Figure 57: Arbre phylogénique représentant l'évolution des relations entre les génotypes d'***Enterocytozoon bieneusi***, y compris ceux détectés dans notre étude (numéros en surbrillance), déduits de l'ensemble de la région nucléotidique **ITS**.

5. DISCUSSION

5.1. Prévalence globale de *Cryptosporidium spp*

La prévalence globale de ***Cryptosporidium spp*** obtenue chez la population équine est de **6, 02 %** par microscopie et de **2, 70 %** par les techniques de la biologie moléculaire. En raison de la première découverte des cryptosporidies chez l'espèce asine en Algérie avec un taux d'infection de **2,41 %** et **3,22 %** par l'examen microscopique et la PCR nichée respectivement, la discussion de nos résultats est limitée à ceux obtenus chez les chevaux, bien sûr avec des études préalablement publiées. Chez les chevaux, le taux d'infestation a été **7,28 %** par les techniques de coloration et **2,52 %** par l'approche moléculaire. Dans la plupart des rapports publiés sur la cryptosporidiose du cheval, les cryptosporidies ont été mis en évidence par les techniques de coloration et des essaies immunologiques. Certaines études, dans lesquelles ces dernières méthodes ont été utilisées dans la détection de ***Cryptosporidium*** dans les fèces des chevaux, ont rapporté une prévalence très faible en comparaison avec le taux d'infestation obtenu dans notre étude. Au Brésil, De souza et al (2009) ont examiné 396 chevaux par l'utilisation combinée des techniques de concentration et de coloration (bleu de méthylène-safranine), les oocytes ont été révélés seulement chez 3 chevaux avec une prévalence de 0,75%. Un taux d'infestation de 0,33 % (1/300) a été rapporté dans une étude utilisant des méthodes immunologiques, menée en Colorado (USA) par Forde et al (1997). Respectivement, Dans trois différentes régions aux USA (Sierra Nevada, Californie, est de Californie et ouest de Nevada), Atwill et al (2000), Johnson et al (1997) et Bray et al (1997), ont montré l'absence des cryptosporidies dans les fèces analysées par des techniques immunologiques (IFID et IFD), ce qui correspond à une prévalence apparente nulle (0%). Cependant, certaines enquêtes ont déclaré des taux d'infection comparables (proches) à celui obtenu dans notre enquête. En New

York (USA), une étude visant la recherche des cryptosporidies par des méthodes immunologiques chez 349 chevaux, a révélé 16 cas positifs avec une prévalence de 4,6 % (Burton et al., 2010). En grande Bretagne, Sturdee et al (2003) par une étude longitudinale s'étend sur une période de 5 ans et visant la mise en évidence de ***Cryptosporidium spp*** par la technique de concentration formol-éther et la coloration de Ziehl Neelsen modifiée, ont obtenu une prévalence de 8,9% (37/416). En Italie, Veronesi et al (2010) ont révélé un taux d'infestation de 8 % par l'utilisation de l'IFD. Dans une étude menée en Pologne sur 106 chevaux, Majewska et al (1999) ont rapporté par la coloration de Ziehl Neelsen modifiée, une prévalence de 9,4 %. En outre, quelques rapports ont montré une prévalence apparait plus élevée que celle observée dans notre étude. Au Brésil, parmi 90 prélèvements de fèces des chevaux examinés par la coloration de Ziehl Neelsen modifiée, 27 cas ont été trouvés positifs au ***Cryptosporidium*** (un taux d'infection de 27,9 %) (Marques, 2010). Une prévalence de 17 % a été signalée au Canada dans l'étude d'Olson et al (1997), qui ont examiné 35 chevaux par la technique de concentration et l'immunofluorescence directe. En Iraq, Mahdi et Ali (2002) ont observé une prévalence de 12 % (3 cas positifs parmi 25 chevaux examinés) par l'utilisation des techniques d'enrichissement et de coloration. Même constatation a été observée en Louisiana (USA) par le rapport de Coleman et al (1989), dans lequel les oocystes ont été détectés par la technique de flottation avec une prévalence de 14 %. D'autres études ont révélé un taux d'infestation global plus élevé par rapport aux nos résultats (Xiao et Herd, 1994; Cole et al., 1998).

En se basant sur ces différents résultats, la prévalence de la cryptosporidiose chez le cheval présente une variabilité en raison de l'implication de certains facteurs qui peuvent être à l'origine de chiffres très différents, obtenus à travers de plusieurs enquêtes. Notant, des facteurs liés à l'animal particulièrement l'âge des chevaux, d'autres liés à l'échantillonnage, le moment des prélèvements et les techniques de

diagnostic utilisées et même probablement à l'espèce de ***Cryptosporidium*** en cause. L'influence des techniques de mise en évidence des cryptosporidies dans les fèces des chevaux a été observée dans certains rapports, où les techniques immunologiques (IFD) sont plus sensibles que les méthodes usuelles de coloration (Veronesi et al., 2010). Ceci, si on parle de la sensibilité des moyens de diagnostic de ***Cryptosporidium***, bien sur dans la littérature, les techniques de la biologie moléculaire sont plus sensibles que les méthodes immunologiques, qui sont à leur tour plus sensibles que les examens microscopiques de coloration (Jex et al., 2008a). Cependant, dans notre étude, la PCR nichée a détecté chez les chevaux moins de cas positifs (9 cas) par rapport à la coloration de Ziehl Neelsen modifiée (26 cas) (différence significative). Donc, si on parle de terme de spécificité, les techniques de la biologie moléculaire sont également plus spécifiques que les autres méthodes. En plus, étant donner la capacité limitée de la coloration de Ziehl Neelsen en raison de la confusion des oocystes de ***Cryptosporidium*** avec certains éléments comme certaines spores de bactéries et les levures au moment de l'observation microscopique. Les résultats de la prévalence de ***Cryptosporidium spp*** obtenus chez les ânes ont indiqué la sensibilité des techniques moléculaires par rapport aux méthodes de coloration. Dans l'étude de Burton et al (2010), parmi l'ensemble des cas positifs par IFD, 3 cas ont été négatifs par PCR-RFLP. L'auteur a rapporté qu'il s'agit d'une mineure divergence entre les deux techniques et il est difficile de déterminer, si les 3 cas positifs par IFD sont des faux positifs par celle-ci ou ces 3 cas sont des faux négatifs par PCR. Dans notre enquête, la présence des cas positifs par coloration mais négatifs par PCR particulièrement chez les ânes, peut être liée aux défauts de manipulations des techniques moléculaires et même à l'existence éventuelle des inhibiteurs de la réaction PCR dans les fèces analysées.

En tous cas, l'utilisation des approches moléculaires pour estimer la prévalence de la cryptosporidiose chez les équidés représente les moyens les plus fiables.

Etant donner le nombre faible des études concernant l'épidémiologie de la cryptosporidiose du cheval en comparaison avec les différentes et les nombreuses enquêtes réalisées chez les autres espèces animales très particulièrement les ruminants, il est un peu difficile de déterminer l'influence de certains facteurs (âge, statut clinique, type d'élevage) sur les variations de la prévalence, préalablement connus impliqués chez les ruminants. Beaucoup d'investigations sur la cryptosporidiose des équidés sont nécessaires pour bien estimer la prévalence de la maladie et comprendre les facteurs de variation de celle-ci à travers le monde.

5.2. Taux d'infestation par *Cryptosporidium spp* en fonction de l'âge des animaux

Contrairement à ce qui a été documenté sur l'influence du facteur âge dans la variation de la prévalence de la cryptosporidiose chez les ruminants (particulièrement les bovins), où très nombreuses études ont monté la présence des cryptosporidies avec une forte prévalence chez les veaux nouveau-nés âgés moins d'un mois. Chez les équidés, le nombre limité de rapports sur la cryptosporidiose et sur l'implication de certains facteurs (âge, sexe, statut clinique, type d'élevage) dans la variation du taux d'infestation par ***Cryptosporidium spp***, a rendu difficilement une bonne connaissance et une bonne estimation de cette variation particulièrement en fonction de l'âge des chevaux. Chez l'espèce asine, aucune étude n'a été menée sur cette parasitose et la détection d'un cas positif chez un âne âgé moins de 6 mois représente la première mise en évidence des cryptosporidies chez les jeunes animaux de cette espèce équine. Dans notre étude, le taux d'isolement des cryptosporidies chez les jeunes chevaux

(poulains âgés moins de deux ans) ne varie pas significativement avec celui observé chez les adultes, malgré que le taux d'infestation chez les jeunes reste un peu élevé par rapport aux adultes par la coloration de Ziehl et par PCR les résultats sont presque identiques (voir **tableau 12**). Noter aussi, Par l'examen microscopique, les poulains âgés moins de 6 mois sont plus infectés que ceux âgés plus de 6 mois (différence significative), mais les résultats sont presque identiques par PCR.

Par PCR-RFLP, Burton et al (2010) ont isolé les cryptosporidies avec une prévalence de 5,1 % (9/ 175) chez des poulains âgés de 1 à 10 semaines contre 0 % (0/174) chez les juments. Même observation a été signalée par l'utilisation de l'immunofluorescence direct, où les poulains sont plus infectés que les juments (Burton et al., 2010). L'étude de la prévalence de la cryptosporidiose selon l'âge des chevaux a été bien rapporté par Veronesi et al (2010), dont les poulains âgés plus de 8 semaines sont les plus infectés avec un taux d'infection de 23,33 %, suivis par les poulains âgés de 0 à 8 semaines avec un taux de 4,44 % et en fin les juments avec une prévalence de 3,33 %. Cependant l'intensité de l'excrétion parasitaire a été observée chez les poulains âgés de 2 à 4 semaines. Ce ci supporte les résultats de Burton et al (2010), où les poulains sont plus infectés que les adultes. Aux USA, Cole et al (1998) ont effectué une étude portant sur 40 poulains âgés de 1 à 21 jours et sur 366 adultes. L'infection apparaît prédominante chez les poulains (prévalence varie de 1 à 15%) par rapport aux adultes (taux d'infestation varie entre 0 et 10 %). Même constatation a été obtenue dans l'étude de Xiao et Herd (1994), où des poulains non sevrés ont montré un taux d'infection élevé variant entre 15 à 31%, un seul cas positif a été noté parmi 39 poulains sevrés et une prévalence nulle a été observée chez poulains âgés plus d'un an (0/46) et chez des juments (0/71).

Des résultats contradictoires ont été rapportés par Olson et al (1997), dont les chevaux âgés plus de 6 mois sont plus infectés (21 %) par rapport aux poulains âgés moins de 6 mois (10 %). Aussi, dans l'étude de Majewska et al (1999), les adultes apparaissent plus touchés (10 %) que les poulains (0 %), mais le nombre de prélèvements examinés de ces dernies a été très faible (6 poulains) par rapport aux adultes (100 chevaux).

Les autres études concernant la cryptosporidiose du cheval ont été portées uniquement sur des chevaux adultes (Atwill et al., 2000 ; De souza et al., 2009 ; Majewska et al., 2004 ; Mahdi et Ali, 2002; Marques, 2010 ; Sturdee et al., 2003).

Dans la plupart des études, Les cryptosporidies ont été isolés aussi bien chez les poulains et chez les chevaux adultes (juments, étalons). L'implication de l'âge dans la variation de la prévalence de la cryptosporidiose et comme un facteur de risque et même dans l'intensité de l'excrétion parasitaire a été confirmée dans certains rapports où les poulains (période d'âge de 0 à 6 mois) sont plus infectés que les adultes particulièrement les juments (Burton et al., 2010 ; Veronesi et al., 2010). Le taux élevé de l'infestation observé durant cette période reste mal expliqué et peut être lié au système immunitaire immature des poulains. Cependant, Olson et al (1997) ont expliqué le taux d'infestation élevé observé chez les chevaux âgés plus de 6 mois par rapport aux poulains âgés moins de 6 mois par le fait que ces derniers peuvent être protégés par le lait de leurs mère et le risque très faible de contamination par l'eau de boisson.

Plus de rapports détaillés sur la variation de la prévalence selon l'âge des chevaux sont nécessaires pour illustrer cette situation.

5.3. Pathogénécité de *Cryptosporidium spp*

Le pouvoir pathogène des cryptosporidies chez les chevaux particulièrement les poulains est actuellement non clair. Certaines études incluant notre enquête n'ont pas montré une association entre l'excrétion des oocystes de ***Cryptosporidium*** et l'apparition de la diarrhée chez les chevaux infectés (poulain et adultes) (De souza et al., 2009 ; Laatamna et al., 2013, Majewska et al., 1999, 2004; Marques, 2010). La cryptosporidiose clinique a été documentée pour la première fois chez des poulains de race arabe atteints d'un syndrome d'immunodéficience (Snyder et al., 1978) et a été associée systématiquement avec ce syndrome dans diverses études (Mair et al., 1990 ; Bjorneby et al., 1991 ; Perryman et Bjorneby, 1991). Cependant, chez les poulains immunocompétents, l'implication des cryptosporidies dans l'apparition des diarrhées a été révélée dans nombreux rapports.

Certaines études mètrent le point seulement sur la recherche et l'isolement des oocystes de ***Cryptosporidium*** dans les fèces diarrhéiques des poulains nouveau-nés (Perruci et al., 2011, Caffara et al., 2013). D'autres études (Lengronne et al., 1985; Xiao et Herd, 1994; Burton et al., 2010) n'ont pas montré une association significative entre l'occurrence de la diarrhée chez les poulains infectés et l'excrétion parasitaire en raison surtout de l'interaction commune des cryptosporidies avec d'autres agents entéropathogènes (coronavirus, rotavirus, salmonelles, clostridies) dans le déclenchement du syndrome diarrhéique (Coleman et al, 1989 ; Austin et al, 1990 ; Mair et al., 1990 ; Netherwood et al., 1996).

