

République Algérienne
Démocratique et Populaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement
Supérieur et la Recherche
Scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat es sciences

En sciences vétérinaires.



Thème :

**Prévalence et caractérisation moléculaire des infections à
Cryptosporidium spp. chez les poissons d'élevage dans le centre et
l'Est de l'Algérie.**

	Nom & Prénom	Grade	Institution
Présidente	AIT-LOUDHIA. KH.	Professeur	E.N.S.V.
Directeur de thèse	BAROUDI. D.	M.C.A.	E.N.S.V.
Co-directeur de thèse	LAATAMNA. A.K.	Professeur	Univ. / Djelfa
Examinatrice 1	RIGHI. S.	M.C.A.	I.S.V./El-Tarf
Examineur 2	ZIAM. H.	M.C.A.	I.S.V./Blida
Examinatrice 3	AISSI. M.	Professeur	E.N.S.V.
Examineur 4	MOKRANI. D.	M.C.A.	I.S.V./Blida
Invité	TSAOUSIS. A.	Professeur	Univ. / Kent, U.K.

Réalisé par : REGHAISSIA Nassiba

Date de soutenance : 16.06.2022

Dédicace

Je remercie DIEU pour m'avoir donné la force d'aller jusqu'au bout dans ce travail.

Je dédie cette étude à :

- Mon cher père et ma chère mère,
Qui m'encouragent toujours à avancer si loin dans mes études, j'espère que vous êtes fiers de moi.

Que Dieu vous préserve la santé et vous protège de tout mal

- Mes chères sœurs et mon cher frère,
Aucun dédicace ne saurait exprimer mes sentiments que dieu vous préserve et vous procure santé et longue vie

- Tous ceux qui m'ont connu et aider à la réalisation de ce travail,

- Tous ceux ou celles qui me sont chers et que j'ai omis involontairement de citer...



REGHAISSIA Nassiba.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier « DIEU le tout puissant et miséricordieux » qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce travail.

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de cette these et en particulier

- *Mes chers promoteurs **Docteur BAROUDI Djamel** et **Professeur Laatamna Abdelkarim**, pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour tout le temps qu'ils m'ont consacré.*
- *Je remercie vivement la présidente du jury **Professeure AIT-OUDHIA KHatima** et les examinateurs **Dr. ZIAM Houcine**, **Dr. RIGHI Souad**, **Dr. MOKRANI Djamel** et **Pr. AISSI Miriam** ; qui me font l'honneur de participer et d'avoir acceptés d'examiner ce travail. je les remercie par avance pour tous les conseils qu'ils m'apporteront.*
- *Je remercie très sincèrement le personnel de la direction de la peche et des ressources halieutiques de la wilaya de Guelma, le personnel de la poissonnerie d'Alger ainsi que les pecheurs (**Mr Nabil Aouissi** et ses assistants); pour m'avoir aidé tout au long de l'étude pratique ; et particulièrement un grand merci à monsieur **BERIMA Rabeh**.*

*Un grand merci à l'equipe de laboratoire de recherche de parasitologie moleculaire de l'université de Kent en **Roayaum Unie**, **Pr Anastasios TSAOUSIS** d'avoir accepté la collaboration pour realiser ce travail ainsi de le financer, et **Melle MAXUMHUD Sadia** pour ses efforts enormes et tout le temps consacré pour achever la présente etude.*

Thank you 

REGHAISSIA Nassiba.

Liste des abréviations

AEA : Alimentation en eau d'agriculture

AEI : Alimentation en eau d'industrie

AEP : Alimentation en eau potable

bp: Base pair

CIAP1: cellular inhibitor of apoptosis protein-1

CIAP2: cellular inhibitor of apoptosis protein-2

COWP: *Cryptosporidium* oocyst wall protein

CP47 : 47 kDa protein

CP500: 500 kDa protein

DMSO: Dimethylsulfoxyde

DNAsp : DNA sequence polymorphism

Gp15/40/60: Glycoprotéine de surface 15/40/60.

Gp900: Glycoprotéine de surface 900

IAPS : Inhibitor of apoptosis

ICZN : International Code of Zoological Nomenclature

MLFT: multi-locus fragment typing

MLST : MultiLocus sequencing typing

NFKB : nuclear factor-kappa B

NGS : Next generation sequencing

PCR: Polymerase chain reaction

qPCR : Quantitative PCR (real-time PCR)

SCID: Severe combined immunodeficiency

SNP: Single nucleotide polymorphism

SSU : Small subunit

rDNA: Ribosomal deoxyribonucleic acid

RFLP: Restriction fragment length polymorphism

rRNA: Ribosomal ribonucleic acid

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

WGS: Whole genome sequencing

XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein

Liste des tableaux

Tableau 1 : Position taxonomique du genre <i>Cryptosporidium</i>	20
Tableau 2 : Différents stades évolutifs de <i>Cryptosporidium</i> spp	27
Tableau 3 : Taille et site d'infection de certaines espèces et génotypes de <i>Cryptosporidium</i> chez les poissons	30
Tableau 4: Différentes espèces de <i>Cryptosporidium</i> spécifiques aux poissons et leurs hôtes.	34
Tableau 5 : Génotypes de <i>Cryptosporidium</i> isolés chez différentes espèces des poissons.....	36
Tableau 6: Sous-types de <i>C. parvum</i> et <i>C.hominis</i> identifiés chez les poissons.....	38
Tableau 7: Prévalence des espèces de <i>Cryptosporidium</i> chez les poissons dans le monde....	43
Tableau 8: Caractéristiques des barrages étudiés (dirigés par la DPRH du Guelma).....	68
Tableau 9: Distribution des échantillons prélevés dans les sites d'étude en fonction de la période, des espèces de poissons et de la nature des prélèvements.....	73
Tableau 10 : Caractéristiques générales des poissons adultes prélevés	74
Tableau 11: Différents caractères liés aux poissons prélevés dans cette étude	75
Tableau 12 : Nombre des échantillons prélevés en fonction de l'espèce du poisson	76
Tableau 13 : Nombre d'échantillons positifs en fonction de la nature de prélèvement.....	92
Tableau 14 : Classement des poissons selon la taille (Longueur-poids) en utilisant le test de clustering K-means.....	93
Tableau 15: Facteurs de risque associés à l'infection par <i>Cryptosporidium</i> spp. dans ce travail.....	96
Tableau 16: Analyse de la régression logistique multivariée des facteurs du risque liés à l'infection par <i>Cryptosporidium</i> spp.	100
Tableau 17: Espèces de <i>Cryptosporidium</i> identifiées au locus 18s.	104
Tableau 18: Identité de <i>C. parvum</i> isolée chez les espèces des poissons infectés	105
Tableau 19: Sous-types de <i>C. parvum</i> identifiée chez les poisson	110
Tableau 20 : Comparaison entre les séquences obtenues et les séquences de référence	111

Liste des figures

Figure 1: Cycle de vie du *Cryptosporidium* spp..... 24

Figure 2 : Représentation schématique du cycle de vie de l'espèce *C. parvum*..... 26

Figure 3 : Les étapes et les interactions les plus importantes de la réponse immunitaire acquise contre l'infection à *Cryptosporidium*..... 48

Figure 4 : Oocystes de *Cryptosporidium* observés au microscope en utilisant différentes méthodes de coloration..... 53

Figure 5: Différentes espèces marines vendues au niveau du point de vente étudié. 66

Figure 6: Barrage de Hammem Dbagh..... 67

Figure 7: Barrage de Beni Haroun (Mila). 69

Figure 8 : Localisation de la zone d'étude. 70

Figure 9: pêche des poissons en utilisant le filet maillant au niveau du barrage de hammam Dbagh 71

Figure 10 : Quelques espèces de poissons prélevées durant cette étude 72

Figure 11 : Prélèvements de poissons après éviscération 76

Figure 12 : Homogénéisation des échantillons et préparation du lysat..... 78

Figure 13 : Différentes étapes de la liaison d'ADN extrait par la colonne de rotation. 79

Figure 14: Etapes de lavage et élution d'ADN extrait et concentration d'ADN..... 80

Figure 15 : Stocke de 10uM des amorces principales 81

Figure 16 : Préparation de la PCR primaire 82

Figure 17: Programmation du thermocycleur pendant la PCR secondaire 83

Figure 18: Électrophorèse sur gel d'agarose..... 85

Figure 19: Transluminateur des UV utilisé lors du découpage des fragments du gel d'agarose positifs 86

Figure 20 : Nested PCR de *Cryptosporidium* spp. chez les poissons 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. 90

Figure 21: Bandes faibles d'ADN de nested PCR de *Cryptosporidium* spp. chez les poissons. 90

Figure 22 : Taux d'infection global de *Cryptosporidium* spp. chez les poissons par nested PCR. 92

Figure 23 : Classification des poissons selon la taille (poids-longueur) par le test statistique 'clustering K-means' 94

Figure 24 : Prévalence de l’infection par *Cryptosporidium* spp. en fonction de la taille (poids-longueur) des poissons étudiés 97

Figure 25 : Prévalence de l’infection par *Cryptosporidium* spp. en fonction des espèces de poissons étudiées 97

Figure 26 : Prévalence de l’infection par *Cryptosporidium* spp. en fonction de l’habitat des poissons étudiés..... 98

Figure 27 : Prévalence de l’infection par *Cryptosporidium* spp. chez les poissons étudiés en fonction de la saison..... 98

Figure 28: Prévalence de l’infection par *Cryptosporidium* spp. chez les poissons étudiés en fonction de la région étudiée.....98

Figure 29 : Prévalence de l’infection par *Cryptosporidium* spp. chez les poissons en fonction du système d’élevage.. 99

Figure 30: Séquençage de l’AND positif par l’intermédiaire de **ABI’s 3730xl DNA** analyzers et la lecture de la séquence par le programme **ChromasPro**. 102

Figure 31: Séquence finale d’un cas positif, obtenue après l’analyse de la séquence Initiale par des programmes bio-informatiques et déposée dans la base des données génétiques 103

Figure 32 : Analyse BLAST de la séquence du gène SSU de l’échantillon 14.17 et la comparaison avec la séquence de référence de **GenBank**..... 105

Figure 33 : Analyse BLAST de la séquence du gène SSU de l’échantillon 26SPA et comparaison avec la séquence de référence de **GenBank**..... 106

Figure 34 : Analyse BLAST de la séquence du gène SSU de l’échantillon 14.11 et comparaison avec la séquence c de référence de **GenBank** 107

Figure 35 : Analyse BLAST de la séquence du gène SSU de l’échantillon 82car et comparaison avec la séquence de référence de **GenBank**..... 108

Figure 36 : Analyse des produits du gène GP60 de *Cryptosporidium* à partir de la PCR nichée des échantillons 26spa et 14.17 en utilisant le programme **BioEdit**. 109

Figure 37: Analyse du produit du gène GP60 de *Cryptosporidium* à partir de la PCR nichée de l’échantillon 82car en utilisant le programme **BioEdit** 110

Figure 38 : Analyse BLAST des produits du gène Gp60 de *C. parvum* à partir de la PCR nichée de l’échantillon 26spa et comparée à la séquence partielle du gène Gp60 de subtype **IaA16G2R1** de **GenBank**..... 112

Figure 39 : Analyse BLAST des produits du gène Gp60 de *C. parvum* à partir de la PCR nichée de l’échantillon 14.17 et comparée à la séquence partielle du gène Gp60 de subtype **IaA17G2R1** de **GenBank**..... 113

Figure 40 : Analyse BLAST des produits du gène Gp60 de *C. parvum* à partir de la PCR nichée de l'échantillon 82.car et comparée à la séquence partielle du gène Gp60 de subtype **IlaA13G2R1** de **GenBank**..... 114

Figure 41 : Distribution des soustypes identifiés dans la présente étude..... 115

Plan de travail

Introduction 16

1 . Définition et Importance 17

 1.1 Définition..... 17

 1.2 Importance 17

2 Historique 18

3 Position taxonomique..... 20

 3.1 Genre 20

 3.2 Espèce..... 21

 3.3 Génotypes et sous-types 21

 3.4 Génétique de population 22

4 Biologie du parasite..... 22

 4.1 Cycle biologique et morphologie 22

 4.1.1 Phase exogène 23

 4.1.2 Phase endogène 24

 4.2 Particularités des espèces chez les poissons 29

5 Epidémiologie de la cryptosporidiose..... 31

 5.1 Espèces affectées et hôtes réservoirs 31

 5.1.1 Espèces de *Cryptosporidium* chez les animaux 31

 5.1.2 Espèces de *Cryptosporidium* chez les poissons 32

 5.1.3 Sous-types de *Cryptosporidium* spp chez les poissons 37

 5.2 Transmission..... 39

 5.2.1 Rôle du poisson dans la transmission de cryptosporidiose 40

 5.3 Prévalences et facteurs de risque 41

 5.3.1 Cryptosporidiose animale..... 41

 5.3.1.1 Prévalence 41

 5.3.1.2 Facteurs de risque 42

 5.3.2 Cryptosporidiose des poissons 42

 5.3.2.1 Prévalence 42

 5.3.2.2 Facteurs de risque 44

 5.4 Pathogénie et réponse immunitaire..... 45

 5.4.1 Facteurs de virulence..... 46

 5.4.2 Réponse immunitaire à l’infection par *Cryptosporidium*..... 47

 5.4.2.1 Réponse immunitaire innée 47

 5.4.2.2 Réponse immunitaire acquise 49

 5.5 Signes cliniques et lésions 50

 5.5.1 Cryptosporidiose animale..... 50

5.5.1.1	Signes cliniques	50
5.5.1.2	Lésions	51
5.5.2	Cryptosporidiose du poisson	51
6	Diagnostic.....	52
6.1	Diagnostic microscopique	52
6.2	Diagnostic immunologique.....	54
6.3	Cytométrie de flux	54
6.4	Diagnostic moléculaire	54
6.4.1	Génotypage.....	55
6.4.1.1	PCR standard et nichée	55
6.4.1.2	PCR-RFLP	56
6.4.1.3	PCR en temps réel.....	56
6.4.1.4	Séquençage d'ADN des produits de PCR	56
6.4.2	Sous typage et génétique des populations	57
6.4.2.1	Sous typage de gp60	57
7	Traitement	58
8	Prophylaxie.....	59
Partie expérimentale		
I.	Cadre et objectifs	63
II.1	Présentation de la zone d'étude	65
II.2	Plan d'échantillonnage et prélèvements.....	71
II.2.1	Description des poissons prélevés	74
II.2.2	Nature et préparation des prélèvements.....	75
II.3	Techniques d'analyse des prélèvements.....	76
II.3.1	Méthodes moléculaires	76
II.3.1.1	Extraction d'ADN.....	76
II.3.1.2	Amplification de l'ADN par PCR.....	80
II.3.1.3	Electrophorese sur gel d'agarose.....	83
II.3.1.4	Purification de l'ADN des produits de la PCR nichée	85
II.3.1.5	Amplification du gène gp60 (glycoprotéine de surface 60)	87
II.3.1.6	Sequençage et analyses des séquences	87
II.4	Analyses statistiques.....	88
III.	Résultats	90
III.1	Lecture sur gel d'electrophorese	90
III.2	Détection de <i>Cryptosporidium</i> spp. par PCR	
III.2.1.	Prévalence globale.....	91
III.2.2	Etude de la prévalence en fonction des facteurs de risque	93
III.2.2.1	Etude de regroupement des poissons prélevés	93

III.2.2.2 Analyses univariées 94

III.2.2.3 Analyse de régression logistique multivariée..... 99

III.3 Genotype 101

III.3.1 Séquençage de l'ADN positif et obtention des séquences nucléotidiques 101

III.3.4 Espèces de *Cryptosporidium* identifiées chez les poissons 103

 III.3.4.1 Comparaison entre les séquences obtenues et les séquences de référence... 104

III.3.5 Détermination des sous-type des espèces de *Cryptosporidium* identifiés 109

III.3.6 Comparaison entre les séquences obtenues et les séquences de référence..... 110

IV. Discussion..... 116

IV.1 Prévalence globale du *Cryptosporidium* spp. 116

IV.2 Facteurs de risque..... 116

 IV.2.1 Taux d'infection par *Cryptosporidium* spp. en fonction d'espèce des poissons . 116

 IV.2.3 Taux d'infection par *Cryptosporidium* spp. en fonction de l'habitat des poissons
..... 119

 IV.2.4 Taux d'infection par *Cryptosporidium* spp.en fonction de la taille des poissons 121

 IV.2.6 Taux d'infection par *Cryptosporidium* spp. en fonction de la saison..... 124

 IV.2.7 Taux d'infection par *Cryptosporidium* spp. en fonction de type d'élevage des
poissons 125

 IV.2.8 Taux d'infection par *Cryptosporidium* spp. en fonction du sexe des poissons ... 126

IV.3 Caractérisation moléculaire..... 126

 IV.3.1 Espèces de *Crptosporidium* identifiées..... 126

 IV.3.2 Sous-types obtenus..... 129

IV.4 Evalaution du risque zoonotique chez les poissons..... 132

IV. Conclusion et perspectives..... 136

Références

Annexes

Resumé

La présente étude visait à estimer la prévalence et la caractérisation moléculaire de *Cryptosporidium* spp. chez six différentes espèces de poissons des milieux marins et d'eau douce. Au cours d'une période qui s'étale sur deux ans (2018-2020), un total de 415 échantillons fécaux et 565 raclages intestinaux ont été effectués, dans sept wilayatess du centre et de l'est de l'Algérie. Parmi ceux-ci, 860 poissons appartenaient à six espèces de poissons différentes, dont deux sont des poissons marins d'élevage et quatre sont des poissons d'eau douce sauvages. Tous les échantillons ont été testés pour la présence de *Cryptosporidium* spp. Pour cela, une approche de **PCR-nichée** a été réalisée pour amplifier des séquences partielles des gènes de la petite sous-unité de l'ARN ribosomique (ARNr 18S) et le gène de la glycoprotéine de 60 kDa (gp60) pour le génotypage et le sous-typage de *Cryptosporidium*. En effet, l'amplification du gène 18s a été effectuée suite à l'utilisation de **deux types des amorces** spécifiques au *Cryptosporidium* spp. Une analyse statistique détaillée a été effectuée pour évaluer la variation de la prévalence de l'infection à *Cryptosporidium* en fonction de différents facteurs de risque. L'analyse par **PCR-nichée** du gène 18S a révélé 173 poissons positifs au *Cryptosporidium*, ce qui donne une prévalence globale de **20,11 %** (17,5-23,0). *Cryptosporidium* spp. a été détecté chez 8,93 % (42/470) des poissons marins d'élevage et 33,58% (131/390) des poissons sauvages d'eau douce. Dans l'ensemble, la prévalence était affectée par tous les facteurs de risque étudiés, à l'exception du sexe. La caractérisation moléculaire et le sous-typage des isolats de *Cryptosporidium* ont montré la présence des sous-types zoonotiques **IIaA16G2R1** et **IIaA17G2R1** de *C. parvum* chez l'espèce de poisson *Sparus aurata* et le sous-type **IIaA13G2R1** de *C. parvum* chez l'espèce *Carassius carassius*. La présente étude fournit les premières données sur la prévalence et les facteurs de risque associés de *Cryptosporidium* chez les poissons marins et sauvages d'eau douce d'élevage en Algérie (Afrique du Nord). . Les données moléculaires révèlent la présence de soustypes zoonotiques de *C. parvum* chez ces poissons.

Mots clés : Prévalence, Facteurs de risque, Caractérisation moléculaire, *Cryptosporidium* spp., Poissons, Algérie,

Abstract

The present study aimed to estimate the prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* spp. in six different fish species both from marine and freshwater environments. During a period of two years (2018-2020), a total of 415 fecal samples and 565 intestinal scrapings were collected in seven provinces from the central and eastern Algeria. From those, 860 fish belonged to six different fish species, two of which are cultured marine and four are wild freshwater fish. All samples were screened for *Cryptosporidium* spp. presence using molecular techniques. **Nested PCR** approach was performed to amplify partial sequences of the small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) and 60-kDa glycoprotein (gp60) genes for *Cryptosporidium* genotyping and subtyping. Indeed, the amplification of the gene SSU was carried out by the use of **two types of primers**, which are specific to *Cryptosporidium* sp. Detailed statistical analysis was performed to assess the prevalence variation of *Cryptosporidium* infection according to different risk factors.

Nested PCR analysis of SSU gene revealed 173 *Cryptosporidium* positive fish, giving an overall prevalence of **20.11%** (17.5-23.0). *Cryptosporidium* spp. was detected in 8.93% (42/470) of cultured fish and 33.58% (131/390) in wild freshwater fish. Overall, the prevalence was affected by all studied risk factors, except the gender. Molecular Characterisation and subtyping of *Cryptosporidium* isolates showed occurrence of **IIaA16G2R1** and **IIaA17G2R1** subtypes of *C. parvum* in the fish species *Sparus aurata*, and the **IIaA13G2R1** subtype of *C. parvum* in the fish species *Carassius carassius*. The present study provides the first epidemiological data on the prevalence and associated risk factors of *Cryptosporidium* spp. in farmed marine and wild freshwater fish and the first molecular data on the occurrence of zoonotic *C. parvum* in fish from North Africa (Algeria).

Keywords: Algérie, *Cryptosporidium* spp, Fish, Molecular characterisation, Prevalence.