Le rôle des cryptosporidies dans l'apparition des diarrhées chez les poulains a été déterminé par la recherche combinée des oocystes de ***Cryptosporidium*** et d'autres agents entéropathogènes dans les fèces des poulains âgés entre 0 et plus de 8 semaines, ayant présenté des signes diarrhéiques (Veronesi et al., 2010). Dans cette

étude, il a été signalé la seule implication des cryptosporidies dans la diarrhée (absence de l'interaction commune des cryptosporidies avec d'autres agents entéropathogènes), mais l'occurrence de l'infection ne varie pas significativement chez les chevaux diarrhéiques et ceux d'apparence saine. Aussi, le niveau d'excrétion parasitaire a été plus élevé chez les poulains âgés moins de 8 semaines et ayant des troubles diarrhéiques par rapport aux juments et les poulains âgés plus de 8 semaines n'ayant pas des signes diarrhéiques. En Nouvelle Zélande, Grinberg et al (2003, 2008, 2009) ont confirmé le rôle déterminant des cryptosporidies dans l'étiologie des diarrhées néonatales chez les poulains. Des infections expérimentales réalisées chez des poulains nouveau-nés, immunocompétents et dépourvus de colostrum par des isolats de ***Cryptosporidium*** originaires de veaux, n'ont pas montré aucune pathologie gastro-intestinale (absence des troubles diarrhéiques) (Tzipori, 1983). L'infection chez les chevaux adultes (surtout juments et étalons) passe le plus souvent inaperçue et très rares cas diarrhéiques associés à la présence des oocystes de ***Cryptosporidium*** dans les fèces ont été identifiés (Mckenzie et Diffay, 2000; De souza et al., 2009).

A la lumière de ces différentes études et la disponibilité de quelques données moléculaires, il semble probablement que la Pathogénécité de ***Cryptosporidium*** dépend en partie des facteurs génétiques individuels et le statut immunitaire du poulain, d'autre partie de la virulence des espèces ou génotypes et leurs subtypes impliqués (Burton et al., 2010 ; Laatamna et al., 2013). En plus, comme chez les veaux où la cryptosporidiose est considérée comme une coïnfection avec d'autres agents entéropathogènes (rotavirus, salmonelles, Clostridium perfringens), elle peut augmenter la sévérité du dommage gastro-intestinal, l'inflammation et les signes diarrhéiques (Burton et al., 2010).

5.4. Prévalence de *Cryptosporidium spp* en fonction des élevages

D'après nos résultats obtenus particulièrement dans les fermes collectives, les cryptosporidies ont été isolés seulement dans la ferme de Tiaret. Aucun cas positif n'a été observé, soit par microscopie, soit par PCR dans les centres hippiques d'Alger. Des résultats similaires ont été obtenus dans l'étude de Veronesi et al (2010), dans laquelle la prévalence de la maladie estimée dans 5 différentes fermes (variation entre 31,25 % et 0 % avec une différence significative) a été plus élevée dans une seule ferme (31,25 %) par rapport aux autres. Les auteurs ont expliqué leurs résultats par le système de management pratiqué dans les fermes et la complexité du cycle de ***Cryptospridium*** (phénomène d'auto-infection). Même constatation a été rapportée par Majewska et al (1999), qui ont effectué leur enquête dans 4 centres d'équitation, dont la prévalence des cryptosporidies a été plus élevée dans deux centres. Les auteurs ont signalé l'association de la cryptosporidiose équine avec des élevages particuliers, mais ils n'ont pas donné des explications. Cette dernière observation a été supportée par Cole et al (1998), où l'infection apparait en relation avec des fermes particulières. Parmi 14 fermes récoltées, Burton et al (2010), ont isolé les cas positifs dans un seul élevage et ont suggéré que la survenue de la cryptosporidiose chez les chevaux peut être liée à des élevages particuliers.

Des résultats contradictoires ont été obtenus par De souza et al (2009), qui ont rapporté que le taux d'infestation par les cryptosporidies ne varie pas en fonction des différents élevages étudiés. Dans cette dernière étude, il a été suggéré que l'occurrence de l'infection est surtout à liée à d'autres facteurs comme l'état de mal nutrition et les mauvaises conditions de certains chevaux.

Le système d'élevage pratiqué dans la jumentrie de Tiaret (contact des poulains avec leurs mères durant la période d'allaitement, boxes groupant les poulains deux à deux

durant le sevrage, mode de pâturage) peut être à l'origine de l'occurrence de ***Cryptosporidium spp*** dans cette ferme par rapport aux autres centres hippiques, qui adaptent un système d'élevage différent. Même, on peut supposer le rôle des conditions hygiéniques et le faible entretien des chevaux dans la ferme de Tiaret par rapport aux fermes de Kharouba dans la survenue de l'infection dans cette jumentrie.

Contrairement à la cryptosporidiose bovine où l'influence du type d'élevage sur la prévalence de la maladie a été bien documentée, beaucoup d'enquêtes sur différents systèmes d'élevages des chevaux sont nécessaires pour montrer l'association entre ce facteur et la cryptosporidiose équine.

5.5. Prévalence de *Cryptosporidium spp* en fonction du sexe

Dans notre étude, le sexe n'apparait pas comme un facteur influençant sur le taux d'infestation par ***Cryptosporidium spp.*** Même constatation a été observée aux USA par Burton et al (2010). De souza et al (2009), ont indiqué que les mâles sont plus infectés par rapport aux femelles (statistiquement avec une différence significative), mais ils ont rendu cette différence à l'implication d'autres facteurs comme l'échantillonnage et les conditions hygiéniques (entretient) et sanitaires des chevaux. La plupart des autres enquêtes n'ont pas inclus le rôle du facteur sexe des chevaux dans la variation de la prévalence des cryptosporidies.

5.6. Caractérisations moléculaires de *Cryptosporidium spp*

5.6.1. Espèces et génotypes infectants

Peu d'informations et de données moléculaires sont actuellement disponibles sur les espèces ou génotypes infectant les équidés et leur risque zoonotique. Incluant les

résultats obtenus dans cette enquête, plus de 30 études réalisées dans différents pays sur la cryptosporidiose équine, seulement 9 parmi elles ont été supportées par des données moléculaires. Certains rapports ont permis la caractérisation moléculaire d'un nombre important de cas positifs au ***Cryptosporidium spp*** et d'autres se sont limité sur un ou quelques cas de chevaux infectés. La première caractérisation moléculaire des cryptosporidies isolés dans les fèces des équidés a été décrite en République tchèque chez deux poulains sauvages (**Prezewalski's wild horse foal**), vivant dans un parc zoologique (Ryan et al., 2003b). Le premier poulain âgé de 12 jours a été infecté par ***Cryptosporidium parvum***. L'identification moléculaire a été réalisée par l'amplification des deux gènes codant pour **SSU rDNA et HSP70.** La séquence d'ADN (**HSP70**) obtenue de cet isolat a présenté une Similarité prés de 100 % avec une séquence de référence d'un isolat de ***Cryptosporidium parvum*** d'origine bovine. L'analyse moléculaire effectuée aussi par l'amplification des deux gènes précédents chez le deuxième poulain âgé de 161 jours, a identifié un nouveau génotype nommé **horse genotype**. Ce dernier a été considéré comme un génotype spécifique aux chevaux. La nouvelle séquence obtenue est apparentée à celle de **C. wrairi** (similarité de 98.7% pour **SSU** et 99 % pour **HSP70)** et ***C. parvum*** **mouse genotype** (99,7 % pour **SSU** et 97, 7 % pour **HSP70**). Les séquences nucléotidiques de ce génotype équin sont déposées dans la base des données génétiques sous le numéro d'accès (**AY273770** pour **SSU** et **AY 273774** pour **HSP70**) (Ryan et al., 2003b).

Durant notre enquête, la caractérisation moléculaire des cas positifs a montré une diversité génétique, dont 3 espèces et un génotype ont été détectés. Nos résultats obtenus chez l'espèce asine représentent le premier rapport de l'occurrence de ce protozoaire chez cet animal et la première description moléculaire des cryptosporidies isolés. Les isolats identifiés comme ***Cryptosporidium parvum*** ayant une identité de 100% avec l'isolat de référence obtenu par Xiao et al (1999b) et déposé sous le

numéro d'accès **(AF093493).** La séquence d'ADN révélée chez le poulain infecté par ***Cryptosporidium hominis*** est étroitement liée à la séquence de référence de ***Cryptosporidium hominis*** **AF093492 (**similarité de 99.44%**)** et de ***C. cuniculis*** **FJ262724 (**similarité de 99.3%**).** L'amplification de cet échantillon par d'autres gènes (COWP, HSP70, TRAP-C1) permet la confirmation de la présence de ***Cryptosporidium hominis***. Les cas positifs au ***Cryptosporidium muris*** ont présenté aussi une similarité de 100% avec les séquences de référence **(EU245043, EU245045)**. La détection de 4 sujets infectés par un génotype inhabituelle (**hedgehog genotype ou génotype de l'hérisson**) a été réalisée par l'observation d'une similarité élevée au niveau des séquences nucléotidiques du gène SSU (99,2-99,8%) avec des isolats de ***Cryptosporidium*** originaire de l'hérisson, qui disposent des informations génétiques sous le numéro d'accès (**QG214078, QG214082, QG259137, QG259141**) (Dyachenko et al., 2010). Très récemment, grâce aux études morphologiques et biologiques détaillées, supportées par des donnés moléculaires, ce génotype **(hedgehog genotype**) a été rédécrit comme une nouvelle espèce nommée ***Cryptosporidium erinacei*** (Kvac et al., 2014b).

Dans une étude effectuée en République tchèque chez plusieurs espèces animales, Hajdušek et al (2004) ont isolé par caractérisation moléculaire des deux gènes codant pour SSU rDNA et COWP, l'espèce ***Cryptosporidium parvum*** (bovine génotype) chez 3 chevaux infectés (***Equus caballus)***. L'analyse phylogénique des séquences obtenues dans ce rapport a monté une similarité élevée avec les séquences de références de ***Cryptosporidium parvum*** **AF093490** pour le gène SSU et **AF266273** pour le gène COWP. Dans le centre de l'Italie, le génotypage par l'amplification du gène COWP des cryptosporidies isolés chez 11 poulains et une jument, a révélé la présence de ***Cryptosporidium parvum***. Les isolats obtenus dans cette étude ne disposent pas d'informations génétiques (Veronesi et al., 2010). Respectivement, deux

poulains âgés moins de 8 semaines en grande Bretagne et un poulain diarrhéique âgé de 9 jours en Allemagne, ont été infectés par ***Cryptosporidium parvum*** (Chalmers et al, 2005b ; Imhasly et al., 2009). Par l'analyse moléculaire du gène SSU rDNA et même du gène **HSP70**, Grinberg et al (2003, 2008, 2009) ont identifié ***Cryptosporidium parvum*** comme espèce infectante chez des poulains nouveau-nés atteints de troubles diarrhéiques. Les séquences nucléotidiques des isolats obtenus sont indifférenciables de la séquence de référence pour ***Cryptosporidium parvum***, déposée sous le numéro d'accès **AF093490**.

Depuis l'année 2003, l'identification du génotype considéré comme spécifique aux chevaux **(horse genotype**) n'a été rapportée que récemment dans deux différentes études. Burton et al (2010) par l'analyse RFLP et le séquençage du gène SSU rDNA, ont obtenu chez 9 poulains infectés, âgés de 1 à 10 semaines des isolats identiques (**horse genotype**) à ceux obtenus en République tchèque par Ryan et al (2003b) (numéro d'accès FJ435963). Récemment en Italie, ***Cryptosporidium parvum*** et **horse genotype** ont été détectés chez 3 et 11 poulains respectivement (Caffara et al., 2013). Les séquences nucléotidiques appartiennent au **horse genotype (KC559776, KC559777)** ayant présenté une identité élevée avec l'isolat obtenu en République tchèque (Caffara et al., 2013).

Aussi, le génotype du cheval (**horse genotype**) a été isolé chez le veau dans l'Irlande du nord (Thompson et al., 2007) et dans les eaux usées en chine (Feng et al., 2009). Les séquences d'ADN obtenues sont déposées sous le numéro d'accès (**FJ435964/18S, DQ648547/Gp60**) pour le veau et **(FJ153238)** pour l'eau usée.

Le nombre limité des études moléculaires ne permet pas une bonne connaissance de l'épidémiologie des espèces ou génotypes de ***Cryptosporidium*** infectant les équidés. Cependant, ***Cryptosporidium parvum*** représente la plus importante espèce, identifiée

chez le cheval, contrairement à l'infection par **horse genotype,** qui reste mal connue. L'identification de ***Cryptosporidium hominis***, ***Cryptosporidium muris*** et **hedgehog genotype (*C. erinacei*)** pour la première fois en Algérie, indique que la spécificité d'hôte des cryptosporidies chez le cheval est plus large que celle déjà pensée par les chercheures, mais plus d'enquêtes utilisant les outils moléculaires sont nécessaires pour supporter ces résultats, pour bien comprendre cette spécificité d'hôte et l'épidémiologie de la cryptosporidiose des équidés.