ملخص

هدفت الدراسة الحاليه إلى تقدير مدى انتشار طفيليات الكريبتوسبورديوم وايضا التوصيف الجزيئي لها في سته أنواع من الاسماك البحريه واسماك المياه العذبه. خلال الفتره الممتدة مابين (2018-2020) تم جمع 415 عينه براز و 565 كشط معوي في سبع ولايات من وسط وشرق الجزائر. من بين هذه العينات 860 سمكه تنتمي إلى سته أنواع مختلفه من السمك، كل العينات تم فحصها من أجل البحث عن وجود أصناف. اثنان منها مستزرعه في البحر واربعه منها في المياه العذبه من أجل تضخيم التسلسل الطفيلي كريبتوسبورديوم، باستخدام تقنيات البحث الجزيئية. تم الفحص باستعمال تقنيه ال PCR المتداخل الجزيئي للوحده الفرعيه الصغيره للحمض النووي الريبي المنقوص الأوكسجين الريبوزومي جينات البروتين السكري 60 كيلودالتون للتميط الجيني و الفرعي للكريبتوسبورديوم. الواقع التتميط الجيني تم اجراؤه باستعمال نوعين مختلفين من البادئات الخاصه باصناف الكريبتوسبورديوم. اضافه الى ذلك تم اجراء تحليل احصاء مفصل للتقييم تباين كشف التحليل المتداخل لمورثه الحمض النووي الريبي. انتشار عدوى كريبتوسبورديوم وفقا لعوامل الخطر المختلفه المنقوص الاكسجين عن وجود 173 سمكه ايجابيه لعدوى الكريبتوسبورديوم مما يعطي انتشار اجمالي بنسبه 20.11 بالمئه. تم اكتشاف وجود الطفيلي المدروس بنسبه 8,93 بالمئه في مياه البحر وبنسبه 33,85 بالمئه في اسماك المياه العذبه. بشكل عام تاتر انتشار العدوى بطفيليات الكريبتوسبورديوم بجميع عوامل خطر المدروسه باستثناء جنس السمكه. الدراسه التتميطيه اظهرت وجود الانواع الفرعي

IIaA17G2R و IIaA16G2R للصنف كريبتوسبورديوم بارفوم في النوع السمك الابراميس. والنوع الفرعي

IIaA13G2R1 من الكريبتوسبورديوم بارفوم في سمكه الكارب البروسي

توفر الدراسه الحاليه الحاله البيانيه الاولى عن انتشار طفيليات الكريبتوسبورديوم وعوامل الخطر المرتبطه به في اسماك المياه العذبه الغير مستزرعه والاسماك البحريه المستزرعه وايضا البيانات الجزيئيه الاولى في حدوث العدوى بمصدر الامراض الحيوانيه المتنقله للانسان (كريبتوسبورديوم بارفوم) في الاسماك في الجزائر

الكلمات المفتاحيه: الاسماك، الانتشار، التوصيف الجزيئي، الجزائر، الكريبتوسبورديوم

— { **Introduction** } —

Introduction

Les protozoaires du genre *Cryptosporidium* sont des parasites apicomplexa qui infectent principalement le tube digestif des humains et un large éventail d'hôtes animaux domestiques et sauvages, y compris les mammifères, les oiseaux, les poissons, les reptiles et les amphibiens (Fayer, 2010; Ryan *et al.*, 2016). La cryptosporidiose est une maladie zoonotique d'origine hydrique c'est la principale cause des diarrhées chez les humains, principalement les jeunes enfants et les individus immunodéprimés, et chez les jeunes animaux d'élevage, en particulier les ruminants nouveau-nés, entraînant des pertes économiques importantes (Santín, 2013 ; Ryan *et al.*, 2014 ; Checkley *et al.*, 2015). Ces pertes sont représentées par des taux élevés de morbidité et mortalité dans les élevages des poissons (Murphy *et al.*, 2009).

Le poisson est un animal aquatique est utilisé comme étant source d'alimentation et de revenu et aussi un contrôleur des maladies hydriques. En revanche l'eau est utilisée pour assurer plusieurs activités dans la vie (loisirs, agglomération en alimentation et industrielle...) ce qui augmente les chances de contact entre les parasites hydriques et leurs hôtes. De plus, l'acquisition du parasite (*Cryptosporidium*) à partir de l'eau est décrite dans la littérature (Ryan *et al.*, 2004 ; Zahedi et Ryan, 2020), mais ce qui n'est pas clair c'est le rôle des poissons dans la transmission des espèces du *Cryptosporidium* à l'homme que ce soit directement ou indirectement.

Selon des données morphologiques, biologiques et génétiques, au moins 46 espèces sont valides, dont 30 espèces chez les mammifères, 6 chez les oiseaux, 5 chez les poissons, 4 chez les reptiles et une chez les amphibiens, et plus de 120 génotypes sont reconnus au sein du genre *Cryptosporidium* (Zahedi et Ryan, 2020 ; Prediger *et al.*, 2021 ; Ryan *et al.*, 2021). Parmi les espèces valides, *C. hominis*, *C. parvum* et *C. meleagridis* sont responsables de la plupart des infections humaines dans le monde (Xiao, 2010). *C. molnari*, *C. scophthalmi*, *C. huwi* (anciennement connu sous le nom de Piscine génotype 1), *C. bollandi* (anciennement connu sous le nom de Piscine génotype 2) et *C. abrahamseni* (anciennement génotype 7) ont été reconnues comme des espèces spécifiques aux poissons (Alvarez-Pellitero et Sitjà-Bobadilla, 2002 ; Alvarez-Pellitero *et al.*, 2004 ; Ryan *et al.*, 2015 ; Bolland *et al.* 2020 ; Zahedi *et al.*, 2021). En outre, plus de 29 nouveaux génotypes spécifiques aux poissons ainsi que des espèces non spécifiques (*C. parvum*, *C. hominis*, *C. scrofarum* et *C. xiaoi*) et des génotypes associés aux rongeurs (rat génotype III) ont été isolés chez les poissons (voir Bolland *et al.* 2020 ; Golomazou et Karanis 2020).

Par rapport à notre compréhension de la cryptosporidiose chez l'homme, les ruminants et d'autres animaux, l'épidémiologie de la cryptosporidiose chez les poissons reste mal connue. L'infection à *Cryptosporidium* chez les différentes espèces de poissons, à la fois marines et d'eau douce, a été documentée en Australie (Reid *et al.*, 2010 ; Zanguee *et al.* 2010 ; Baragahare *et al.*, 2011; Morine *et al.*, 2012 ; Ryan *et al.*, 2015; Yang *et al.* 2015; Yang *et al.*, 2016 ; Papparini *et al.*, 2017; Bolland *et al.*, 2020 ; Zahedi *et al.*, 2021), Paupésie-Nouvelle-Guinée (Koinari *et al.* 2013), Europe incluant l'Espagne, Angleterre, France, République tchèque, Portugal et Pays-Bas) (Certad *et al.*, 2019 ; Couso-Pérez *et al.*, 2019 ; Couso-Pérez *et al.*, 2018 ; Certad *et al.*, 2015 ; Palenzuela *et al.*, 2010 ; Alvarez-Pellitero *et al.*, 2009 ; Saraiva *et al.*, 2009 ; Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2005 ; Álvarez-Pellitero *et al.*, 2004 ; Sitjà Bobadilla *et al.*, 2000), États-Unis (Murphy *et al.*, 2009), Asie (Vietnam, Iran) (Shahbazi *et al.*, 2020 ; Gibson-Kueh *et al.*, 2011) et finalement en Afrique incluant l'Égypte (Shaapan *et al.*, 2021). La prévalence varie considérablement d'une étude à l'autre et peut atteindre jusqu'à 100 % selon les espèces de poissons, les systèmes de pisciculture adoptés (pisciculture destinée à la consommation, poissons d'aquarium et poissons d'ornement) et les espèces et/ou génotypes de *Cryptosporidium* détectés. En revanche, des données limitées sont disponibles concernant la cryptosporidiose des poissons en Afrique, en particulier en Afrique du Nord incluant l'Algérie, qui occupent une grande partie du bassin méditerranéen au nord.

En Algérie, la caractérisation moléculaire de *Cryptosporidium* a été rapportée seulement chez les ruminants (Baroudi *et al.* 2017, 2018 ; Benhouda *et al.* 2017 ; Ouakli *et al.* 2018), le dromadaire (Baroudi *et al.* 2018), les oiseaux (Baroudi *et al.* 2013 ; Laatamna *et al.* 2017) et les équidés (Laatamna *et al.*, 2013 ; 2015).

Selon le plan algérien de développement de l'aquaculture (2015-2030), la consommation moyenne de poisson a augmenté jusqu'à 4,5 kg/citoyen ces dernières années (DGPA, 2018). Pour cette raison, près de 9,5 millions d'hectares de côtes ont été proposés à la pêche. De plus, les étendues des eaux naturelles et artificielles réparties sur tout le territoire national à valoriser par l'aquaculture sont estimées à 100 000 Ha. Ainsi, l'Algérie contient une importante réserve de biomasse d'espèces dites grands migrateurs halieutiques (MPRH, 2003). Face à ces défis en aquaculture, les maladies parasitaires des poissons en Algérie représentent une préoccupation majeure. Par conséquent, il est particulièrement intéressant de mener des études profondes sur les différentes maladies parasitaires chez les poissons marins et aquatiques. La présente étude a été menée pour évaluer la prévalence de *Cryptosporidium* spp. chez six espèces de poissons des milieux marins et d'eaux douces dans le centre et l'est de l'Algérie. De plus, la caractérisation moléculaire des isolats de *Cryptosporidium* a été réalisée

pour identifier les espèces/génotypes et sous-types infectants, et afin d'évaluer leur potentiel zoonotique.

Partie Bibliographique

1 . Définition et Importance

1.1 Définition

La cryptosporidiose est une maladie parasitaire zoonotique, qui touche une large variété des animaux domestiques et sauvages (mammifères, reptiles, oiseaux, amphibiens et poissons) (Ryan *et al.*, 2014 ; Certad *et al.*, 2015 ; Ryan et Hijjawi 2015 ; Certad *et al.*, 2019). Elle cause des infections intestinales chez les humains et les animaux, se traduisant principalement par un syndrome gastro-intestinal (une légère à une sévère diarrhée) (Bamaiyi et Redhuan 2017). Elle a un impact économique important chez les jeunes animaux particulièrement les ruminants, en relation avec la morbidité et la mortalité engendrées durant la période néonatale. (Jittapalapong *et al.*, 2006). La cryptosporidiose est due à un protozoaire du genre *Cryptosporidium* appartenant à l'embranchement *Apicomplexa* (Koinari *et al.*, 2013 ; Couso-Pérez *et al.*, 2018). Ce genre renferme actuellement, au moins 46 espèces de qui sont reconnues sur la base de critères morphologiques, biologiques et moléculaires (Zahedi et Ryan, 2020). Trois espèces sont connues comme les plus impliquées dans les infections humaines incluant *C. parvum*, *C. hominis* et *C. meleagridis*. De plus, *C. parvum* représente l'espèce la plus fréquente chez les animaux où près de 155 espèces animales ont été signalées comme des hôtes pour ce protozoaire (Xiao et Ryan, 2004 ; Šlapeta, 2013). Ce parasite a un cycle de vie monoxène avec un stade résistant dans l'environnement (oocyste), qui peut être transmis directement entre les hôtes via la voie oro-fécale ou par l'ingestion d'eau et d'aliments contaminés par les oocystes (Fayer 2008).

1.2 Importance

La cryptosporidiose est mondialement classée en cinquième position parmi les 24 maladies importantes d'origine alimentaire, comme il est rapporté par le comité mixte d'experts de l'organisation d'alimentation et d'agriculture (FAO) et l'organisation mondiale de la santé (OMS) en 2012 (Ryan *et al.*, 2014 ; Ryan *et al.*, 2018). En effet, les différentes espèces de *Cryptosporidium*, après l'infection de leurs hôtes, peuvent engendrer des conséquences économiques importantes chez les jeunes animaux (De Graaf *et al.*, 2000). Chez l'homme, par exemple, le taux moyen des cas de cryptosporidiose déclarés en 2001 a été de 8,25% et 1,29% en Angleterre et en Allemagne, respectivement (Caccio et Chalmers, 2016). Environ de 27000 personnes en Suède sont touchées à la suite d'une épidémie d'origine hydrique. Elle s'agit de la deuxième cause mondiale d'épisodes diarrhéiques et de décès chez les enfants après le

rotavirus (20% dans les pays en développement, 9% dans les pays développés) (Striepen, 2013 ; Ryan et Hijjawi, 2015 ; Shrivastava *et al.*, 2017 ; Ryan *et al.*, 2018). En effet sur environ 8 millions de décès annuels d'enfants dans le monde (moins de 5 ans), la diarrhée est associée à 10.5% (Liu *et al.*, 2012 ; Kotloff *et al.*, 2013 ; Squire et Ryan, 2017). Aux États-Unis, chaque année, environ 748000 cas de cryptosporidiose sont déclarés et leur hospitalisation coûte environ 45,8 millions de dollars (Scallan *et al.*, 2011). En revanche, chez les animaux, *C. parvum* est considéré comme l'entéropathogène le plus fréquemment trouvé chez les veaux au cours de leurs premières semaines de vie (Feng *et al.*, 2018). Le parasite agit fréquemment seul, mais les pertes sont plus graves lorsque des infections concomitantes se produisent (De Graaf *et al.*, 2000). En Belgique, les pertes dues au syndrome de diarrhée néonatale ont été estimées de 5% à 10% (De Graaf *et al.*, 2000). La cryptosporidiose est apparue parfois par des signes respiratoires particulièrement chez la volaille (sponseller *et al.*, 2014), mais, généralement elle se manifeste par des signes digestifs modérés et/ou sévères, en affectant le taux de croissance. Chez les poissons, mauvaise qualité organoleptique du chair, un taux de morbidité élevé et de mortalité important dans les élevages peuvent être observés (Graaf *et al.*, 2000 ; Robertson et chalmers, 2013 ; Certad *et al.*, 2019). Ainsi, cette maladie entraîne autres pertes économiques liées principalement aux frais du traitement (administration des médicaments et fluidothérapie) et des mesures préventives (De Graaf *et al.*, 2000).

Les pertes économiques peuvent être liées aussi aux frais de restructuration des infrastructures sanitaires et à la désinfection des eaux potable. En effet, le coût de l'épidémie d'origine hydrique dans l'ouest de l'Irlande (2007) a été de 19 millions d'euros (Chyzheuskaya *et al.*, 2017).

2 Historique

Cryptosporidium a été décrit pour la première fois par Tyzzer en 1907 dans les glandes gastriques d'une souris (*Mus musculus*) en utilisant l'examen microscopique. Le parasite a été nommé *Cryptosporidium muris* (Tyzzer, 1907).

Ensuite, des nouveaux caractères biologiques et morphologiques de ce sporozoaire ont été établit en 1910; en effet, l'attachement aux cellules épithéliales gastriques de l'hôte par le biais d'une organelle spécialisée ainsi que des stades sexués et asexués ont été décrits chez ce parasite, en permettant la caractérisation d'un nouveau genre "*Cryptosporidium*" apparenté

aux coccidies (Tyzzer, 1910). Une autre espèce plus petite en taille dans l'intestin de la souris a été observée en 1912, qu'elle a été nommée *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer, 1912).

Par la suite, la dénomination de certaines espèces de *Cryptosporidium* a été faite selon la spécificité d'hôte ; comme les oocystes isolés dans les fèces des ovins et humains ont été nommés *C. agni* et *C. garnahmi* et *C. enteriditis* respectivement (Barker et Carbonell, 1974 ; Bird, 1981 ; 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 a 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.

3 Position taxonomique

3.1 Genre

Le genre *Cryptosporidium* est un parasite des Apicomplexa, il appartenait à l'ordre *Eucoccidiorida* (qui comprend *Toxoplasma*, *Cyclospora*, *Isospora* et *Sarcocystis*) (Levine, 1980). Les données génomiques et biochimiques indiquent que *Cryptosporidium* diffère des autres Apicomplexa en ce qu'il a perdu l'organite apicoplaste, ainsi que les génomes pour le plaste et la mitochondrie (Certad, 2008). En effet, Ces dernières années, des études ont rapporté que le genre *Cryptosporidium* partage des caractéristiques avec les coccidies et les grégarines (Robinson *et al.*, 2010). La stratégie de développement de *Cryptosporidium* et les grégarines est simple. Ils envahissent un seul type cellulaire (cellules épithéliales intestinales). En revanche, d'autres études placent le genre *Cryptosporidium* dans le groupe des coccidies, mais séparé des coccidies typiques, à la base du phylum des Apicomplexa (Kuo *et al.*, 2008). Sur le plan phylogénétique, d'autres auteurs insistent sur un rapport probablement très étroit du genre avec la branche des grégarines (Chacín-Bonilla, 2007).

La position systématique de *Cryptosporidium* au sein des protistes est décrite dans le tableau 1.

Tableau 1 : Position taxonomique du genre *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Current et Garcia, 1991; NCBI, 2008; Taxonomicon, 2008).

Classification	Caractéristiques biologiques
<i>Eukaryota</i>	Caractérisés principalement par des cellules possédant un noyau avec enveloppe nucléaire
<i>Alveolata</i>	Présence de vésicules sous membranaires (alvéoles)
<i>Apicomplexa</i>	Présence d'un complexe apical chez les formes invasives
<i>Coccidiasina</i>	Cycle biologique comprenant mérogonie, gamétogonie et sporogonie
<i>Eucoccidiorida</i>	Existence de mérogonie (Schizogonie)
<i>Eimeriorina</i>	Développement indépendant des macrogamontes et microgamontes
<i>Cryptosporidiidae</i>	Cycle biologique monoxène, oocystes contenant quatre sporozoïtes nus Développement sous la bordure en brosse des cellules épithéliales colonisées
<i>Cryptosporidium</i>	Un seul genre au sein de la famille, qui contient au moins 46 espèces valides

3.2 Espèce

L'identification et l'appellation des différentes espèces d'Apicomplexa est faite initialement sur la base de la spécificité d'hôte, la morphologie et l'emplacement des stades endogènes (Fayer, 2010). Cependant, l'identification des espèces du *Cryptosporidium* ne se base pas seulement sur ces critères. Les espèces du genre *Cryptosporidium* ont des oocystes de différentes tailles et de morphologie similaire. De plus, des études ont montré que des isolats provenant de différents animaux pouvaient parfois se transmettre d'une espèce hôte à une autre, ce qui indique l'absence de la spécificité d'hôte stricte des espèces de *Cryptosporidium*. Les raisons pour lesquelles l'utilisation de l'identification morphologique des espèces de *Cryptosporidium* est insuffisante (Benamrouz, 2014). Le développement des outils moléculaires comme la PCR "**Polymerase Chain Reaction**", la RFLP "**Restriction Fragment Length Polymorphisme**", le "**Multilocus genotyping**", associés au séquençage, a permis une classification plus claire pour les différentes espèces au sein de ce genre parasite. En effet, la validation d'une nouvelle espèce nécessite qu'il comprenne des données morphométriques, une caractérisation génétique (incluant une caractérisation multiloci lorsque cela est possible), l'identification des hôtes naturels et expérimentaux et le respect des règles de l'ICZN (International Code of Zoological Nomenclature) (Xiao *et al.*, 2004). En outre, l'ensemble des règles mentionnées dans l'ICZN peuvent rassembler dans :

- une description rigoureuse des oocystes et des autres stades de développement avec collection d'échantillons de tissus infectés adéquatement préservés,
- une caractérisation biologique,

un diagnostic différentiel étayé, si possible, par une caractérisation génétique suivi de l'enregistrement des séquences et du matériel pour d'autres caractérisations dans une institution académique (Fayer, 2010).

3.3 Génotypes et sous-types

Contrairement aux critères de classification des différentes espèces de *Cryptosporidium*, le taxon genotype est référé aux isolats de *Cryptosporidium* disposant des données génétiques seulement. Ces dernières années, l'appellation des différents génotypes est liée à leur spécificité d'hôte (Xiao *et al.*, 2004). En effet, la nomination d'un nouveau génotype en fonction de l'hôte duquel il a été isolé, après la comparaison de leurs séquences nucléotidiques par rapport aux celles déjà connues. Même si les différences génétiques retrouvées chez les différents génotypes de *Cryptosporidium* tendent à être corrélées avec des différences biologiques, le degré de divergence est variable. Certains ces génotypes ont été

reclassés comme des espèces différentes après avoir montré des différences biologiques et morphologiques avec les autres espèces connues. Par exemple, *C. canis* chez le chien (Fayer *et al.*, 2001), *C. hominis* chez l'homme (Ryan *et al.*, 2002), *C. suis* chez le porc (Ryan *et al.*, 2004) ou *C. ryanae* chez le bovin avant d'être élevé au rang d'espèces, étaient apparentées respectivement aux dog-génotype, hominis-génotype, suis-génotype et *Cryptosporidium* deer like-génotype (Fayer *et al.*, 2008).

3.4 Génétique de population

La stabilité des génotypes dans l'espace et dans le temps, est essentielle pour déterminer la fréquence des échanges génétiques au sein d'une population. *Cryptosporidium*, naturellement, peut présenter une structure génétique clonale ou panmictique qui se caractérisent respectivement par reproduction avec un faible taux de recombinaison génétique et par reproduction avec un fort taux d'échanges génétiques (Tibayrenc, 1995). Ces caractéristiques, mènent le clonage le choix idéal pour réaliser des études moléculaires épidémiologiques en identifiant des marqueurs épidémiologiques, ainsi que des marqueurs indirects de virulence, d'infectiosité, ou de résistance aux médicaments car les échanges génétiques sont rares ou absents, les lignées parasitaires évoluent indépendamment des unes des autres et se comportent comme des clones naturels (Tibayrenc, 1998).

La génétique des populations de *Cryptosporidium*, est réalisée par l'utilisation des marqueurs mini- et microsatellites pour déterminer, par analyse du déséquilibre de liaison, une structure génétique complexe parmi des populations de *Cryptosporidium* donnée (Mallon *et al.*, 2003a). Cette méthode permet l'identification de l'origine des isolats et les nouveaux types qui peuvent émerger comme le résultat d'une recombinaison sexuelle (Certade, 2008).

4 Biologie du parasite

4.1 Cycle biologique et morphologie

Cryptosporidium est un parasite intracellulaire mais il est extra-cytoplasmique, il occupe une vacuole parasitophore au niveau la cellule hôte après sa pénétration (Bones *et al.*, 2018). Il a un cycle de vie complexe et monoxène (un seul hôte) composé de plusieurs stades de développement (exogène et endogène) impliquant des cycles sexuels et asexués (Hijjawi, 2010 ; Bones *et al.*, 2018).

4.1.1 Phase exogène

Cette phase est caractérisée par l'élimination des oocystes de *Cryptosporidium* spp. dans le milieu extérieur, par l'hôte (figure 1). En effet, l'oocyste sporulé est la forme infectante de ce parasite. Ce stade est très important pour la dissémination, la survie et l'infectivité du parasite (Hijjawi, 2010).