5.6.2. Détermination des subtypes des espèces et génotypes infectants

Actuellement, l'identification des subtypes réalisée par l'amplification et le séquençage du gène codant pour GP60 est connue seulement chez 9 espèces et 4 génotypes de ***Cryptospridium*** (voire partie bibliographique). La terminologie initiale pour designer ces différents subtypes a été développée par Sulaiman et al (2005) et actualisée aujourd'hui par plusieurs chercheurs. Les subtypes de ***Cryptosporidium parvum, Cryptosporidium hominis,*** **horse genotype** et **hedgehog genotype** (***Cryptosporidium erinacei***) sont désignés par les numéros romains **II, I, VI, XIII** respectivement. Initialement, la terminologie des subtypes de ***Cryptosporidium*** **hedgehog genotype** a été connue sous le numéro romain **VII (**Dyachenko et al., 2010**).** Cependant, Lv et al (2009) ont utilisé le même numéro pour nommer les subtypes de ***Cryptosporidium wrairi***. A cet effet, il n'est pas clair quelle publication prend la priorité et il a été rapporté de continuer l'utilisation du numéro **VII** pour les subtypes de l'espèce ***Cryptosporidium wrairi*** et d'introduire une nouvelle désignation **XIII** pour les subtypes de ***Cryptosporidium*** **hedgehog genotype** (***Cryptosporidium erinacei***) (Laatamna et al., 2013)**.**

Parmi les 9 études moléculaires de génotypage de ***Cryptosporidium spp***. chez les chevaux, seulement 5 rapports ont déterminé les subtypes des espèces et génotypes détectés chez les animaux infectés. Au cours de notre enquête, nous avons isolé le subtype **IIaA16G1R1** de ***Cryptosporidium parvum***, **IkA15G1** de ***Cryptosporidium hominis*** et **XIIIaA22R9** de ***Cryptosporidium* hedgehog genotype**.

Le subtype **IIaA16G1R1** de ***Cryptosporidium parvum*** a été détecté chez les bovins dans différents pays à travers plusieurs études moléculaires incluant Canada, Slovénie, Serbie, Hongrie, Allemagne, pays bas, République tchèque et l'Argentine (Trotz-williams et al., 2006 ; Soba et Logar, 2008 ; Misic et Abe, 2007; Plutzer et Karanis, 2007; Broglia et al., 2008; Wielinga et al., 2008 ; Kvac et al., 2011; Ondrackova et al., 2009; Del Coco et al., 2014). Chez l'homme, ce subtype a été aussi révélé dans certains pays incluant l'USA, Slovénie et l'Inde (Feltus et al., 2006 ; Soba et Logar, 2008 ; Gatei et al., 2007). A cet effet, l'espèce bovine peut constituer une source potentielle de ce subtype pour la contamination des chevaux et des ânes vivant dans les zones rurales étudiées, qui peuvent représenter à leur tour un risque zoonotique important pour l'homme.

Grinberg et al (2008) ont identifié le subtype **IIaA18G3R1** de ***Cryptosporidium parvum*** dans les fèces de poulains, des bovins et des cas humains. Chez l'homme**,** **IIaA18G3R1** a été détecté dans plusieurs rapports moléculaires (Waldron et al., 2009,2011 ; Ng et al., 2010 ; O'Brien et al., 2008 ; Jex et al., 2008b, 2007; Zintl et al., 2009 ; Chalmers et al., 2005a). Ce dernier subtype a été aussi isolé fréquemment chez les bovins dans différents pays (Canada, Irlande du nord, Espagne, pays bas et l'Australie) (Trotz-williams et al., 2006 ; Thompson et al., 2007 ; Quilez et al., 2008b ; Wielinga et al., 2008; Ng et al., 2008, 2010; waldron et al., 2011).

Concernant la détection du **horse genotype** chez les chevaux**,** Ryan et al (2003b), ont obtenu le subtype **VIaA11G3,** Burton et al (2010) ont déterminé le subtype **VIaA14G2** et Caffara et al (2013) ont révélé le subtype **VIaA15G4**. Ce dernier subtype a été isolé chez le veau dans l'Irlande du nord (Thompson et al., 2007)**.** L'isolement du **horse genotype** a été signalé chez deux cas humais, l'un en USA et l'autre en grande Bretagne, dont les deux cas ont été identifiés comme **VIbA13** (Xiao et al., 2009 **;** Robinson et al., 2008).

IkA15G1 représente un nouveau subtype de ***Cryptosporidium hominis***, qui n'a été jamais détecté chez les équidés. Aussi, la présence ou l'absence de ce subtype chez l'homme et même chez les autres animaux (ruminants) reste inconnue. Etant donner dans la littérature l'isolement de ***Cryptosporidium hominis*** chez certains animaux comme les petits ruminants et les bovins, on suggère la probabilité que ces dernies animaux et même l'homme sont à l'origine de ce subtype (sources et transmission indirectes).Cependant, on exclue la probabilité de contamination direct par les bovins et les ovins en raison que le poulain infecté par ce subtype vit à l'intérieure de la ferme de Tiaret, qui ne comporte pas ces animaux.

Même constatation pour le subtype **XIIIaA22R9** de ***Cryptosporidium*** **hedgehog genotype** (***C. erinacei***) qui n'a été jamais identifié chez le cheval et même chez d'autres hôtes. Cependant, en Allemagne, Dyachenko et al (2010) ont isolé chez l'hérisson d'autres subtypes comme **XIIIaA22R11, XIIIaA23R11** et **XIIIaA21R11** et en République tchèque, très récemment, Kvac et al (2014a) ont isolé le subtype **XIIIaA20R10** chez l'homme, qui n'a été jamais identifié chez un autre hôte**.** L'observation de l'hérisson dans les boxes de sevrage dans la jumentrie de Tiaret permet de suggérer la probabilité de contamination des chevaux par la nourriture

souillée par les fèces de cet animal. Cependant, la contamination aux lieux de pâturage est aussi possible.

5.6. 3. Risque zoonotique

Le rôle zoonotique des équidés dans la transmission de la cryptosporidiose chez l'homme est mal connu. Etant donner dans la littérature (voir Xiao, 2010 et Xiao et feng, 2008) l'implication de ***Cryptosporidium parvum*** dans la plupart des cas d'infection humaine à travers le monde, l'isolement de cette espèce dans notre étude et dans divers rapports (Grinberg et al., 2008 ; Chalmers et al., 2005b ; Veronezi et al., 2010 ; Caffara et al., 2013) permet de considérer les chevaux comme un réservoir potentiel de ***Cryptosporidium*** pour l'homme et ces animaux peuvent contribuer à la contamination environnementale par ces cryptosporidies zoonotiques.

Le risque zoonotique du ***Cryptosporidium*** **hedgehog genotype (*Cryptosporidium erinacei*)** qui n'a été isolé que chez l'hérisson et le cheval est très mal connu (Laatamna et al., 2013). Un seul rapport concernant l'infection par cette nouvelle espèce chez un homme immunocompétent atteint de diarrhée a été publié très récemment en Réplique tchèque (Kvac et al., 2014a). Concernant l'historique de ce cas diarrhéique, cet homme n'a pas entré en contact avec des chevaux ou des hérissons. A cet effet, les auteurs ont rapporté que la source d'infection est inconnue. Néanmoins, l'occurrence de cette nouvelle espèce chez l'hérisson, les chevaux et l'homme indique une spécificité d'hôte plus large que celle déjà pensée. L'intensité de l'infection, les signes cliniques et la consistance des fèces sont similaires à ceux observés dans certains cas de cryptosporidiose humaine causée par ***Cryptosporidium parvum***. De plus, l'identification de l'infection chez une personne immunocompétente souligne le potentiel zoonotique de ***Cryptosporidium*** **hedgehog**

genotype (*Cryptosporidium erinacei*). Bien que, il est probablement que cette espèce peut être transmis indirectement via l'alimentation ou l'eau contaminée, mais pas d'évidence de supporter cette voie de transmission (Kvac et al., 2014a).

Cryptosporidium muris a été détecté occasionnellement chez nombreux sujets sidéens (risque zoonotique mineur) (Palmer et al., 2003 ; Slapeta, 2013). L'isolement de cette espèce chez les équidés apparait limité à notre enquête et reste carrément insuffisant pour considérer les chevaux comme un réservoir de cette espèce zoonotique.

Cryptosporidium hominis représente l'espèce spécifique pour l'homme et comme ***Cryptosporidium parvum***, considérée parmi les espèces les plus impliquées dans les cas humains (Xiao et Feng, 2008). Il semble que l'isolement de cette espèce chez les chevaux (un seul cas avec détermination d'un nouveau subtype) est occasionnel et beaucoup d'études moléculaires sont nécessaires pour la connaissance de l'épidémiologie et l'évaluation de la prévalence réelle de ***Cryptosporidium hominis*** chez les équidés.

Le génotype du cheval (**horse genotype**) a été impliqué dans l'infection humaine chez deux cas en USA (New Mexico) et grande Bretagne. Le premier cas est une fille caucasienne âgée de 18 ans, ayant présenté des diarrhées pendant 14 jours, associées avec d'autres symptômes (fièvre, anorexie, nausées,……). La recherche des cryptosporidies dans les selles diarrhéiques par les techniques moléculaires met en évidence ***Cryptosporidium*** **horse genotype.** Cette personne travaille comme un soignant dans une ferme des petits animaux domestiques (chattons, chiots, lapins, hérisson, amphibiens, oiseaux, reptiles). Parmi ces animaux, certains ont montré des signes diarrhéiques comme des chiots, lapins et des hérissons. La patiente n'a pas voyagé, n'a pas entré en contact avec des personnes infectées par les cryptosporidies

et n'a pas visité ou travaillé dans d'autres fermes. La source de ***Cryptosporidium* horse genotype** n'est pas claire**,** mais les résultats de l'enquête épidémiologique traditionnelle indiquent une source d'origine animale. En raison que la patiente vit en contact avec plusieurs espèces animales et n'a pas entré en contact avec des chevaux, la détermination de l'espèce animale impliquée dans la transmission zoonotique est impossible (Xiao et al., 2009).

Le deuxième cas ayant aussi présenté des troubles diarrhéiques, a été révélé chez une femme immunocompétente âgée de 30 ans, vivant dans une région rurale située dans le Nord-Ouest de la grande Bretagne. Cette femme a pratiqué la natation, a effectué un voyage a l'étranger, dont la destination est inconnue et n'a pas entré en contact avec des animaux pendant la période d'incubation (Robinson et al., 2008).

Selon ces deux rapports, le **génotype du cheval** peut présenter un risque zoonotique important pour la santé publique dans les régions où il est prévalent chez les animaux et quand l'environnement favorise son transport et sa dispersion (Burton et al., 2010).

5.7. Comparaison entre *Cryptosporidium* et *Microsporidia*

La recherche des cryptosporidies par les techniques de coloration reste facile par rapport aux microsporidies qui sont difficiles à mettre en évidence par l'examen microscopique. A cet effet, l'application de la PCR est plus utile pour la détection de ces microorganismes et pour bien estimer leur prévalence.

Chez les chevaux, le taux d'infestation par les microsporidies est plus élevé (8,67 %) en comparaison avec le taux d'isolement des cryptosporidies (2,52 %). Chez les ânes, les deux parasites ont été isolés avec une même prévalence (4 cas positifs parmi 124 ânes examinés). Comme les cryptosporidies, l'âge et le sexe des animaux

n'apparaissent pas comme des facteurs influençant sur la variation du taux d'infection par les microsporidies. Cependant, contrairement aux cryptosporidies, le type d'élevage n'a aucune influence sur la variation de la prévalence de l'infection par les microsporidies dans les différentes fermes étudiées. Comme les cryptosporidies, aucun animal infecté par ***Entérocytozoon bieneusi*** ou ***Encephalitoozon spp*** n'ayant présenté des signes diarrhéiques au moment de la récolte des fèces.

Les rapports moléculaires documentés sur les microsporidies des chevaux restent faibles par rapport aux études moléculaires sur les cryptosporidies. Chez les ânes, la caractérisation moléculaire des microsporidies représente la première étude chez cette espèce animale.

CONCLUSION

A la lumière de ce travail, nous constatons que la cryptosporidiose des équidés est une protozoose présentant une prévalence globale assez considérable chez la population équine étudiée. Le taux d'infestation par ***Cryptosporidium spp***. obtenu chez les chevaux est aussi bien faible, comme il est élevé en comparaison avec d'autres résultats de nombreuses enquêtes menées dans différents pays. L'isolement du parasite chez les ânes dans lés régions rurales représente le premier rapport de l'infestation de cette espèce animale par les cryptosporidies.

L'utilisation des techniques de la biologie moléculaire dans la recherche des cryptosporidies chez les équidés représente des moyens fiables par rapport aux méthodes usuelles de coloration pour une bonne estimation de la prévalence de cette maladie parasitaire.

Les différents résultats de la prévalence de la cryptosporidiose du cheval, obtenus dans notre enquête et dans plusieurs études reflètent l'influence de certains facteurs particulièrement l'âge des chevaux et même le type d'élevage. Dans la plupart des études menées sur cette parasitose, le taux d'infestation le plus élevé est observé chez les poulains âgés moins de 6 mois. Cependant, comme chez les ruminants surtout les bovins, beaucoup d'études sont nécessaires pour arriver à comprendre l'influence de ces facteurs (âge, type d'élevage, statut clinique) sur la variation du taux d'infestation par ***Cryptosporidium spp***.

Contrairement à notre étude où le développement de ***Cryptosporidium spp***. chez les chevaux particulièrement les poulains n'a été pas associé avec des diarrhées, l'implication de ce protozoaire en association ou non avec d'autres agents entéro-pathogènes dans le déclenchement des diarrhées néonatales est déterminée.

Au cours de notre étude, l'identification moléculaire de quatre espèces infectant les chevaux (***Cryptosporidium parvum***, ***Cryptosporidium hominis***, ***Cryptosporidium muris*** et ***Cryptosporidium erinacei***) laisse actuellement la spécificité d'hôte de ***Cryptosporidium spp*** chez le cheval mal connue. Bien que, ***Cryptosporidium*** **horse genotype** a été initialement considéré comme un génotype spécifique pour les chevaux. De plus, la plupart des études moléculaires ont révélé la susceptibilité du cheval au ***Cryptosporidium parvum.*** L'infection des ânes par ***Cryptosporidium parvum*** et ***Cryptosporidium muris*** représente la première caractérisation moléculaire des cryptosporidies isolés chez cette espèce équine en Algérie.