Les oocystes sont des petits corps circulaires mesurant de 3 à 6 μm de diamètre. A l'intérieur de ceci se retrouvent quatre sporozoïtes mesurant 2 μm x 0,8 μm (Bones *et al.*, 2018). Les oocystes libérés peuvent contenir une paroi épaisse ou mince (Certad, 2008). En effet, un petit pourcentage (environ 20%) de l'une des formes de *Cryptosporidium* spp. à l'intérieur de l'hôte qui s'appelle zygote, ne forme pas une paroi épaisse d'oocystes à deux couches ; ils n'ont qu'une membrane unitaire entourant les quatre sporozoïtes. En revanche, les oocystes qui ont une paroi épaisse subissent une sporogonie pour former des oocystes sporulés (figure 2 (2k)) contenant quatre sporozoïtes. Les oocystes à parois minces (figure 2 (l)) représentent des formes de cycle de vie auto-infectieuses qui peuvent maintenir le parasite dans l'hôte sans exposition orale répétée aux oocystes à parois épaisses présents dans l'environnement (figure 2) (Hijjawi, 2010 ; Bouzid *et al.*, 2013). Les oocystes à paroi épaisses libérés dans les fèces, sont des formes de cycle de vie résistantes à l'environnement qui transmettent l'infection d'un hôte à un autre (figure 1). (Certad, 2008 ; Benazouz, 2015 ; Bones *et al.*, 2018).

Les oocystes sont sensible seulement à des températures élevées (71,7°C pendant 5 secondes) et à la dessiccation (Fayer *et al.*, 2000). Cependant, ils sont très résistants dans le milieu extérieur. Ils peuvent y survivre plusieurs mois et ils résistent également aux désinfectants chlorés utilisés pour le traitement de l'eau, l'utilisation de l'ozone et des radiations UV semble diminuer les risques de contamination des systèmes de distribution d'eau potable (Widmer et Sullivan, 2012). Les oocystes qui se retrouvent dans une température entre 0°C et 20°C sont infectieux jusqu'à 24 mois (Fayer *et al.*, 1998 ; Noordeen *et al.*, 2002). En effet, la résistance des oocystes dans le milieu extérieur est liée principalement à la structure de ces derniers. Ils sont caractérisés par la présence d'une structure de réseau complexe, une couche de glycocalyx de surface, glucides, acides gras et hydrocarbures aliphatiques, protéines hydrophobes et une couche interne de glycoprotéines qui les confèrent cette résistance naturelle. Entre autres, *Cryptosporidium* spp. possède un protéasome et une machinerie d'ubiquitine très actifs qui renforce la synthèse et la traduction des protéines. Cependant, *Cryptosporidium* spp. ne possède pas tous les gènes novo de synthèse des nutriments. La survie donc des oocystes face aux conditions d'environnement est probablement due à

l'utilisation de leurs réserves d'amylopectine ainsi, au recyclage des protéines (Bones *et al.*, 2018).

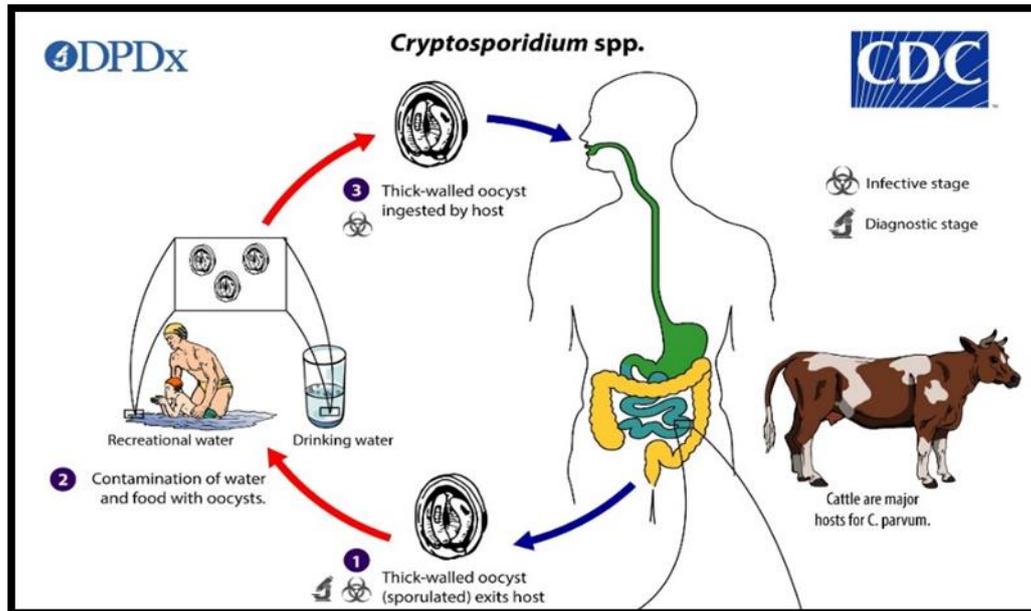


Figure 1: Cycle de vie du *Cryptosporidium* spp. (Phase exogène) (CDC, 2019).

4.1.2 Phase endogène

C'est la phase correspondante à l'entrer des oocystes chez l'hôte et leur développement jusqu'à l'obtention des nouveaux oocystes.

L'ingestion d'un oocyste provoque un processus appelé excystation, expansion d'une «suture» (ouverture dans la paroi de l'oocyste) et libération de quatre sporozoïtes mobiles (Bones *et al.*, 2018). Comme il est démontré dans la figure 2, les sporozoïtes se libèrent dans la lumière intestinale (a), où les infections sont principalement localisées dans le jéjunum et l'iléon. En effet, les sporozoïtes présentent une motilité glissante et ils pénètrent dans les cellules épithéliales par leur région apicale qui contient le complexe apical. Ils se logent par la suite dans des vacuoles parasitophores. Le parasite acquiert une position intracellulaire mais se maintient à hauteur de la bordure en brosse (Hijjawi, 2010 ; Benazouz, 2015 ; Bones *et al.*, 2018). Expérimentalement, l'attachement et l'invasion se produisent de préférence à 37 ° C et à un pH de 7,4 à 7,6 (Bones *et al.*, 2018).

L'invasion cellulaire par le sporozoïte (figure 2 (b)) est suivie d'un développement intracellulaire à un stade trophozoïte (figure 2 (c)) dans les vacuoles parasitophores qui sont confinées à la région microvilleuse de l'épithélium muqueux (Hijjawi, 2010 ; Bouzid *et al.*, 2013).

Morphologiquement, les sporozoïtes et les trophozoïtes se distinguent par la forme ronde et le noyau large du parasite (Bones *et al.*, 2018). Ensuite, ces derniers, subissent une prolifération asexuée pour produire deux types différents de mérozoïtes (figure 2, (d)). Les mérozoïtes libérés des mérozoïtes de type I (figure 2 (e)) pénètrent dans d'autres cellules épithéliales intestinales et se développent en mérozoïtes de type II (figure 2 (f)) ou achèvent un autre cycle de mérozoïtes de type I. Les mérozoïtes des mérozoïtes de type II se multiplient ensuite sexuellement pour produire des microgamontes (figure 2 (g)) et des macrogamontes (figure 2 (h)). Les microgamontes fertilisent les macrogamontes produisant des zygotes (figure 2 (i)), qui mûrissent en oocystes (figure 2 (j)) (Hijjawi, 2010 ; Bouzid *et al.*, 2013).

In vitro, le développement des trophozoïtes se produit après 24 heures d'infection, les mérozoïtes de type II apparaissant après 48 heures d'infection et les gamètes trouvés après 96 heures (Borowski *et al.*, 2010). Plusieurs études récentes ont suggéré que *Cryptosporidium* spp. pourrait y avoir un développement extracellulaire (Rosales *et al.*, 1993, Hijjawi *et al.*, 2002, Hijjawi *et al.*, 2004, Hijjawi *et al.*, 2010, Yang *et al.*, 2015, Aldeyarbi et Karanis, 2016a, Aldeyarbi et Karanis, 2016b, Aldeyarbi et Karanis, 2016c), et que les stades sexuels peuvent se diviser par fission binaire (Borowski *et al.*, 2010). Entre autres, certaines études montrent des stades présentant peu de similitudes structurelles et ils ont été considérés comme une contamination (Woods et Upton, 2007), tandis que d'autres ont constaté des similitudes structurelles entre les "trophozoïtes" en culture sans cellule hôte et les "sporozoïtes" non viables (Petry *et al.*, 2009). La confirmation et/ou l'affirmation nécessite l'observation du développement de différentes formes du *Cryptosporidium* in vitro plus de deux semaines en utilisant des techniques de microscopie à plus haute résolution (Bones *et al.*, 2018).

La morphologie des différents stades du cycle de vie de *Cryptosporidium* est décrite dans le tableau 2.

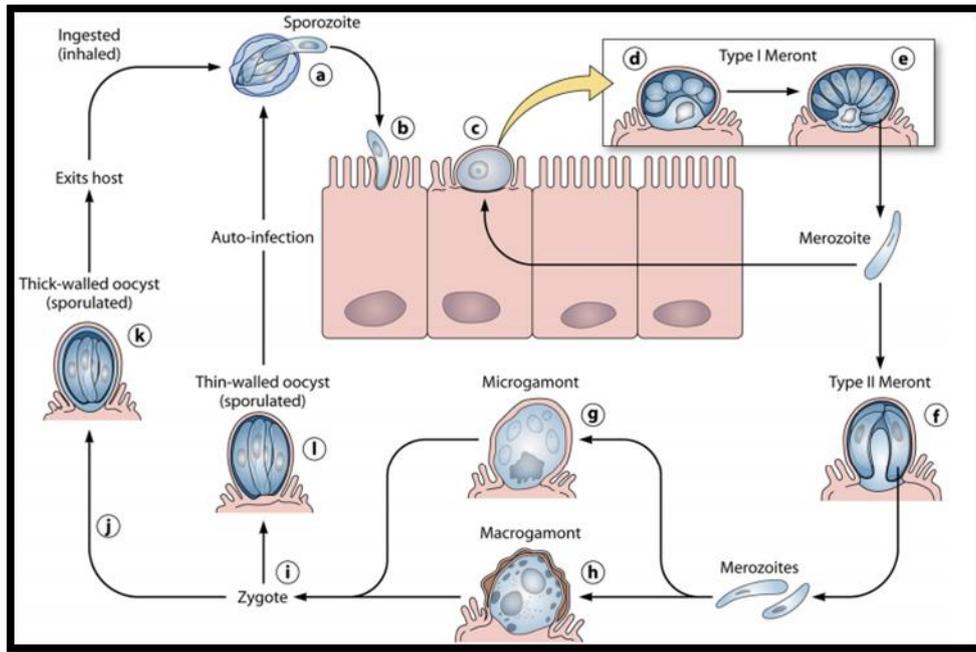
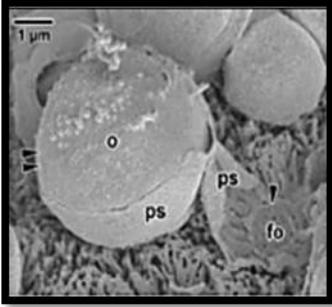
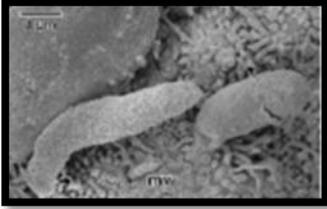
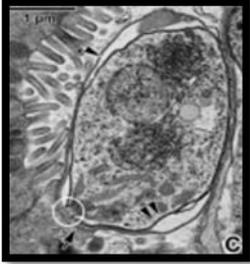
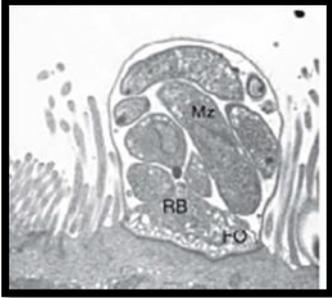
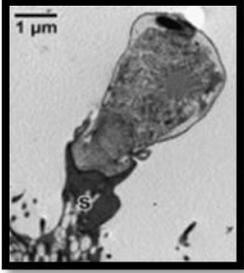
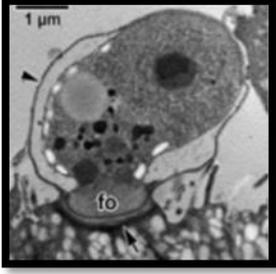
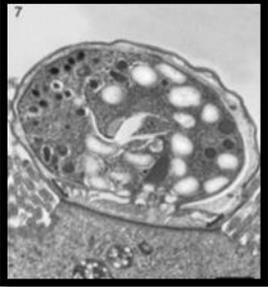


Figure 2 : Représentation schématique du cycle de vie de l'espèce *C. parvum*.
(Bouزيد *et al.*, 2013).

Tableau 2 : Différents stades évolutifs de *Cryptosporidium spp* (Certad, 2008; Valigurová *et al.*, 2008; Leitch et He, 2012).

Forme évolutive	Morphologie	Description
Oocyste	 <p>o: oocyste ps: vacuole parasitophore fo: organelle nourricier</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Forme sphérique à ovoïde. 2. La taille de l'oocyste varie entre 3 et 8 µm de diamètre, selon l'espèce. 3. Chaque oocyste contient quatre sporozoïtes nus sans sporocystes, et présente un corps résiduel granuleux central très réfringent. 4. sa paroi est composée de deux couches, interne et externe, bien distinctes. 5. A l'un de ses pôles, se situe une fente qui s'étend sur 1/3 à 1/2 de leur circonférence par laquelle sont libérés les sporozoïtes.
Sporozoïte et merozoïte	 <p>mv : microvillosités</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ils sont élancés, virguliformes. 2. Formes libres et mobiles. 3. Présence d'un complexe apical. 4. Les rhoptries, les micronèmes, les granules denses, le noyau, les ribosomes, les microtubules ainsi que les anneaux apicaux sont visibles par MET.
Trophozoïte		Trophozoïte mature et son organelle d'attachement ou nourricier.

<p>Méronte</p>	 <p>Mz: mérozoïte</p> <p>Rb: corps résiduel</p> <p>FO: organelle nourricier</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Méronte de type I contenant six à huit mérozoïtes. 2. La membrane cellulaire de la cellule hôte entourant le méronte se lyse et les mérozoïtes deviennent extracellulaires, capables d'infecter d'autres cellules hôtes pour produire de nouveaux mérontes type I ou peuvent évoluer vers des mérontes type II à quatre mérozoïtes.
<p>Microgamonte</p>		<ol style="list-style-type: none"> 2. Il a une forme en tige avec une extrémité antérieure aplatie.
<p>Macrogamonte</p>	 <p>fo: organelle nourricier</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Forme sphérique à ovoïde. Il présente en position centrale un grand noyau à nucléole proéminent. 2. Les microgamètes fécondent le macrogamète pour produire un zygote qui évolue en oocyste.
<p>Zygote</p>		<p>Un macrogamète fécondé, ou zygote, mûr mais toujours connecté via l'organelle nourricier à la cellule hôte.</p>

4.2 Particularités des espèces chez les poissons

Les espèces de *Cryptosporidium* qui infectent les poissons sont différentes au niveau ultrastructurel et développemental de celles qui infectent les mammifères et les oiseaux. En effet, la localisation de ces espèces peuvent être au niveau l'estomac ou/et les intestins. Les oocystes sont localisés dans la partie basale de l'épithélium gastrique des poissons. La surface du sac parasitophorique est couverte par des microvillosités rudimentaires. Le sac parasitophore résiduel est conservé avec les restes retenus de l'organite de fixation (Paperna et Vilenkin, 1996). Ainsi, les stades mérogoniques et gamogoniques sont situés au bord de la brosse microvilluse des cellules épithéliales superficielles, tandis que les stades oogoniques et sporogoniques sont localisés intracellulairement dans l'épithélium muqueux. Les lésions de la paroi et les stades endogènes des espèces de *Cryptosporidium* chez les poissons, sont nettement petits (Landsberg et Paperna, 1986; Camus et López, 1996; Alvarez-Pellitero et Sitja-Bobadilla, 2002; Alvarez-Pellitero *et al.*, 2004; Ryan *et al.*., 2015).

Le tableau ci-dessous montre les mesures et les sites d'infection des quelques espèces et génotypes de *Cryptosporidium* chez les poissons.

Tableau 3 : Taille et site d'infection de certaines especes et génotypes de *Cryptosporidium* chez les poissons

Espece	Hote	Site	Taille (um) L*P	Référence
<i>C. nasorum</i>	nason à éperon orange (<i>Naso literatus</i>)	Intestin	3.6 x 3.6	Hoover <i>et al.</i> , 1981
<i>Cryptosporidium</i> sp.	Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Estomac	5-7	Freire-Santos <i>et al.</i> , 1998
<i>Cryptosporidium</i> sp.	tambour rouge (<i>Sciaenops ocellatus</i>)	Estomac	7 x 4	Camus <i>et Lopez.</i> , 1996
<i>Piscicryptosporidium reinchenbachklinkei</i>	gourami perlé (<i>Trichogaster leeri</i>)	Estomac	2.4-3.18 x 2.4-3.0	Paperna <i>et Vilenkin.</i> , 1996
<i>Piscicryptosporidium cichlidis</i> (précédement <i>C. villithecum</i>)	Tilapia (<i>Oreochromis</i> sp.)	Estomac	4.0-4.7 x 2.5-3.5	Paperna and Vilenkin., 1996
<i>C. molnari</i>	Dorade royale (<i>Sparus aurata</i>), loup (<i>Dicentrarchus labrax</i>), morue de Murray (<i>Maccullochella peelii peelii</i>)	Estomac	4.72 (3.23–5.45) × 4.47 (3.02–5.04)	Alvarez-Pellitero <i>et SitjaBobadilla</i> , 2002, Palenzuela <i>et al.</i> , 2010, Barugahare <i>et al.</i> , 2011
<i>C. scophthalmi</i>	Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Intestin	4.44 (3.7–5.03) × 3.91 (3.03–4.69)	Alvarez-Pellitero <i>et al.</i> , 2004; Costa <i>et al.</i> , 2016
<i>C. huwi</i> (précédement piscine genotype 1)	Guppy (<i>Poecilia reticulata</i>)	Estomac	4.6 x 4.4	Ryan <i>et al.</i> , 2004a; 2015
<i>C. Bollandi.</i> (precedement Piscine genotype 2)	Scalaire (<i>Pterophyllum scalare</i>)	Estomac	3.4 x 4.1	Murphy <i>et al.</i> , 2009; Morgan, 2015; Yang <i>et al.</i> , 2015, Bolland <i>et al.</i> , 2020.
<i>C. abrahamseni</i> (précédement Piscine genotype7)	Tétra aux yeux rouges (<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>).	Estomac Intestin	3.82 (±0.22) x 3.16 (± 0.18)	Zahedi <i>et al.</i> , 2021

5 Epidémiologie de la cryptosporidiose

5.1 Espèces affectées et hôtes réservoirs

5.1.1 Espèces de *Cryptosporidium* chez les animaux

Plusieurs études moléculaires ont identifié un large éventail d'espèces et de génotypes de *Cryptosporidium* chez les animaux, dont beaucoup ne sont pas couramment trouvés chez l'homme (Ryan *et al.*, 2014).

Les bétails, en particulier les bovins et les ovins, sont des réservoirs importants de *C. parvum*. Dans le monde entier, des études suggèrent que les bovins sont infectés par quatre espèces principales de *Cryptosporidium* incluant *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* et *C. ryanae* avec une dominance de *C. parvum* (Xiao et Feng, 2008; Xiao, 2010).

Chez les ovins, d'après Ryan et ses collaborateurs en 2014, au moins huit espèces de *Cryptosporidium* ont été identifiées dans les fèces de moutons, notamment *C. parvum*, *C. hominis*, *C. andersoni*, *C. suis*, *C. xiaoi*, *C. fayeri*, *C. ubiquitum* et *C. scrofarum*, avec la dominance de *C. xiaoi*, *C. ubiquitum* et *C. parvum*.

Les espèces *C. parvum*, *C. hominis*, *C. ubiquitum* et *C. xiaoi* ont également été identifiées chez les chèvres (Ryan *et al.*, 2014)

Les espèces dominantes dans la cryptosporidiose porcine sont *C. suis* et *C. scrofarum* (anciennement porc génotype II), bien que *C. muris*, *C. tyzzeri* et *C. parvum* ont été aussi détectés chez cette espèce animale.

Chez les chiens et les chats sont infestés par deux espèces dont *C. canis* et *C. felis*, respectivement. Ainsi, *C. muris* et *C. parvum* ont été également détectés occasionnellement chez ces deux espèces animales (Lucio-Forster *et al.*, 2010).

Les lapins sont infectés spécifiquement par *C. cuniculus*. Les oiseaux sont infestés par six espèces incluant *C. meleagridis*, *C. baileyi* et *C. galli*, *C. avium*, *C. proventriculi* (previously avian genotype III) et *C. ornithophilus* (previously avian genotype II). De plus, autres espèces non adaptées comme *C. hominis*, *C. parvum*, *C. muris* et *C. andersoni* ont été aussi détectées chez certaines espèces d'oiseaux (Ryan *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2004; Ng *et al.*, 2006; Plutzer et Tomor, 2009 ; Holubová *et al.*, 2019, 2020).

Quatre espèces ont été rapportées chez les reptiles qui sont *C. serpentis*, *C. varanii*, *C. testudinis* (previously tortoise genotype I) et *C. ducismarci* (previously tortoise genotype II)

(Xiao *et al.*, 2004; Pavlasek *et al.*, 1995; Koudela et Modry, 1998; Pavlasek et Ryan, 2008; Fayer, 2010; Traversa, 2010; Ježková *et al.*, 2016).