La susceptibilité du cheval au ***Cryptosporidium parvum*** et ***Cryptosporidium*** **horse genotype**, préalablement rapportés chez certains cas humains laisse considérer les équidés comme un réservoir zoonotique pour l'homme. L'infection du cheval par ***Cryptosporidium hominis*** avec la détermination d'un nouveau subtype posera probablement la question du caractère anthropo-zoonotique de cette dernière espèce chez les équidés. Le rôle des équidés dans la dissémination des deux espèces zoonotiques incluant ***Cryptosporidium erinacei*** et ***Cryptosporidium muris*** reste limité à notre enquête et beaucoup d'investigations épidémiologiques supportées par des données moléculaires sont nécessaires pour illustrer cette situation.

Des futures études épidémiologiques associées à l'utilisation des techniques avancées de la biologie moléculaire sont nécessaires pour bien comprendre l'épidémiologie de la cryptosporidiose équine incluant la prévalence et l'influence des facteurs de risque (âge, type d'élevage et conditions hygiénique, statut clinique) sur les variations de cette prévalence, la susceptibilité des équidés aux espèces de ***Cryptosporidium*** et les variations génétiques intraspécifiques, le potentiel (risque) zoonotique des équidés et leur rôle dans la contamination environnementale par des cryptosporidies pathogènes pour l'homme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Abe, N., Makino, I., 2010**. Multilocus genotyping of ***Cryptosporidium*** isolates from cockatiels. Jpn. Parasitol. Res. 106, 1491–1497.
- **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. Diseases of Aquatic Organisms. 62, 133–145.
- **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. International Journal of Parasitology. 32, 1007–1021.
- **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, 2744–2747.
- **Amer, S., Zidan, S., Adamu, H., Ye, J., Roellig, D., Xiao, L., Feng, Y., 2013.** Prevalence and characterization of ***Cryptosporidium spp***. in dairy cattle in Nile River delta provinces, Egypt. Experimental Parasitology. 135, 518–523.
- **Argenzio, R.A., Laicos, J.A., Levy, M.L., Meuten, D.J., Lecce, J.G., Powell, D.W., 1990.** Villous atrophy, crypt hyperplasia, cellular infiltration and impaired glucose-Na absorption in enteric cryptosporidiosis of pigs. Gastroenterology. **Cited in: Chalmers, R.M., Davies A. P., 2010**. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. Experimental Parasitology. 124,138–146.

- **Atwill, E.R., McDonald, N.K., Perea, L., 2000**. Cross-sectional study of faecal shedding of Giardia duodenalis and ***Cryptosporidium parvum*** among packstock in the Sierra Nevada Range. Equine Vet. J. 32, 247–252.
- **Austin, S.M., DiPietro, J.A., Foreman, J.H., 1990. *Cryptosporidium sp***.: A cause of diarrhoea in immunocompetent foals. Vet. Clin. North Am. Equine Practice. 12, 10–14.
- **Ballweber, L.R., Panuska, C., Huston, C.L., Vasilopulos, R., Pharr, G.T. Mackin, A., 2009**. Prevalence of and risk factors associated with shedding of ***Cryptosporidium felis*** in domestic cats of Mississippi and Alabama. Vet. Parasitol. 160, 306–310.
- **Barker, I.K., PL. Carbonell. 1974. *Cryptosporidium agni sp. n.*** from lambs and ***Cryptosporidium bovis sp. n.*** from a calf, with observations on the oocyst. Z Parasitenkd. 44, 289–298.
- **Barta, J. R., Thompson, R.C. A., 2006.** What is Cryptosporidium? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. Trends in Parasitology. 22 (10), 463– 468.
- **Bergeland, M.E., 1977**. Necrotic enteritis in nursing piglets. Am Assoc. Vet. Lab. Diagn. 20, 151–158.
- **Bird, R.G., 1981.** Protozoa and viruses. Human cryptosporidiosis and concomitant viral enteritis. **Cited in: Fayer, R., 2010**. Taxonomy and species delimitation in ***Cryptosporidium***. Experimental Parasitology. 124, 90–97.
- **Bjorneby, J.M., Leach, D.R., Perryman, L.E., 1991**. Persistent cryptosporidiosis in horses with severe combined immunodeficiency. Infect. Immun. 59, 3823–3826.
- **Bornay-Llinares, F.J., da Silva, A.J., Moura, I.N., Myjak, P., Pietkiewicz, H., Kruminis-Lozowska, 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.

- **Bourgouin, H., 1996**. la place de la cryptosporidiose dans les maladies néonatales du veau en Corrèze. G.T.V.19-41.
- **Bray, R.E., Wickler, S.J., Cogger, E.A., Atwill, E.R., London, C., Gallino, J.L., Anderson, T.P., 1997.** Endoparasite infection and ***Cryptosporidium***/***Giardia*** in feral horses on public lands. Equine Nutrition and physiology Society Annual Symposium. 18, 41–43.
- **Broglia, A., Reckinger, S., Caccio, S.M., Nockler, K., 2008**. Distribution of ***Cryptosporidium parvum*** subtypes in calves in Germany. Veterinary Parasitology. 154, 8–13.
- **Burton, A.J., Nydam, D.V., Dearen, T.K., Mitchell, K., Bowman, D.D., Xiao, L., 2010.** The prevalence of ***Cryptosporidium,*** and identification of the ***Cryptosporidium*** horse genotype in foals in New York State. Vet Parasitol. 174, 139–144.
- **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.
- **Cacciò, S. M., Andrew Thompson, R.C., McLauchlin, J., Smith, H. V., 2005**. Unravelling ***Cryptosporidium*** and ***Giardia*** epidemiology. Trends in Parasitology. 21(9), 430–437.
- **Cacciò, S. M., Pinter, E., Fantini, R., Mezzaroma, I., Pozio, E., 2002**. Human infection with ***Cryptosporidium felis***: case report and literature review. Emerg. Infect. Dis. 8, 85–86.
- **Caffara, M., Piva, S., Pallaver, F., Iacono, E., Galuppi, R., 2013.** Molecular characterization of ***Cryptosporidium spp***. from foals in Italy. The Veterinary Journal. 198, 531–533.

- **Cama, V., 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. **Cited in: Rieux, A., Paraud, C., Pors, I., Chartier, C., 2013**. Molecular characterization of ***Cryptosporidium spp***. in pre-weaned kids in a dairy goat farm in western France. Veterinary Parasitology. 192, 268–272.
- **Casemore, D.P., 2000.** Human cryptosporidiosis: clinical aspects, epidemiology and control. Proceedings of the Royal College of Physicians Edinburgh. **Cited in: Chalmers, R.M., Davies A. P., 2010**. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. Experimental Parasitology. 124,138–146.
- **Casemore, D.P., Sands, R.L., Curry, A., 1985.** Cryptosporidium species a ‘‘new” human pathogen. **Cited in: Fayer, R., 2010**. Taxonomy and species delimitation in ***Cryptosporidium***. Experimental Parasitology. 124, 90–97.
- **Castro-Hermida, J.A., Garcia-Presedo, I., Almeida, A., Gonzalez-Warleta, M., Correia Da Costa, J.M., Mezo, M., 2011**. ***Cryptosporidium spp***. and ***Giardia duodenalis*** in two areas of Galicia (NW Spain). Sci. Total Environ. 409, 2451–2459.
- **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., Davies A. P., 2010**. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. Experimental Parasitology. 124,138–146.
- **Chalmers, R.M., Elwin, K., Hadfield, S.J., Robinson, G., 2011.** Sporadic human cryptosporidiosis caused by ***Cryptosporidium cuniculus***, United Kingdom, 2007–2008. Emerg. Infect. Dis. 17, 536–538.

- **Chalmers, R.M., Elwin, K., Thomas, A.L., Guy, E.C., Mason, B., 2009a.** Long-term ***Cryptosporidium*** typing reveals the aetiology and species-specific epidemiology of human cryptosporidiosis in England and Wales, 2000 to 2003. Euro Surveill. 14, 19086.
- **Chalmers, R.M., Ferguson, C., Caccio, S., Gasser, R.B., Abs El-Osta, Y.G., Heijnen, L., Xiao, L., Elwin, K., Hadfield, S., Sinclair, M., Stevens, M., 2005a**. Direct comparison of selected methods for genetic categorization of ***Cryptosporidium parvum*** and ***Cryptosporidium hominis*** species. International Journal for Parasitology. 35, 397–410.
- **Chalmers, R.M., Robinson, G., Elwin, K., Hadfield, S.J., Xiao, L., Ryan, U., Modha, D., Mallaghan, C., 2009b*. Cryptosporidium sp*. rabbit genotype**, a newly identified human pathogen. Emerg. Infect. Dis. 15, 829–830.
- **Chalmers, R.M., Thomas, A.L., Butler, B.A., Morel, M.C., 2005b.** Identification of ***Cryptosporidium parvum*** **genotype 2** in domestic horses. Vet. Rec. 156, 49–50.
- **Chartier, C. 2003**. Cryptosporidiose des ruminants : actualités en matière d'épidémiologie, de diagnostic et de contrôle. Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Edition tec et doc, Edition Médicales Internationales : 1559–1568.
- **Cole, D.J., Cohen, N.D., Snowden, K., Smith, R., 1998**. Prevalence of and risk factors for fecal shedding of ***Cryptosporidium parvum*** oocysts in horses. J. Am. Vet. Med. Assoc. 213, 1296–1302.
- **Coleman, S.U., Klei, T.R., French, D.D., Chapman, M.R., Corstvet, R.E., 1989**. Prevalence of ***Cryptosporidium sp*** in equids in Louisiana. Am. J. Vet. Res. 50, 575–577.

- **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.
- **Current, W.L., Upton, S., Haynes, T.B., 1986**. The life cycle of ***Cryptosporidium baileyi n. sp.*** (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. Journal of Protozoology. 33, 289–296.
- **De Graaf, D., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L.M., Abbassi, H., Peeters, J.E., 1999**. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. Int. J. Parasitol. 29, 1269–1287.
- **De Souza, P.N., Bomfim, T.C., Huber, F., Abboud, L.C., Gomes, R.S., 2009.** Natural infection by ***Cryptosporidium sp.***, ***Giardia sp.*** and ***Eimeria leuckarti*** in three groups of equines with different handlings in Rio de Janeiro. Brazil .Vet. Parasitol. 160, 327–333.
- **Del Coco, V. F., Córdoba, M. A., Bilbao, G., de AlmeidaCastro, A. P., Basualdo, J. A., Fayer, R., Santín, M., 2014**. ***Cryptosporidium parvum*** GP60 subtypes in dairy cattle from Buenos Aires, Argentina. Research in Veterinary Science. 96,311–314.
- **Diaz, P., Quilez, J., Chalmers, R.M., Panadero, R., Lopez, C., Sanchez-Acedo, C., Morrondo, P., Diez-Banos, P., 2010.** Genotype and subtype analysis of ***Cryptosporidium*** isolates from calves and lambs in Galicia (NW Spain). Parasitology. 137, 1187–1193.
- **Do Couto, M. C.M., Lima., M.F., do Bomfim, T. C. B., 2013.** New ***Cryptosporidium parvum*** subtypes of IIa subfamily in dairy calves from Brazil. Acta Tropica. 130, 117 –122.

- **Dyachenko, V., Kuhnert, Y., Schmaeschke, R., Etzold, M., Pantchev, N., Daugschies, A., 2010**. Occurrence and molecular characterization of ***Cryptosporidium spp***. Genotypes in European hedgehogs (Erinaceus europaeus L.) in Germany. Parasitology. 137, 205–216.
- **Egyed, Z., Sréter, T., Széll, Z., Varga, I., 2003**. Characterization of ***Cryptosporidium spp***.—recent developments and future needs. Veterinary Parasitology. 111, 103–114.
- **El-Shewyl, K., Kibsey, P. C., Wenman, W. M., 1994.** Development of an enzyme-linked immunosorbent assays and counters immunoelectrophoresis for the detection of ***Cryptosporidium parvum*** copro-antigens**.** J. Infect. Dis. 6, 82-86.
- **Elwin, K., Chalmers, R.M., 2008**. Contemporary identification of previously reported novel ***Cryptosporidium*** isolates reveals ***Cryptosporidium bovis*** and the **cervine genotype** in sheep (Ovis Aries). Parasitol. Res. 102, 1103–1105.
- **Elwin, K., Hadfield, S.J., Robinson, G., Chalmers, R.M., 2012a**. The epidemiology of sporadic human infections with unusual cryptosporidia detected during routine typing in England and Wales, 2000–2008. Epidemiol. Infect. 140, 673–683.
- **Elwin, K., Hadfield, S.J., Robinson, G., Crouch, N.D., Chalmers, R.M., 2012b.** ***Cryptosporidium viatorum n. sp.*** (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007–2011. Int. J. Parasitol. 42, 675–682.
- **Euzéby, E**. **1987**. Cryptosporidioses. Protozoologie médicale comparée, Volume II. Fondation Marcel Mérieux. Lyon. 307–324.
- **Farrington, M., Lloyd, S., Winters, S., Smith, J., Rubenstein, D., 1995.** Patterns of ***Cryptosporidium*** antigen and oocyst excretion in calves studied by reverse passive haemagglutination and light microscopy. Vet. Parasitol. 60, 7–16.