Les espèces animales sauvages sont infectées par différentes génotypes. Le cerf sauvage également, pourrait infecter par *C. ubiquitum*, *C. bovis*, *C. ryanae*, *C. parvum* et *C. hominis* avec la prédominance de *C. parvum* et *C. ubiquitum*. Espèces de *Cryptosporidium* chez l'homme

Actuellement, plusieurs espèces et génotypes de *Cryptosporidium* ont été signalés chez l'homme dont *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. ubiquitum*, *C. xiaoi*, *C. viatorum*, *C. muris*, *C. suis*, *C. fayeri*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. scrofarum*, *C. tyzzeri*, *C. erinacei*, skunk génotype et chipmunk I génotype (Xiao, 2010; Waldron *et al.*, 2011; Elwin *et al.*, 2012; Kváč *et al.*, 2013a; Raskova *et al.*, 2013 ; Liu *et al.*, 2014 ; Squire et Ryan, 2017). Parmi ces espèces, *C. hominis* et *C. parvum* sont souvent les plus impliquées dans les infections humaines (Ryan *et al.*, 2014 ; Squire et Ryan, 2017). En effet, la répartition de ces espèces chez l'homme est différente selon les zones géographiques et les conditions socioéconomiques. *C. hominis* et *C. parvum* sont couramment détectés dans les pays européens et en Nouvelle-Zélande. En revanche, *C. parvum* est l'espèce dominante dans les pays du Moyen-Orient, tandis que *C. hominis* est l'espèce dominante dans d'autres pays industrialisés et les pays en développement (Xiao et Feng, 2008 ; Xiao, 2010 ; Nazemalhosseini-Mojarad *et al.*, 2012). Ainsi, une autre différence a été signalée dans la répartition de ces espèces, en fonction des zones urbaines et rurales. *C. parvum* est fréquemment isolé dans les zones rurales, et *C. hominis* est souvent détecté dans les zones urbaines. Cette différence dans la distribution est probablement liée aux différences dans les sources d'infection et les voies de transmission (Ryan *et al.*, 2014). Cependant, plusieurs études de sous-typage basé sur le gène gp60 ont montré que de nombreuses infections à *C. parvum* chez l'homme, ne sont pas le résultat d'une transmission zoonotique (Xiao, 2010).

5.1.2 Espèces de *Cryptosporidium* chez les poissons

Les espèces de *Cryptosporidium* chez les poissons ont des particularités (biologiques et génétiques) qui ne se retrouvent pas chez les hôtes homéothermiques (Ryan *et al.*, 2014). Ces derniers présentent un problème dans la taxonomie du *Cryptosporidium* chez les poissons. En revanche, la reconnaissance de ces caractéristiques a incité Paperna et Vilenkin (1996) à proposer le nouveau genre *Piscicryptosporidium* pour deux nouvelles espèces ;

Piscicryptosporidium reichenbachklinkei et *Piscicryptosporidium cichlidis* provenant de poissons cichlidés du genre *Oreochromis*. Cependant, d'autres formes de divergence ont été acceptées pour les espèces de *Cryptosporidium* trouvées dans différentes localisations au sein de l'hôte principal, comme les gros oocystes des espèces de *Cryptosporidium* qui se développent dans l'estomac par rapport aux petits oocystes des espèces qui se développent dans l'intestin grêle. Les données génétiques suggèrent également que *Cryptosporidium* chez les poissons, est génétiquement très distinct, mais des données génétiques et biologiques supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre le statut taxonomique de *Piscicryptosporidium* (Ryan *et al.*, 2014).

Le premier signalement de *Cryptosporidium* chez les poissons décrivait une maladie chez un poisson marin tropical. Le parasite nommé *Cryptosporidium nasorum* (Hoover *et al.*, 1981).

Pavlassek (1983), en Tchécoslovaquie, a signalé la première description des stades de développement de *Cryptosporidium* chez les poissons d'eau douce, qui a détecté des corps ressemblant à des oocystes dans la carpe (*Cyprinus carpio*). Plus tard, dans une étude sur l'origine d'une éclosion d'origine hydrique à Sheffield (Royaume-Uni), Rush *et al.* (1990) ont détecté des formes d'oocystes de *Cryptosporidium* dans le contenu intestinal de 5 spécimens de truite sauvage (Alvarez-Pellitero et Sitjà-Bobadilla, 2002; Alvarez-Pellitero *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2009; Zanguee *et al.*, 2010; Ryan *et al.*, 2015). A ce jour, cinq espèces de *Cryptosporidium* sont reconnues comme valides chez les poissons sur la base de différences biologiques et génétiques dont *C. molnari*, *C. scophthalmi*, *C. huwi*, *C. bollandi* et *C. abrahamseni* (Alvarez-Pellitero et Sitjà-Bobadilla, 2002; Alvarez-Pellitero *et al.*, 2004; Palenzuela *et al.*, 2010; Ryan *et al.*, 2015, Bolland *et al.* 2020, Zahedi *et al.*, 2021). *C. molnari* a été génétiquement caractérisé chez la dorade royale (*Sparus aurata*) et la bar européenne (*Dicentrarchus labrax*) (Alvarez-Pellitero et Sitjà-Bobadilla, 2002 ; Palenzuela *et al.*, 2010). *C. huwi* a été identifié chez le guppy ornemental (*Poecilia reticulata*) (Ryan *et al.*, 2015), le barbu de Sumatra (*Puntigrus tetrazona*) (Paparini *et al.*, 2017) et le tétra neon (*Paracheirodon innesi*) (Yang *et al.*, 2015). *C. scophthalmi* a été décrit en 2004 chez le turbot (*Psetta maxima*, *syn. Scophthalmus maximus*) (Alvarez-Pellitero *et al.*, 2004). *C. bollandi* a été observé chez la scalaire (*Pterophyllum scalare*) (Bolland *et al.*, 2020), chez le tétra néon (*Paracheirodon innesi*) (Zanguee *et al.*, 2010), l'oscar (*Astronotus ocellatus*) (Zanguee *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015 ; Ryan *et al.*, 2015 ; Bolland *et al.*, 2020) ; et le Mulet (*Mugil cephalus*) (Yang *et al.*, 2015). *C. abrahamseni* a été isolé chez le tétra aux yeux rouges (*Moenkhausia sanctaefilomenae*) (Morine *et al.*, 2012 ; Bolland *et al.*, 2020 ; Zahedi *et al.*,

2021) et le tétra néon (*Paracheirodon innesi*) (Yang *et al.*, 2015). Jusqu'à présent, un total de 29 génotypes ont été identifiés chez les poissons à l'aide d'outils moléculaires (Bolland *et al.*, 2020). Les piscigénotypes 3–8 (PG3 – PG8), le génotype 9 (G9) et les nouveaux génotypes (NG, NGC1–5,7), un nouveau génotype similaire à *C. molnari* chez la carpe koi causant une infection disséminée et 14 nouveaux génotypes non nommés ont été signalés dans le monde entier (tableau 5). Des espèces de *Cryptosporidium* non spécifiques à l'hôte telles que *C. parvum*, *C. hominis*, *C. scrofarum*, *C. xiaoi*, *C. ubiquitum* et rat génotype III ont été identifiées chez les poissons, indiquant la contamination du milieu aquatique par le ruissellement agricole et les eaux usées rejetées. (Koinari *et al.* 2013; Ryan et Xiao, 2014 ; Yang *et al.*, 2016 ; Couso perez *et al.*, 2019, Bolland *et al.*, 2020, Moratal *et al.*, 2022).

Les tableaux 4 et 5 présentent les différentes espèces de *Cryptosporidium* spécifiques aux poissons et leurs hôtes et les différents génotypes isolés chez les différentes espèces de poissons, respectivement.

Tableau 4: Différentes espèces de *Cryptosporidium* spécifiques aux poissons et leurs hôtes.

Espece	Hote	Référence
<i>C. nasorum</i>	TetraNeon (<i>Paracheirodon innesi</i>)	Hoover <i>et al.</i> 1981.
	Brochet (<i>Esox lucius</i>)	Certad <i>et al.</i> , 2015.
<i>C. molnari</i>	Dorade royale (<i>Sparus aurata</i>) loup (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Alvarez-Pellitero <i>et al.</i> , 2002 ; Sitjà-Bobadilla <i>et al.</i> , 2005.
	morue de Murray (<i>Maccullochella peelii</i>)	Nader <i>et al.</i> , 2019.
	Brochet (<i>Esox lucius</i>)	Koinari <i>et al.</i> , 2013.
	Poisson chat (<i>Clarias gariepinus</i>)	Shaapan <i>et al.</i> , 2021
<i>C. molnari-like</i>	Poisson-chirurgien à deux taches (<i>Ctenochaetus tominiensis</i>) poisson-lune argenté (<i>Monodactylus argenteus</i>) Barbier (<i>Pseudodanthias dispar</i>) loche à ventouse alguivore (<i>Crossocheilus aymonieri</i>) Demoiselle bleu-vert (<i>Chromis viridis</i>) poisson-chat à l'envers taché (<i>Synodontis nigriventris</i>) Chirurgien bleu (<i>Paracanthurus hepatus</i>)	Zanguee <i>et al.</i> , 2010.
	scalaire haut (<i>Pterophyllum altum</i>)	Yang <i>et al.</i> , 2015.
	demoiselle bleu-ciel (<i>Chrysiptera hemicyanea</i>)	Yang <i>et al.</i> , 2015 ; Papparini <i>et al.</i> , 2017.
	Carassin doré (<i>Carassius auratus</i>)	

	Guppy (<i>Poecilia reticulata</i> ; poisson-clown (<i>Amphiprion percula</i>) ; Oscar (<i>Astronotus ocellatus</i>)	Yang <i>et al.</i> , 2015.
	Barbier (<i>Pseudanthias dispar</i>) poisson-ange à queue noire (<i>Centropyge eibli</i>) Marionnette tête d'or (<i>Opistognathus aurifrons</i>)	Yang <i>et al.</i> , 2015 ; Papparini <i>et al.</i> , 2017.
	morue de l'Atlantique (<i>Gadus morhua</i>)	Certad <i>et al.</i> , 2019.
	truite commune (<i>Salmo trutta</i>)	Couso-Pérez <i>et al.</i> , 2019.
<i>C. scopthalmi</i>	Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Alvarez-Pellitero <i>et al.</i> , 2004 ; Costa <i>et al.</i> , 2015.
	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	McOliver <i>et al.</i> , 2009.
<i>C. huwi</i>	Guppy (<i>Poecilia reticulata</i>) barbu de (Sumatra <i>Puntigrus tetrazona</i>)	Ryan <i>et al.</i> , 2004 ; Ryan <i>et al.</i> , 2015 ; yang <i>et al.</i> , 2015.
	tetra neon (<i>Paracheirodon innesi</i>)	Zanguee <i>et al.</i> , 2010 ; Ryan <i>et al.</i> , 2015 ; yang <i>et al.</i> , 2015 ; Bolland <i>et al.</i> , 2020.
<i>C. bollandi</i> (Pescine genotype 2 précédement)	Tétra néon (<i>Paracheirodon innesi</i>)	Zanguee <i>et al.</i> , 2010.
	Oscar (<i>Astronotus ocellatus</i>)	Zanguee <i>et al.</i> , 2010 ; Ryan <i>et al.</i> , 2015 ; Yang <i>et al.</i> , 2015. Bolland <i>et al.</i> , 2020.
	Mulet (<i>Mugil cephalus</i>)	Yang <i>et al.</i> , 2015.
	Scalaire (<i>Pterophyllum scalare</i>)	Bolland <i>et al.</i> , 2020.
<i>C. abrahamseni</i> Pescine genotype 7 précédement)	Tétra aux yeux rouges (<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>)	Morine <i>et al.</i> , 2012 ; Bolland <i>et al.</i> , 2020 ; Zahedi <i>et al.</i> , 2021).
	Tétra néon (<i>Paracheirodon innesi</i>)	Yang <i>et al.</i> , 2015.