- **Fayer, R. 2004.** Review ***Cryptosporidium***: A water-borne Zoonotic Parasite. Veterinary Parasitology.126, 37–56.
- **Fayer, R., 2010**. Taxonomy and species delimitation in ***Cryptosporidium***. Experimental Parasitology. 124, 90–97.
- **Fayer, R., Santín, M.**, **2009. *Cryptosporidium xiaoi n. sp.*** (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (Ovis Aries). Veterinary Parasitology. 164, 192–200.
- **Fayer, R., Santín, M., Macarisin, D., 2010. *Cryptosporidium ubiquitum n. sp.*** in animals and humans. Veterinary Parasitology. 172, 23–32.
- **Fayer, R., Santín, M., Trout, J.M., 2008**. ***Cryptosporidium ryanae n. sp.*** (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (Bos Taurus). Veterinary Parasitology. 156, 191–198.
- **Fayer, R., Santín, M., Trout, J.M., Dubey, J.P., 2006.** Detection of ***Cryptosporidium felis*** and ***Giardia duodenalis*** Assemblage F in a cat colony. Vet. Parasitol. 140, 44–53.
- **Fayer, R., Santín, M., Xiao, L., 2005**. ***Cryptosporidium bovis n. sp.*** (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (Bos Taurus). The Journal of Parasitology. 91, 624–629.
- **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 (6), 1415–1422.
- **Feltus, D.C., Giddings, C.W., Schneck, B.L., Monson, T., Warshauer, D., McEvoy, J., 2006**. Evidence supporting zoonotic transmission of ***Cryptosporidium*** in Wisconsin. Journal of Clinical Microbiology. 44, 4303–4308.
- **Feng, Y., 2010**. ***Cryptosporidium*** in wild placental mammals. Experimental Parasitology. 124, 128–137.

- **Feng, Y., Lal, A.A., Li, N., Xiao, L., 2011.** Subtypes of ***Cryptosporidium spp***. in mice and other small mammals. Experimental Parasitology. 127, 238–242.
- **Feng, Y., Li, N., Duan, L., Xiao, L., 2009**. ***Cryptosporidium*** genotype and subtype distribution in raw wastewater in Shanghai, China: evidence for possible unique ***Cryptosporidium hominis*** transmission. J. Clin. Microbiol. 47,153–157.
- **FitzGerald, L., Bennett, M., Ng, J., Nicholls, P., James, F., Elliot, A., Slaven, M., Ryan, U., 2011.** Morphological and molecular characterisation of a mixed ***Cryptosporidium muris*/*Cryptosporidium felis*** infection in a cat. Veterinary Parasitology. 175,160–164.
- **Fiuza, V.R., Cosendey, R.I.J., Frazao-Teixeira, E., Santín, M., Fayer, R., de Oliveira, F.C.R., 2011**. Molecular characterization of ***Cryptosporidium*** in Brazilian sheep. Vet. Parasitol. 175, 360–362.
- **Forde**, **K.N., Swinker, A.M., Traub-Dargatz, J.L., Cheney, J.M., 1997**. The prevalence of ***Cryptosporidium/Giardia*** in the trail horse population utilizing public lands in Colorado. Equine Nutrition and physiology Society Annual Symposium. 18, 39–40.
- **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. Infection, Genetics and Evolution. 7, 197–205.
- **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.
- **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.

- **Giles, M., Chalmers, M. 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.
- **Graczyk, T.K., 2008**. Fish, amphibians, and reptiles. **Cited in**: **Fayer, R., 2010**. Taxonomy and species delimitation in ***Cryptosporidium***. Experimental Parasitology. 124, 90–97.
- **Griffiths, J.K., Moore, R., Dooley, S., Keusch, G.T., Tzipori, S., 1994**. ***Cryptosporidium parvum*** infection of Caco-2 cell monolayers induces an apical monolayer defect selectively increases transmonolayer permeability, and causes epithelial cel death. **Cited in**: **Chalmers, R.M., Davies A. P., 2010**. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. Experimental Parasitology. 124,138–146.
- **Grinberg, A., Learmonth, J., Kwan, E., Pomroy, W., Lopez Villalobos, N., Gibson, I., Widmer, G., 2008.** Genetic diversity and zoonotic potential of ***Cryptosporidium parvum*** causing foal diarrhea. J. Clin. Microbiol. 46, 2396–2398.
- **Grinberg, A., Oliver, L., Learmonth, J.J., Leyland, M., Roe, W., Pomroy, W., 2003.** Identification of ***Cryptosporidium parvum*** 'cattle' genotype from a severe outbreak of neonatal foal diarrhoea. Vet. Rec. 153, 628–63.
- **Grinberg, A., Pomroy, W., Carslake, H.B., Shi, Y., Gibson, I.R., Drayton, B.M., 2009.** A study of neonatal cryptosporidiosis of foals in New Zealand. NZ Vet. J. 57, 284–289.
- **Guyot, K., Follet-Dumoulin, A., Lelièvre, E., Sarfati, C., Rabodonirina, M., Nevez, G., Cailliez, J.C., Camus, D., Dei-Cas, E., 2001**. Molecular characterization of ***Cryptosporidium*** isolates obtained from humans in France. J. Clin. Microbiol. 39, 3472–3480.

- **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.
- **Harris, J.R., Petry, F., 1999. *Cryptosporidium parvum***: structural components of the oocyst wall. J. Parasitol. 85 (5), 839–849.
- **Henriksen, S.A., Pohlenz**, **H.V. 1981.** Staining of cryptospordia by a modified Ziehl Neelsen technique. Acta. Vet. Scand. 22, 594–596.
- **Imhasly, A., Frey, C.F., Mathis, A., Straub, R., Gerber, V., 2009.** Cryptosporidiose (***C. parvum***) in a foal with diarrhea. Schweiz. Arch. Tierheilkd. 151, 21–26.
- **Imre, K., Luca, C., Costache, M., Sala, C., Morar, A., Morariu, S., Ilie, M.S., Imre, M., Darabus, G., 2013**. Zoonotic ***Cryptosporidium parvum*** in Romanian newborn lambs (Ovis Aries). Vet. Parasitol. 191, 119–122.
- **Inman, L.R., Takeuchi, A., 1979**. Spontaneous cryptosporidiosis in an adult female rabbit. Vet. Pathol. 16, 89–95.
- **Insulander, M., Silverlås, C., Lebbad, M., Karlsson, L., Mattsson, J.G., Svenungsson, B., 2013.** Molecular epidemiology and clinical manifestations of human cryptosporidiosis in Sweden. Epidemiol. Infect. 141, 1009–1020.
- **International Commission on Zoological Nomenclature., 1999.** International Code of Zoological Nomenclature, 4th ed. International Trustfor Zoological Nomenclature, London, 306 p.
- **Iseki, M., 1979**. ***Cryptosporidium felis sp. n.*** (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. Japanese Journal of Parasitology. 28, 285–307.
- **Jellison, K.L., Distel, D.L., Hemond, H.F., Schauer, D.B., 2004.** Phylogenetic analysis of the hypervariable region of the 18S rRNA gene of ***Cryptosporidium***

oocysts in feces of Canada geese (**Branta canadensis**): evidence for five novel genotypes. Applied and Environmental Microbiology. 70, 452–458.

- **Jex, A.R., Pangasa, A., Campbell, B.E., Whipp, M., Hogg, G., Sinclair, M.I., Stevens, M., Gasser, R.B., 2008b**. Classification of ***Cryptosporidium*** from sporadic cryptosporidiosis cases in humans employing sequence-based multilocus analysis following mutation scanning. Journal of Clinical Microbiology. 46, 2252–2262.
- **Jex, A.R., Smith, H.V., Monis, P.T., Campbell, B.E., Gasser, R.B., 2008a**. ***Cryptosporidium*** — Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. Biotechnology Advances. 26, 304–317.
- **Jex, A.R., Whipp, M., Campbell, B.E., Caccio, S.M., Stevens, M., Hogg, G., Gasser, R.B., 2007**. A practical and cost-effective mutation scanning-based approach for investigating genetic variation in ***Cryptosporidium***. Electrophoresis. 28, 3875–3883.
- **Jiang, J., Alderisio, K.A., Xiao, L., 2005.** Distribution of ***Cryptosporidium*** genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. Appl. Environ. Microbiol. 71, 4446–4454.
- **Jirku, M., Valigurova, A., Koudela, B., Krizek, J., Modry, D., Slapeta, J., 2008.** New species of ***Cryptosporidium*** **Tyzzer, 1907** (Apicomplexa) from amphibian host morphology, biology and phylogeny. Folia Parasitol. 55, 81–94.
- **Johnson, E., Atwill, E.R., Filkins, M.E., Kalush, J., 1997**. The prevalence of shedding of ***Cryptosporidium*** and ***Giardia spp***. based on a single fecal sample collection from each of 91 horses used for backcountry recreation. J. Vet. Diagn. Invest. 9, 56–60.
- **Kennedy, G.A., Kreitner, G.L., Strafuss, A.C., 1977**. Cryptosporidiosis in three pigs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 170, 348–350.

- **Koinari, M., Karl, S., Ng, J., Lymbery, A.J., Ryan, U., 2013.** Identification of novel and zoonotic ***Cryptosporidium*** species in fish from Papua New Guinea. Vet. Parasitol. 198, 1– 9.
- **Koudela, B., Modry, D., 1998**. New species of ***Cryptosporidium*** (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from lizards. Folia Parasitologia 45, 93–100.
- **Kváč, M., Kestǐránová, M., Kveťoňová, D., Kotková, M., Ortega, Y., McEvo J., Sak, B., 2012*. Cryptosporidium tyzzeri*** and ***Cryptosporidium muris*** originated from wild West-European house mice (***Mus musculus domesticus***) and East-European house mice (***Mus musculus musculus***) are non-infectious for pigs. Exp. Parasitol. 131, 107–110.
- **Kváč, M., Hofmannová, L., Hlásková, L., Kveťoňová, D., Vítovec, J., McEvoy, J., Sak, B., 2014b. *Cryptosporidium erinacei n. sp*.** (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. Veterinary Parasitology.201, 9–17.
- **Kváč, M., Hromadova, N., Kveťoňová, D., Rost, M., Sak, B., 2011.** Molecular characterization of ***Cryptosporidium spp***. in pre-weaned dairy calves in the Czech Republic: absence of ***C. ryanae*** and management-associated distribution of ***C. andersoni***, ***C. bovis*** and ***C. parvum*** subtypes. Vet. Parasitol. 177, 378–382.
- **Kváč, M., Kestrǐánová, M., Pinková, M., Kveťoňová, D., Kalinová, J., Wagnerová, P., Kotková, M., Vítovec, J., Ditrich, O., McEvoy, J., Stenger, B., Sak, B., 2013b**. ***Cryptosporidium scrofarum n. sp.*** (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (Sus scrofa). Vet. Parasitol. 191, 218–227.
- **Kváč, M., Kveťoňová, D., Sak, B., Ditrich, O., 2009b**. ***Cryptosporidium*** **pig genotype II** in immunocompetent man. Emerg. Infect. Dis. 15, 982–983.

- **Kvác̆, M., McEvoy, J., Loudová, M., Stenger, B., Sak, B., Kveˇtoˇnová, D., Ditrich, O., Rašková, V., Moriarty, E., Rost, M., Macholán, M., Piálek, J., 2013a.** Coevolution of ***Cryptosporidium tyzzeri*** and the house mouse (***Mus musculus***), International Journal for Parasitology. 43, 805–817.
- **Kvác̆, M., Saková, K., Kveˇtoˇnová, D., Kicia, M., Wesołowska, M., McEvoy, J., Sak, B., 2014a**. Gastroenteritis Caused by the ***Cryptosporidium*** **Hedgehog Genotype** an Immunocompetent Man. Journal of Clinical Microbiology. 52,347–349.
- **Laatamnaa, A.K., Wagnerová, P., Sak, B., Kveˇtoˇnová, D., Aissi, M., Rost, M., Kvác̆, M., 2013.** Equine cryptosporidial infection associated with ***Cryptosporidium*** **hedgehog genotype** in Algeria. Vet. Parasitol.197, 350–353.
- **Laboratoire HOECHST ROUSSEL VET** (document). Halocur, l'innovation dans la prévention de la diarrhée à ***Cryptosporidium parvum.*** Cited in : **Morin, R**. **2002**. Cryptosporidiose chez les ruminants. www.bibli.vet- nantes.fr/thèse/2002/Morin02-148/biblio.pdf.
- **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 chemikines. **Cited in: Chalmers, R .M., Davies A. P., 2010**. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. Experimental Parasitology. 124,138–146.
- **Lengronne, D., Regnier, G., Veau, P., Chermette, R., Boufassa, S., Soule, C., 1985.** Cryptosporidiose chez des poulains diarrhéiques. **Cited in: Veronesi, F., Passamonti, F., Caccio, S.M., Diaferia, M., Piergili Fioretti, D., 2010.** Epidemiological survey on equine **Cryptosporidium** and **Giardia** infections in Italy and molecular characterization of isolates. Zoonoses Public Health. 57, 510–517.

- **Leoni, F., Mallon, M.E., Smith, H.V., Tait, A., McLauchlin, J., 2007**. Multilocus analysis of ***Cryptosporidium hominis*** and ***Cryptosporidium parvum*** isolates from sporadic and outbreak-related human cases and ***C. parvum*** isolates from sporadic livestock cases in the United Kingdom. J. Clin. Microbiol. 45, 3286–3294.
- **Levine, N.D., 1961**. Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man. **Cited in: Šlapeta, J., 2012.** Letter: The name ***Cryptosporidium tyzzeri*** Ren, Zhao, Zhang, Ning, Jian, Wang Lv, Wang, Arrowood and Xiao, 2012 is permanently invalid. Experimental Parasitology. 130, 306–307.
- **Levine, N.D., 1980**. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. Journal of Parasitology. 66, 830–834.
- **Li, N., Xiao, L., Alderisio, K., Elwin, K., Cebelinski, E., Chalmers, R., Santín, M., Fayer, R., Kvac, M., Ryan, U., Sak, B., Stanko, M., Guo, Y., Wang, L., Zhang, L., Cai, J., Roellig, D., Feng, Y., 2014.** Subtyping ***Cryptosporidium ubiquitum***, a Zoonotic Pathogen Emerging in Humans. Emerging Infectious Diseases. 20(2), 217–224.
- **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. Journal of Eukaryotic Microbiology. 47, 91–95.
- **Lv, C., Zhang, L., Wang, R., Jian, F., Zhang, S., Ning, C., Wang, H., Feng, C., Wang, X., Ren, X., Qi, M., Xiao, L., 2009**. ***Cryptosporidium spp.*** in wild laboratory, and pet rodents in china: prevalence and molecular characterization. Appl. Environ. Microbiol. 75, 7692–7699.
- **Mahdi, N.K., Ali, N.H., 2002**. Cryptosporidiosis among animal handlers and their livestock in Basrah. Iraq. East. Afr. Med. J. 79, 550–553.

- **Mair, T.S., Taylor, F.G., Harbour, D.A., Pearson, G.R., 1990**. Concurrent ***Cryptosporidium*** and **coronavirus** infections in an Arabian foal with combined immunodeficiency syndrome. Vet. Rec. 126, 127–130.
- **Majewska, A.C., Solarczyk, P., Tamang, L., Graczyk, TK., 2004**. Equine ***Cryptosporidium parvum*** infections in western Pomlond. Parasitology Res. 93, 274–278.
- **Majewska, A.C., Werner, A., Sulima, P., Luty, T., 1999**. Survey on equine cryptosporidiosis in Poland and the possibility of zoonotic transmission. Ann. Agric. Environ. Med. 6, 161–165.
- **Majewska, A.C., Werner, A., Sulima, P., Luty, T., 2000**. Prevalence **of *Cryptosporidium*** in sheep and goats bred on five farms in west-central region of Poland. Vet. Parasitol. 89, 269–275.
- **Manuel terrestre de l'O.I.E., 2005. Cryptosporidiose,** Chapitre 2.10.9.1188 – 1207.
- **Marques, S.M.T., 2010**. Cryptosporidiosis in horses of urban areas of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Southern Brazil. Journal of Equine Veterinary Science. 30, 356–358.
- **McKenzie, D.M., Diffay, B.C., 2000**. Diarrhoea associated with cryptosporidial oocyst shedding in a quarterhorse stallion.Aust.Vet.J.78, 27–28.
- **McLauchlin, J., Amar, C., Pedraza-Diaz, S., Nichols, G.L., 2000**. Molecular epidemiological analysis of ***Cryptosporidium spp.*** in the United Kingdom: results of genotyping ***Cryptosporidium spp***. in 1705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. J. Clin. Microbiol. 38, 3984–3990.

- **Meireles, M.V., Soares, R.M., dos Santos, M.M.A.B., Gennari, S.M., 2006**. Biological studies and molecular characterization of a ***Cryptosporidium*** isolate from ostriches (Struthio camelus). Journal of Parasitology. 92, 623–626.
- **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.
- **Misic, Z., Abe, N., 2007**. Subtype analysis of ***Cryptosporidium parvum*** isolates from calves on farms around Belgrade, Serbia and Montenegro, using the 60 kDa glycoprotein gene sequences. Parasitology. 134, 351–358.
- **Morgan, U.M., Monis, P.T., Xiao, L.H., Limor, J., Sulaiman, I., Raidal, S., O'Donoghue, P., Gasser, R., Murray, A., Fayer, R., Blagburn, B.L., Lal, A.A., Thompson, R.C.A., 2001**. Molecular and phylogenetic characterisation of ***Cryptosporidium*** from birds. International Journal for Parasitology. 31, 289–296.
- **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. Journal of Eukaryotic Microbiology. 49, 433–440.
- **Morin, R**. 2002. Cryptosporidiose chez les ruminants. www.bibli.vet nantes.fr/thèse/2002/Morin02-148/biblio.pdf.
- **Morine, M., Yang, R., Ng, J., Kueh, S., Lymbery, A.J., Ryan, U., 2012**. Additional novel ***Cryptosporidium*** **genotypes** in ornamental fishes. Vet. Parasitol. 190, 578–582.
- **Mtambo, M.M.A., Nash, A.S., Wright, S.E., Smith, H.V., Blewett, D.A., Jarrett, O., 1995.** Prevalence of specific anti-**Cryptosporidium** IgG, IgM and IgA antibodies in cat sera using an indirect immunofluorescence antibody test. Veterinary Parasitology. 60, 37–43.

- **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.
- **Murphy, B.G., Bradway, D., Walsh, T., Sanders, G.E., Snekvik, K., 2009**. Gastric cryptosporidiosis in freshwater angelfish (Pterophyllum scalare). J. Vet. Diagn. Invest. 21, 722–727.
- **Naciri, M., Lacroix, S., Laurent. F., 2007**. la cryptosporidiose chez les jeunes ruminants non sevrés : le pouvoir pathogène de ***Cryptosporidium parvum***. Le Nouveau Praticien Vétérinaire. 15–20.
- **Navarro-i-Martinez, L., da Silva, A.J., Bornay-Llinares, F.J., Moura, I.N., del Aguila, C., Oleaga, A., Pieniazek, N.J., 2007**. Detection and molecular characterization of ***Cryptosporidium*** bovis-like isolate from a newborn lamb in Spain. J. Parasitol. 93, 1536–1538.
- **Netherwood, T., Wood, J.L., Townsend, H.G., Mumford, J.A., Chanter, N., 1996.** Foal diarrhoea between 1991 and 1994 in the United Kingdom associated with ***Clostridium perfringens, rotavirus, Strongyloides westeri*** and ***Cryptosporidium spp***. Epidemiol. Infect. 117, 375–383.
- **Ng, J., Eastwood, K., Durrheim, D., Massey, P., Walker, B., Armson, A., Ryan, U., 2008**. Evidence supporting zoonotic transmission of ***Cryptosporidium*** in rural New South Wales. Experimental Parasitology. 119, 192–195.
- **Ng, J., MacKenzie, B., Ryan, U., 2010**. Longitudinal multi-locus molecular characterisation of sporadic Australia human clinical cases of cryptosporidiosis from 2005 to 2008. Experimental Parasitology.125, 348–356.
- **Ng, J., Pavlásek, I., Ryan, U., 2006**. Identification of novel ***Cryptosporidium*** **genotypes** from avian hosts. Applied and Environmental Microbiology. 72, 7548–7553.

- **Nime, F.A., Burek, J.D., Page, D.L., Holscher, 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.V.J., Horadagoda, N.U., Abdul-Careem, M.F., Arulkanthan, A., 2012. *Cryptosporidium***, an important enteric pathogen in goats – A review. Small Ruminant Research. 106, 77–82.
- **O'Brien, E., McInnes, L., Ryan, U., 2008**. ***Cryptosporidium*** GP60 genotypes from humans and domesticated animals in Australia, North America and Europe. Experimental Parasitology. 118, 118–121.
- **O'Donoghue, P., 1995. *Cryptosporidium*** and cryptosporidiosis in man and animals. Int. J. Parasitol. 25, 139–195.
- **O'Hara, S.P., Chen, X.M., 2011**. The cell biology of ***Cryptosporidium*** infection. Microbes and infection. 13, 721–730.
- **Ojcius, D.M., Perfettini, J.L., Bonnin, A., Laurent, F., 1999.**Caspase-dependent apoptosis during infection with ***Cryptosporidium parvum***. **Cited in**: **Chalmers, R .M., Davies A. P., 2010**. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. Experimental Parasitology. 124,138–146.
- **Olson, M.E., Thorlakson, C.L., Deselliers, L., Morck, D.W., McAllister, T.A., 1997**. ***Giardia*** and ***Cryptosporidium*** in Canadian farm animals. Vet. Parasitol. 68, 375–381.
- **Ondrácková, Z., Kváč, M., Sak, B., Kvˇetoˇnová, D., Rost, M., 2009**. Prevalence and molecular characterization of ***Cryptosporidium spp***. in dairy cattle in South Bohemia, the Czech Republic. Vet. Parasitol. 165, 141–144.

- **Palmer, C.J., Xiao, L., Terashima, A., Guerra, H., Gotuzzo, E., Saldias, G., Bonilla, J.A., Zhou, L., Lindquist, A., Upton, S.J., 2003**. ***Cryptosporidium muris***, a rodent pathogen, recovered from a human in Peru. Emerg. Infect. Dis. 9, 1174–1176.
- **Palmer, C.S., Traub, R.J., Robertson, I.D., Devlin, G., Rees, R., Thompson R.C.A., 2008.** Determining the zoonotic significance of ***Giardia*** and ***Cryptosporidium*** in Australian dogs and cats. Vet. Parasitol. 154, 142–147.
- **Panciera, R.J., Thomassen, R.W., Garner, F.M., 1971**. Cryptosporidial infection in a calf. Vet. Parasitol. 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.
- **Pavlasek, I., 1999.** Cryptosporidia: Biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. Remedia—Klinicka Mikrobiologie. 3, 290–301**.**
- **Pavlasek, I., 2001**. Findings of Cryptosporidia in the stomach of chickens and of exotic and wild birds. Veterinarstvi, 51, 103–108.
- **Pavlásek, I., Lávicková, M., Horák, P., Král, J., Král, B., 1995**. ***Cryptosporidium varanii n sp.*** (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Emerald monitor (Varanus prasinus Schlegal, 1893) in captivity in Prague Zoo. Gazella. 22, 99–108.
- **Pavlasek, I., Ryan, U., 2007**. The first finding of a natural infection of ***Cryptosporidium muris*** in a cat. Vet. Parasitol. 144, 349–352.
- **Pavlasek, I., Ryan, U., 2008**. ***Cryptosporidium varanii*** takes precedence over ***C. Saurophilum***. Exp. Parasitol. 118, 434–437.
- **Peeters, J., Villacorta, I., *Cryptosporidium.* Cited in**: **Morin, R**.2002.Cryptosporidiose chez les ruminants. www.bibli.vet nantes.fr/thèse/2002/Morin02-148/biblio.pdf.

- **Peng, M.M., Xiao, L., Freeman, A.R., Arrowood, M.J., Escalante, A.A., Weltman, A.C., Ong, C.S., MacKenzie, W.R., Lal, A.A., Beard, C.B., 1997.** Genetic polymorphism among ***Cryptosporidium parvum*** isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. Emerging Infectious Diseases. 3, 567–573.
- **Perrucci, S., Buggiani, C., Sgorbini, M., Cerchiai, I., Otranto, D., Traversa, D., 2011**. ***Cryptosporidium parvum*** infection in a mare and her foal with foal heat diarrhoea. Vet. Parasitol. 182, 333–336.
- **Perryman, L.E., Bjorneby, J.M., 1991**. Immunotherapy of cryptosporidiosis in immunodeficient animal models. J. Protozool. 38, 98S–100S.
- **Petry, F., Harris, J.R., 1999.** Ultrastructure, fractionation and biochemical analysis of ***Cryptosporidium parvum*** sporozoïtes. Int. J. Parasitol. 29 (8), 1249-1260.
- **Picoux, J.B., 2004.** Maladies des ovins : Cryptosporidiose et coccidioses. Edition France Agricole, 2^{e} édition. 150–153.
- **Plutzer, J., Karanis, P., 2007.** Genotype and subtype analyses of ***Cryptosporidium*** isolates from cattle in Hungary. Veterinary Parasitology 146, 357–362.
- **Plutzer, J., Karanis, P., 2009.** Genetic polymorphism in ***Cryptosporidium*** species: An update. Veterinary Parasitology. 165, 187–199.
- **Plutzer, J., Tomor, B., 2009**. The role of aquatic birds in the environmental dissemination of human pathogenic Giardia duodenalis cysts and ***Cryptosporidium*** oocysts in Hungary. Parasitology International. 58,227–231.
- **Power, M., Ryan, U., 2008**. ***Cryptosporidium macropodum n. sp.*** (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos Macropus giganteus. Journal of Parasitology. 94, 1114–1117.

- **Pritchard, G.C., Marshall, J.A., Giles, M., Chalmers, R.M., Marshall, R.N., 2007**. ***Cryptosporidium parvum*** infection in orphan lambs on a farm open to the public. Vet. Rec. 161, 11–14.
- **Qadripur, S.A., Klose, L., 1985.** ***Cryptosporidium*** enteritidis. Occurrence in southern Lower Saxony. Study of urticaria as an example. **Cited in: Fayer, R., 2010**. Taxonomy and species delimitation in ***Cryptosporidium***. Experimental Parasitology. 124, 90–97.
- **Qi, M., Wang, R., Ning, C., Li, X., Zhang, L., Jian, F., Sun, Y., Xiao, L., 2011**. ***Cryptosporidium spp.*** in pet birds: genetic diversity and potential public health significance. Exp. Parasitol. 128, 336–340.
- **Quilez, J., Torres, E., Chalmers, R.M., Hadfield, S.J., Del Cacho, E., Sanchez-Acedo, C., 2008a**. ***Cryptosporidium*** genotypes and subtypes in lambs and goat kids in Spain. Appl. Environ. Microbiol. 74, 6026–6031.
- **Quilez, J., Torres, E., Chalmers, R.M., Robinson, G., Del Cacho, E., Sanchez-Acedo, C., 2008b**. ***Cryptosporidium*** species and subtype analysis from dairy calves in Spain. Parasitology. 135, 1613–1620.
- **Rašková, V., Kveˇtoˇnová, D., Sak, B., McEvoy, J., Edwinson, A., Stenger, B., Kvácˇ, M., 2013**. Human cryptosporidiosis caused by ***Cryptosporidium tyzzeri*** and ***C. parvum*** isolates presumably transmitted from wild mice. J. Clin. Microbiol. 51, 360–362.
- **Reid, A., Lymbery, A., Ng, J., Tweedle, S., Ryan, U., 2010.** Identification of novel and zoonotic ***Cryptosporidium*** species in marine fish. Veterinary Parasitology. 168, 195–190.

- **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.
- **Rieux, A., Parauda, C., Porsa, I., Chartier, C., 2013**. Molecular characterization of ***Cryptosporidium spp***. in pre-weaned kids in a dairy goat farm in western France. Veterinary. Parasitology. 192, 268–272.
- **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.
- **Robinson, G., Elwin, K., Chalmers, R.M., 2008**. Unusual ***Cryptosporidium* genotypes** in human cases of diarrhea. Emerg. Infect. Dis. 9, 1174–1176.
- **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.
- **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.
- **Ryan, U.M., Samarasinghe, B., Read, C., Buddle, J.R., Robertson, I.D., Thompson, R.C., 2003a**. Identification of a novel ***Cryptosporidium*** genotype in pigs. Appl. Environ. Microbiol. 69, 3970–3974.
- **Ryan, U., 2010**. ***Cryptosporidium*** in birds, fish and amphibians. Experimental. Parasitology. 124, 113–120.

- **Ryan, U., O'Hara, A., Xiao, L., 2004b.** Molecular and biological characterization of ***Cryptosporidium molnari-like*** isolate from a guppy (Poecilia reticulata). Applied and Environmental Microbiology. 70, 3761–3765.
- **Ryan, U., Xiao, L., Read, C., Zhou, L., Lal, A.A., Pavlásek, I., 2003b.** Identification of novel ***Cryptosporidium*** **genotypes** from the Czech Republic. Appl. Environ. Microbiol. 69, 4302–4307.
- **Ryan, U.M., Monis, P., Enemark, H.L., Sulaiman, I., Samarasinghe, B., Read, C., Buddle, R., Robertson, I., Zhou, L., Thompson, R.C., Xiao, L., 2004a.** ***Cryptosporidium suis n. sp.*** (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (Sus scrofa). J. Parasitol. 90, 769–773.
- **Ryan, U.M., Power, M., Xiao, L., 2008**. ***Cryptosporidium fayeri n. sp.*** (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (Macropus rufus). Journal of Eukaryotic Microbiology. 55, 22–26.
- **Ryan, U.M., Xiao, L., Read, C., Sulaiman, I.M., Monis, P., Lal, A.A., Fayer, R., Pavlásek, I., 2003c.** A redescription of ***Cryptosporidium galli*** Pavlásek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. J. Parasitol. 89, 809–813.
- **Santín, M., Fayer, R., 2007**. Intragenotypic variations in the ***Cryptosporidium sp.*** Cervine genotype from sheep with implications for public health. J. Parasitol. 93, 668–672.
- **Santín, M., Trout, J.M., Vecino, J.A.C., Dubey, J.P., Fayer, R., 2006.** ***Cryptosporidium***, ***Giardia*** and ***Enterocytozoon bieneusi*** in cats from Bogot (Colombia) and genotyping of isolates. Vet. Parasitol. 141, 334–339.
- **Shen, Y.J., Yin, J.H., Yuan, Z.Y., Lu, W.Y., Xu, Y.X., Xiao, L.H., Cao, J.P., 2011**.The identification of the ***Cryptosporidium ubiquitum*** in pre-weaned ovines from Aba Tibetan and Qiang Autonomous prefecture in China. Biomed. Environ. Sci. 24, 315–320.

- **Šlapeta, J., 2006**. ***Cryptosporidium*** species found in cattle: a proposal for a new species. Trends in Parasitology. 22, 469–474.
- **Šlapeta, J., 2007**. Response to Xiao et al.: further debate on the description of ***Cryptosporidium pestis***. Trends Parasitol. 23, 42–43.
- **Šlapeta, J., 2011.** Naming of ***Cryptosporidium pestis*** is in accordance with the ICZN Code and the name is available for this taxon previously recognized as ***C. parvum*** '**bovine genotype'**. Veterinary Parasitology. 177, 1–5.
- **Šlapeta, J., 2012.** Letter: The name ***Cryptosporidium tyzzeri*** Ren, Zhao, Zhang, Ning, Jian, Wang Lv, Wang, Arrowood and Xiao, 2012 is permanently invalid. Experimental Parasitology. 130, 306–307.
- **Šlapeta, J., 2013.** Cryptosporidiosis and ***Cryptosporidium*** species in animals and humans: A thirty colour rainbow? International Journal for Parasitology. 43, 957–970.
- **Slavin, D., 1955**. ***Cryptosporidium meleagridis*** (**sp. nov**.). Journal of Comparative Pathology. 65, 262–266.
- **Smith, H.V., Caccio, S.M., Cook, N., Nichols, R.A.B., Tait, A., 2007**. ***Cryptosporidium*** and ***Giardia*** as foodborne zoonoses. Vet. Parasitol.149, 29–49.
- **Smith, H.V., Cacciò, S.M., Tait, A., McLauchlin, J., Thompson, R.C., 2006.** Tools for investigating the environmental transmission of ***Cryptosporidium*** and ***Giardia*** infections in humans. Trends. Parasitology. 22(4), 160 –167.
- **Smith, H.V., Nichols, R.A.B., Mallon, M., Macleod, A., Tait, A., Reilly, W.J., Browning, L.M., Gray, D., Reid, S.W.J., Wastling, J.M., 2005**. Natural ***Cryptosporidium hominis*** infections in Scottish cattle. Vet. Rec. 156 (22), 710–711.
- **Snyder, S.P., England, J.J., McChesney, A.E., 1978.** Cryptosporidiosis in immunodeficient Arabian foals. Vet. Pathol. 15, 12–17.

- **Soba, B., Logar, J., 2008**. Genetic classification of ***Cryptosporidium*** isolates from humans and calves in Slovenia. Parasitology. 135, 1263–1270.
- **Sturdee, A.P., Bodley-Tickell, A.T., Archer, A., Chalmers, R.M., 2003**. Long-term study of ***Cryptosporidium*** prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. Vet. Parasitol. 116, 97–113.
- **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.
- **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.
- **Sweeny, J.P., Robertson, I.D., Ryan, U.M., Jacobson, C., Woodgate, R.G., 2012**. Impacts of naturally acquired protozoa and strongylid nematode infections on growth and faecal attributes in lambs. Vet. Parasitol.84, 298–308.
- **Tee, G.H., Moody, A. H., Hunt-Cooke, A., Chiodin, P. L., 1993**. A novel assay for detecting soluble antigen of ***Cryptosporidium parvum*** using particle agglutination technology. Serodiagn. Immunother. Infect. Disease. 1, 49–52.
- **Thomaz, A., Meireles, M.V., Soares, R.M., Pena, H.F., Gennari, S.M., 2007.** Molecular identification of ***Cryptosporidium spp.*** From fecal samples of felines, canines and bovines in the state of Sao Paulo, Brazil. Veterinary Parasitology. 150, 291–296.
- **Thompson, H.P., Dooley, J.S., Kenney, J., McCoy, M., Lowery, J.E., Moore, J.E., Xiao, L., 2007.** Genotypes and subtypes of ***Cryptosporidium spp.*** in neonatal calves in Northern Ireland. Parasitol. Res. 100, 619–624.

- **Tomazic, M. L., Maidana, J., Dominguez, M., Uriarte, E.L., Galarza, R., Garro, C., Florin-Christensen, M., Schnittger, D., 2013.** Molecular characterization of ***Cryptosporidium*** isolates from calves in Argentina. Veterinary Parasitology. 198, 382–386.
- **Triffit, M.J., 1925**. Observations on two new species of ***coccidia*** parasitic in snakes. Protozoology. 1, 19–26.
- **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. Parasitology Research. 99, 346–352.
- **Trout, JM., Santín, M., Fayer, R., 2006**. ***Giardia*** and ***Cryptosporidium*** species and genotypes in coyotes (Canis latrans).J Zoo. Wild. Med. 37 (2), 141–144.
- **Tyzzer, E.E., 1907.** A sporozaon found in the peptic glands of the common mouse. Proceeding of the Society of Experimental Biology and Medicine. 5, 12–13.
- **Tyzzer, E.E.1910.** An extracellular ***coccidium, Crypotsporidium muris*** (gen.et sp.nov.), of the gastric glands of the common mouse. J. Med. Resea. 23, 487–509.
- **Tyzzer, E.E.1912**. ***Cryptosporidium parvum*** (sp. nov) a ***coccidium*** found in the small intestine of the common mouse. Arch. Protistenkd. 26, 394–412.
- **Tzipori, S., 1983**. Cryptosporidiosis in animals and humans. Microbiol. Rev. 147, 84–96.
- **Tzipori, S., Angus, K.W., Campbell, I., Gray, E.W., 1980**. ***Cryptosporidium***: evidence for a single-species genus. **Cited in: Fayer, R., 2010.** Taxonomy and species delimitation in ***Cryptosporidium***. Experimental Parasitology. 124, 90–97.
- **Tzipori, S., J.K. Griffiths**. 1998. Naturel history and biology of ***Cryptosporidium.*** Advances in Parasitology. 40, 187–221.

- **Tzipori, S., Ward, H., 2002**. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. Microbes and Infection. 4, 1047–1058.
- **Upton, S.J., Current, W.L., 1985.**The species of ***Cryptosporidium*** (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. J. Parasitol. 71,625–629.
- **Valigurova, A., Jirku, M., Koudela, B., Gelnar, M., Modry, D., Šlapeta, J., 2008.** Cryptosporidia: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. International Journal for Parasitology. 38, 913–922.
- **Veronesi, F., Passamonti, F., Caccio, S.M., Diaferia, M., Piergili Fioretti, D., 2010.** Epidemiological survey on equine ***Cryptosporidium*** and ***Giardia*** infections in Italy and molecular characterization of isolates. Zoonoses Public Health. 57, 510–517.
- **Vesey, G., Slade, J.S., Fricker, C.R., 1991**. Taking the eye strain out of environmental Cryptosporidium analysis. **Cited in**: **Jex, A.R., Smith, H.V., Monis, P.T., Campbell, B.E., Gasser, R.B., 2008a**. ***Cryptosporidium*** — Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. Biotechnology Advances. 26, 304–317.
- **Vetterling, J.M., Jervis, H.R., Merrill, T.G., Sprinz, H., 1971**. ***Cryptosporidium wrairi sp. n.*** from the guinea pig Cavia porcellus, with an emendation of the genus. Journal of Protozoology. 18, 243–247.
- **Waldron, L. S., Dimeski, B., Beggs, P. J., Ferrari, B. C., Power, M. L., 2011**. Molecular Epidemiology, Spatiotemporal Analysis, and Ecology of Sporadic Human Cryptosporidiosis in Australia. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 77, (No. 21), 7757–7765.
- **Waldron, L.S., Cheung-Kwok-Sang, C., Power, M.L., 2010**. Wildlife-associated ***Cryptosporidium fayeri*** in human, Australia. Emerg. Infect. Dis. 16, 2006–2007.

- **Waldron, L.S., Ferrari, B.C., Power, M.L., 2009**. Glycoprotein 60 diversity in ***C. hominis*** and ***C. parvum*** causing human cryptosporidiosis in NSW, Australia. Experimental Parasitology 122, 124–127.
- **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 humans and cattle in The Netherlands. International Journal for Parasitology. 38, 809–817.
- **Xiao, L., 2010**. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. Exp. Parasitol. 124, 80–89.
- **Xiao, L., Bern, C., Arrowood, M., Sulaiman, I., Zhou, L., Kawai, V., Vivar, A., Lal, A.A., Gilman, R.H., 2002a.** Identification of the ***Cryptosporidium*** **pig genotype** in a human patient. J. Infect. Dis. 185, 1846–1848.
- **Xiao, L., Cama, V.A., Cabrera, L., Ortega, Y., Pearson, J., Gilman, R.H., 2007b**. Possible transmission of ***Cryptosporidium canis*** among children and a dog in a household. J. Clin. Microbiol. 45, 2014–2016.
- **Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A.A., Montali, R. J., Fayer, R., Lal, A.A., 1999b**. Phylogenetic Analysis of ***Cryptosporidium*** Parasites Based on the Small-Subunit rRNA Gene Locus. Appl. Environ. Microbiol.65 (4), 1578 –1583.
- **Xiao, L., 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., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J., 2004b**. ***Cryptosporidium*** taxonomy: recent advances and implications for public health. Clinical Microbiology Reviews. 17, 72–97.

- **Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J., 2007a**. Response to the newly proposed species ***Cryptosporidium pestis***. Trends in Parasitology. 23, 41–42.
- **Xiao, L., Feng, Y., 2008.** Zoonotic cryptosporidiosis. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 52, 309–323.
- **Xiao, L., Herd, R.P., 1994**. Epidemiology of equine ***Cryptosporidium*** and ***Giardia*** infections. Equine Vet. J. 26, 14–17.
- **Xiao, L., Hlavsa, M.C., Yoder, J., Ewers, C., Dearen, T., Yang, W., Nett, R., Harris, S., Brend, S.M., Harris, M., Onischuk, L., Valderrama, A.L., Cos-grove, S., Xavier, K., Hall, N., Romero, S., Young, S., Johnston, S.P., Arrowood, M., Roy, S., Beach, M.J., 2009**. Subtype analysis of ***Cryptosporidium*** specimens from sporadic cases in four U.S. states in 2007: the wide occurrence of one ***Cryptosporidium hominis*** subtype and a case report of an infection with the ***Cryptosporidium*** **horse genotype**. J. Clin. Microbiol. 47, 3017–3020.
- **Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R.C., Fayer, R., Lal, A.A., 1999a**. Genetic diversity within ***Cryptosporidium parvum*** and related ***Cryptosporidium*** species. Applied and Environmental Microbiology. 65, 3386–3391.
- **Xiao, L., Ryan, U., Fayer, R., Bowman, D., Zhang, L, 2012.** ***Cryptosporidium tyzzeri*** and ***Cryptosporidium pestis***: Which names valid?, Experimental Parasitology. 130, 308–309.
- **Xiao, L., Ryan, U.M., 2008.** Molecular epidemiology. **Cited in:** Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), ***Cryptosporidium*** and Cryptosporidiosis. CRC Press and IWA Publishing, Boca Raton, FL, pp. 119–171.

- **Xiao, L., Ryan, U.M., Graczyk, T.K., Limor, J., Li, L., Kombert, M., Junge, R., Sulaiman, I.M., Zhou, L., Arrowood, M.J., Koudela, B., Modry´, D., Lal, A.A., 2004a**. Genetic diversity of ***Cryptosporidium spp***. in captive reptiles. Applied and Environmental Microbiology. 70, 891–899.
- **Xiao, L.H., Sulaiman, I.M., Ryan, U.M., Zhou, L., Atwill, E.R., Tischler, M.L., Zhang, X.C., Fayer, R., 2002b**. Host adaptation and host-parasite co-evolution in ***Cryptosporidium***: implications for taxonomy and public health. International Journal of Parasitology. 32, 1773–1785.
- **Ye, J., Xiao, L., Wang, Y., Wang, L., Amer, S., Roellig, D.M., Guo, Y., Feng, Y., 2013**. Periparturient transmission of ***Cryptosporidium xiaoi*** from ewes to lambs. Veterinary Parasitology. 197, 627–633.
- **Yoshiuchi, R., Matsubayashi, M., Kimata, I., Furuya, M., Tani, H., Sasai, K., 2010**. Survey and molecular characterization of ***Cryptosporidium*** and ***Giardia spp***. in owned companion animal, dogs and cats, in Japan. Veterinary Parasitology. 174, 313–316.
- **Zanguee, N., Lymbery, J.A., Lau, J., Suzuki, A., Yang, R., Ng, J., Ryan, U., 2010.** Identification of novel ***Cryptosporidium*** species in aquarium fish. Veterinary Parasitology. 174, 43–48.
- **Zhou, L., Kassa, H., Tischler, M.L., Xiao, L.H., 2004**. Host-adapted ***Cryptosporidium spp.*** in Canada geese (Branta canadensis). Applied and Environmental Microbiology.70, 4211–4215.
- **Zintl, A., Proctor, A.F., Read, C., Dewaal, T., Shanaghy, N., Fanning, S., Mulcahy, G., 2009.** The prevalence of ***Cryptosporidium*** species and subtypes in human faecal samples in Ireland. Epidemiology and Infection. 137, 270–277.

ANNEXES

Tableau A : Comparaison statistique entre le taux d'isolement des cryptosporidies chez la population équine obtenu par la technique de coloration et celui obtenu par PCR.

Test Khi deux

2 valeurs (ddl = 1)				
	Observées	Théoriques	**CHI² =**	**6.0952**
1	29	21.00	**Probabilité =**	**0.0136**
2	13	21.00		

Tableau B : Comparaison statistique entre le taux d'isolement des cryptosporidies chez les chevaux obtenu par la technique de coloration et celui obtenu par PCR.

Test Khi deux

2 valeurs (ddl = 1)				
	Observées	Théoriques	**CHI² =**	**8.2571**
1	26	17.50	**Probabilité =**	**0.0041**
2	9	17.50		

Tableau C : Comparaison statistique entre le taux d'isolement des cryptosporidies chez les ânes obtenu par la technique de coloration et celui obtenu par PCR.

Test Fisher exact

Fréquences empiriques			
	Oui	Non	Totaux
Oui	3	4	7
Non	121	120	241
Totaux	124	124	248

		NON!!!	¬
χ^2 =		**0.15**	|
dl =		**1**	Fisher
p =	0.701412607		**0.5000**
Donc		**n.s.**	**n.s.**

Correction de Yates

2 valeurs (ddl = 1)			
	Observées	Théoriques	CHI² = 0.0000
1	4	3.50	Probabilité = 1.0000
2	3	3.50	Effectif insuffisant
			Effectif insuffisant

Tableau D : Variation du taux d'infestation obtenu par la technique de coloration en fonction de l'âge des équidés.

Test Khi deux

2 valeurs (ddl = 1)			
	Observées	Théoriques	CHI² = 0.8621
1	12	14.50	Probabilité = 0.3532
2	17	14.50	

Tableau E : Variation du taux d'infestation obtenu par la PCR en fonction de l'âge des équidés.

Correction de Yates

2 valeurs (ddl = 1)			
	Observées	Théoriques	CHI² = 1.2308
1	4	6.50	Probabilité = 0.2673
2	9	6.50	

Tableau F : Variation du taux d'infestation obtenu par la coloration en fonction du sexe chez les équidés.

Test Khi deux

2 valeurs (ddl = 1)			
	Observées	Théoriques	CHI² = 0.3103
1	13	14.50	Probabilité = 0.5775
2	16	14.50	

Tableau G : Variation du taux d'infestation obtenu par PCR en fonction du sexe chez les équidés.

Correction de Yates

2 valeurs (ddl = 1)				
	Observées	Théoriques	**CHI² =**	**1.2308**
1	4	6.50	**Probabilité =**	**0.2673**
2	9	6.50		

Effectif insuffisant

Tableau H : Comparaison entre le nombre des cas positifs isolés dans la jumentrie de Tiaret et centre de Kharouba 4.

Test Fisher exact

Fréquences empiriques			
	Oui	Non	Totaux
Oui	7	0	7
Non	181	55	236
Totaux	188	114	302

	NON!!!	¬ | Fisher
$\chi 2$ =	**25.20**	
dl =	**1**	
p =	5.18125E-07	**0.0347**
Donc	**p<0,05**	**p<0,05**

Résumé

Suite à une étude épidémiologique portant sur la cryptosporidiose équine, 481 échantillons de matières fécales (357 chevaux et 124 ânes) ont été récoltés au niveau de la jumentrie de Tiaret, certains centres hippiques situés dans la Wilaya d'Alger et plusieurs régions rurales localisées dans la Wilaya de Sétif et Bordj Bou Arreridj. La mise en évidence des cryptosporidies a été réalisée par l'utilisation combinée des méthodes usuelles de coloration (Ritchie simplifiée par Allen et Redly associée à la coloration de Ziehl Neelsen modifiée) et des techniques de la biologie moléculaire (nested PCR et séquençage).

Chez la population équine, l'étude a montré une prévalence de **6,02 %** par l'examen microscopique et **2,70 %** par la réaction PCR. Chez les chevaux, ***Cryptosporidium spp*** a été isolé avec un taux d'infestation de **7,28 %** par coloration et **2,52 %** par **nested PCR**. Respectivement, les deux techniques ont révélé une prévalence de **2,41 %** et **3,22 %** chez les ânes. Les poulains âgés moins de deux ans ont été infectés avec un taux de **9,6%** par microscopie et **2,4 %** par l'amplification PCR. Les chevaux adultes ont présenté une prévalence de **6,03%** et **2,58%** par les deux techniques utilisées. Un jeune âne âgé moins de deux ans a été détecté positif par nested PCR et les ânes adultes ont montré un taux d'infestation de **2,63%** par les deux méthodes de diagnostic. Dans les élevages collectifs prélevés au niveau de la Wilaya de Tiaret et d'Alger, tous les chevaux positifs au ***Cryptosporidium spp*** ont été isolés dans la jumentrie de Tiaret. L'infestation des chevaux et les ânes n'a été pas associée avec des diarrhées.

Quatre espèces, ***C. parvum***, ***C. muris***, ***C. hominis*** et ***C. erinacei*** ont été identifiées chez les chevaux et chez les ânes pour les deux premières espèces par l'amplification et le séquençage du gène **SSU rDNA**. L'étude des variations génétiques au sein de ces espèces de ***Cryptosporidium*** par l'amplification et le séquençage du gène **Gp60** a montré la présence du subtype **IIaA16G1R1** de ***C. parvum***, un nouveau subtype (**IkA15G1)** de ***C. hominis*** et **XIIIa A22R9** de ***C. erinacei*** (préalablement connu comme **hedgehog genotype**). Cette étude rapporte pour la première fois, la prévalence de ***Cryptosporidium spp*** chez les chevaux et les ânes en Algérie et la première occurrence de ***C. erinacei***, ***C. hominis*** et ***C. muris*** chez les équidés.

Mots clés : ***Cryptosporidium spp***, prévalence, nested PCR, séquençage, SSU, Gp60, chevaux, ânes.

Abstract

Following an epidemiological study on equine cryptosporidiosis, 481 fecal samples (357 horses and 124 donkeys) were harvested at the stud of Tiaret, some equestrian centers situated in the capital Algiers and several rural areas located in the province of Setif and Bordj Bou Arreridj. ***Cryptosporidium*** research has been achieved using the conventional staining methods (Ritchie simplified by Allen and Redly, associated with modified Ziehl Neelsen staining) and molecular tools (nested PCR and sequencing).

At the equine population, the study showed a prevalence of **6.02 %** by microscopic examination and **2.70 %** by PCR reaction. At horses, ***Cryptosporidium spp*** was isolated with an infestation rate of **7.28 %** by Ziehl Neelsen staining and **2.52 %** by nested PCR. Respectively, both techniques revealed a prevalence of **2.41 %** and **3.22 %** in donkeys. Foals less than two years of age were infected with a rate of **9.6 %** by microscopic observation and **2.4%** by PCR amplification. Adult's horses showed a prevalence of **6.03 %** and **2.58 %** by both techniques. One young donkey aged less than two years was found to be positive by nested PCR and adults donkeys showed an infection rate of **2.63 %** by both used methods. In collective farms sampled at the province of Tiaret and capital Algiers, all positive horses were found in the stud of Tiaret. The infections were not associated with diarrhoea.

Four species, ***C. parvum***, ***C. muris***, ***C. hominis*** and ***C. erinacei*** have been identified in horses and in donkeys for the first two species by amplification and sequencing of the **SSU rDNA** gene. The study of genetic variation within the identified species of ***Cryptosporidium*** by amplification and sequencing of the **Gp60** gene showed the presence of **IIaA16G1R1** ***C. parvum*** subtype, a new subtype **(IkA15G1)** of ***C. hominis*** and **XIIIa A22R9** of ***C. erinacei*** (previously known as **hedgehog genotype**).This study reports, for the first time, the prevalence of ***Cryptosporidium spp*** in horses and donkeys from Algeria and the first occurrence of ***C. erinacei***, ***C. hominis*** and ***C. muris*** in equids.

Keywords: ***Cryptosporidium spp***, prevalence, nested PCR, sequencing, SSU, Gp60, horses, donkeys.

الملخص

تبعا لدراسة تخص المرض الطفيلي (cryptosporidiose) عند الخيول و الحمير قمنا بأخذ 481 عينة من براز هذه الحيوانات في مركز تربية الخيول بولاية تيارت ،بعض مراكز الفروسية بولاية الجزائر،و العديد من المناطق الريفية بولايتي سطيف و برج بوعريريج .تم الكشف عن هدا الطفيلي بواسطة تقنية تلوين خاصة و تقنيات البيولوجيا الجزيئية.

النسبة العامة للعينات الايجابية كانت % 02،6 بواسطة الفحص المجهري و % 70،2 بواسطة تقنيات البيولوجيا الجزيئية. هذا الطفيلي تم عزله عند الأحصنة بنسبة% 7،28 بواسطة الفحص المجهري و % 2،52 بواسطة تقنيات البيولوجيا الجزيئية. عند الحمير نسبة العزل بواسطة التقنيتين السابقتين كانتا على التوالي % 2،41 و % 3،22. عند المهور أقل من سنتين تم عزل الطفيلي بنسبتي % 60،9 و % 40،2 بواسطة التقنيتين السابقتين على التوالي. عند الأحصنة البالغة نسبة العثور على الطفيلي قدرت ب :

% 03،6 و % 2،58 على التوالي،تم ايجاد هذا الطفيلي عند حمار لم يبلغ سنتين من العمر بواسطة تقنيات البيولوجيا الجزيئية فقط و أما الأحمرة البالغة فقد قدرت نسبة العزل عندها ب % 2،63 بواسطة التقنيتين معا.

كل الخيول الحاملة للطفيلي وجدت بمركز تربية الخيول بولاية تيارت،تجدر الاشارة الى أن الخيول و الأحمرة الحاملة للطفيلي لم تظهر الاسهال.

تم التعرف على أربعة أنواع من طفيلي الكريبتوسبوريديا عند الخيول و الأحمرة بواسطة دراسة الحمض النووي للمورثة SSU . دراسة الحمض النووي للمورثة GP60 سمحت بتحديد تغيرات جينية في وسط الأنواع المكتشفة.هذه الدراسة تناولت للمرة الأولى تواجد هذا المرض و تحديد نسبته عند الخيول و الأحمرة في الجزائر و تواجد الأنواع التالية من هذا الطفيلي : ***C. muris C.hominis C.erinacei*** عند الخيول.

كلمات المفتاح : الكريبتوسبوريديا،نسبة، تقنيات البيولوجيا الجزيئية، المورثة SSU، المورثة GP60،أحصنة،حمير .