Tableau 5 : Génotypes de *Cryptosporidium* isolés chez différentes espèces des poissons.

Génotypes	Hôte	Référence
Pescine génotype 3	Mulet (<i>Mugil cephalus</i>)	
Pescine génotype 3LIKE	Carassin doré (<i>Carassius auratus</i>)	
Pescine génotype 4	Loche à ventouse alguivore (<i>Crossocheilus aymonieri</i>)	Yang <i>et al.</i> , 2015.
	Demoiselle bleu-ciel (<i>Chrysiptera hemicyanea</i>)	
	Oscar (<i>Astronotus ocellatus</i>)	Zanguee <i>et al.</i> , 2010.
	Tetra Neon (<i>Paracheirodon innesi</i>)	
	Demoiselle bleu-ciel(<i>Chrysiptera hemicyanea</i>)	
	Poisson couteau (<i>Apteronotus albifron</i>)	Morine <i>et al.</i> , 2012 ; Bolland <i>et al.</i> , 2020
	Pelmato (<i>Pelvicachromis pulcher</i>)	
Pescine génotype 5	Scalaire (<i>Pterophyllum scalare</i> ; (<i>Pterophyllum altum</i>)	Yang <i>et al.</i> , 2015
	Poisson-lune argenté (<i>Monodactylus argenteus</i>)	
	Loche à ventouse alguivore (<i>Crossocheilus aymonieri</i>)	Zanguee <i>et al.</i> , 2010 ; Yang <i>et al.</i> , 2015
	Poisson couteau (<i>Apteronotus albifrons</i>)	
	Chirurgien bleu (<i>Paracanthurus hepatus</i>)	Zanguee <i>et al.</i> , 2010.
	Poisson rouge (<i>Carassius auratus</i>)	Yang <i>et al.</i> , 2015.
	Guppy (<i>Poecilia reticulata</i>)	Yang <i>et al.</i> , 2015 ; Paparini <i>et al.</i> , 2017
	Mulet (<i>Mugil cephalus</i>)	
	Platy (<i>Xiphophorus maculatus</i>)	
Pescine génotype 6	Guppy (<i>Poecilia reticulata</i>)	Yang <i>et al.</i> , 2015
Pescine génotype 6 LIKE	Gourami doré (<i>Trichogaster trichopterus</i>)	
Pescine génotype 7 LIKE	Tétra néon (<i>Paracheirodon innesi</i>)	Yang <i>et al.</i> , 2015
Pescine génotype 8	Slender silver biddy(<i>Gerres oblongus</i>)	Koinari <i>et al.</i> , 2013 ; Yang <i>et al.</i> , 2015
Génotype 9	Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Couso-Pérez <i>et al.</i> , 2018
Nouveau piscine génotype	Demoiselle bleu-ciel (<i>Chrysiptera hemicyanea</i>)	Yang <i>et al.</i> , 2015 ; Paparini <i>et al.</i> , 2017
	Mulet cabot (<i>Mugil cephalus</i>)	Reid <i>et al.</i> , 2010
	Poisson-clown (<i>Amphiprion percula</i>)	Yang <i>et al.</i> , 2015 ; Paparini <i>et al.</i> , 2017

	Oscar (<i>Astronotus ocellatus</i>)	Yang <i>et al.</i> , 2015
	Platy (<i>Xiphophorus maculatus</i>)	
	Carpe (<i>Cyprinus carpio</i>)	Yang <i>et al.</i> , 2016
Nouveau génotype 1	Lieu noir (<i>Pollachius virens</i>) Carpe commune (<i>Molva dypterygia</i>)	Certad <i>et al.</i> , 2019
Nouveau génotype 2	Merlan (<i>Merlangius merlangus</i>) Lingue franche (<i>Molva molva</i>)	
Nouveau génotype 3	Lingue franche (<i>Molvamolva</i>)	
Nouveau génotype 4	Carpe commune (<i>Molvadypterygia</i>)	
Nouveau génotype 5	lieu noir (<i>Pollachius virens</i>) Merlu commun (<i>Merluccius merluccius</i>)	
Nouveau génotype 7	Maquereau bleu (<i>Scomberscombrus</i>)	

5.1.3 Sous-types de *Cryptosporidium* spp chez les poissons

Le soutypage du *Cryptosporidium* a été mené par l'analyse du gène gp60. Les analyses moléculaires de ce dernier fournissent des informations sur les sources d'infection, l'origine biologique et géographique de l'infection par les différentes espèces, et par conséquent ça facilite les enquêtes épidémiologiques de la cryptosporidiose (Golomazou et kanaris, 2020). En effet, les études qui ont pour objectif de déterminer les sous-types des espèces zoonotiques de *Cryptosporidium* isolées chez les poissons dans le monde entier ne sont pas nombreux (tableau 6). La majorité de ces résultats montrent que l'origine des infections des poissons par *C. parvum* ou *C. hominis* pourraient être de l'homme, des ruminants (bovins, ovins, caprins) et des porcins. L'ensemble des familles de sous-types de *C. parvum* et *C. hominis* qui ont été identifiées chez les poissons sont IIa et Id, respectivement (Reid *et al.*, 2010 ; Koinari *et al.*, 2013 ; Certad *et al.*, 2015 ; Certad *et al.*, 2019 ; Couso-Pérez *et al.*, 2019). Généralement, les familles de sous-types de *C. parvum* (IIa et Id) se retrouvent à la fois chez l'homme et chez les ruminants, alors que d'autres sous-types de *C. parvum* (IIc, IIb, IIe-III) n'ont été identifiés que chez l'homme (Alves *et al.*, 2003; Cama *et al.*, 2008; Hijjawi *et al.*, 2010). Le sous-type le plus courant de *C. parvum* est IIaA15G2R1 qui a une distribution mondiale et se trouve souvent chez les humains et les ruminants (Broglia *et al.*, 2008). En revanche, les zones d'agriculture, la présence des déchets humains et des animaux dans l'environnement des poissons et le contact des poissons avec les eaux usées favorisent leurs infections par les espèces de *Cryptosporidium* non spécifiques, particulièrement les espèces zoonotiques.

Tableau 6: Sous-types de *C. parvum* et *C. hominis* identifiées chez les poissons.

Espece	Sous type	Espece hôte	Region	Référence
<i>C. parvum</i>	IIaA18G3R1	Merlan (<i>Sillago flindersi</i>)	Australie	Reid <i>et al.</i> , 2010
		maquereau espagnol (<i>Scomber Japonicus</i>)	Mer du nord	Certad <i>et al.</i> 2019.
		hareng atlantique (<i>Clupea harengus</i>)		
		anchois commun (<i>Engraulis encrasicolus</i>)		
		lingue bleue (<i>Molva dypterygia</i>)		
		sardine (<i>Sardina pilchardus</i>)	Mer Méditerranée	
	Maquereau bleu (<i>Scomber scombrus</i>)			
		Truite commune (<i>Salmo trutta</i>)	Espagne	Couso-Pérez <i>et al.</i> , 2019
	IIaA19G4R1	Tilapia du Nil (<i>Oreochromis niloticus</i>) barbillon de Java (<i>Barbonymus gonionotus</i>)	Papouasie Nouvelle Guinée	Koinari <i>et al.</i> , 2013.
	IIaA15G2R1	Comète maquereau (<i>Decapterus macarellus</i>)	France	Certad <i>et al.</i> 2015.
		perche commune (<i>Perca fluviatilis</i>)		
		corégone lavaret (<i>Coregonus lavaretus</i>)		
		Ombre chevalier (<i>Salvelinus alpinus</i>)		
		morue de l'Atlantique (<i>Gadus morhua</i>)		
	Truite commune (<i>Salmo trutta</i>)	Espagne	Couso-Pérez <i>et al.</i> , 2019.	
IIaA14G2R1	Tilapia du Nil (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Papouasie Nouvelle Guinée	Koinari <i>et al.</i> , 2013.	
IIaA17G2R1	Ombre chevalier (<i>Salvelinus alpinus</i>) gardon (<i>Rutilus rutilus</i>) corégone lavaret (<i>Coregonus lavaretus</i>) brochet (<i>Esox lucus</i>)	France	Certad <i>et al.</i> 2015.	
	<i>Blue ling Molva dypterygia</i>	Mer du nord	Certad <i>et al.</i> 2019.	
IIaA16G2R1	perche commune (<i>Perca fluviatilis</i>)	France	Certad <i>et al.</i> 2015.	
IIaA13G1R1	morue de l'Atlantique (<i>Gadus morhua</i>)	Mer du nord	Certad <i>et al.</i> 2019.	
<i>C. hominis</i>	IdA15G1	Comète maquereau (<i>Decapterus macarellus</i>)	Papouasie Nouvelle Guinée	Koinari <i>et al.</i> , 2013.

5.2 Transmission

La voie de transmission des oocystes *Cryptosporidium* est souvent féco-orale, ils peuvent se transmettre soit directement ou indirectement (transmission zoonotique, transmission interhumains, transmission d'origine hydrique et transmission d'origine alimentaire) (Ryan *et al.*, 2014 ; Ryan et Hijjawi, 2015 ; Squire et Ryan, 2017). En effet, la plupart des voies de transmission indirecte proviennent d'eau potable contaminée ou d'eau de loisirs (Ryan *et al.*, 2014). Ainsi les aliments (fruits et légumes, lait non pasteurisé et viande crue) peuvent être contaminés à tout moment (lors de la distribution, la préparation et la manipulation) par les eaux de lavage, les surfaces de préparation, les équipements ou les ustensiles contaminés. Bien que la transmission à partir du sol contaminé, ait été signalée (Ryan *et al.*, 2014 ; Ryan *et al.*, 2018).

Plusieurs études suggèrent également que les mouches pourraient jouer un rôle dans la transmission mécanique de *Cryptosporidium* (Squire et Ryan, 2017).

De nombreux caractères biologiques de *Cryptosporidium*, les rende particulièrement adapté à la transmission d'origine alimentaire et/ou hydrique. Ceux-ci comprennent :

- Les oocystes sont des hangars contenant des sporozoïtes entièrement infectieux et aucun hôte secondaire ni conditions de maturation ne sont requis (Ryan *et al.*, 2018);
- La résistance du parasite à la désinfection, y compris au chlore (Painter *et al.*, 2015);
- Sa capacité à être excrété en très grandes quantités, par exemple, les veaux nouveau-nés peuvent excréter jusqu'à 30 milliards d'oocystes ou plus sur une période de 1 à 2 semaines (Kuczynska et Shelton, 1999);
- la faible dose infectieuse (10-100 oocystes) (DuPont *et al.*, 1995; Okhuysen *et al.*, 1999; Chappell *et al.*, 2006).
- La viabilité des oocystes sur les fruits et légumes n'est pas affectée par les basses températures et restent donc potentiellement infectieux pendant plusieurs jours à plusieurs semaines dans un réfrigérateur (Macarisin *et al.*, 2010; Hohweyer *et al.*, 2016);
- La longue période d'incubation de la cryptosporidiose (en moyenne 7 jours) (Chalmers et Davies, 2010), qui retarde l'identification de la source et la mise en œuvre des interventions pour prévenir la transmission ;

-Le fait que les oocystes peuvent continuer à être éliminés dans les fèces jusqu'à 60 jours après la cessation des symptômes gastro-intestinaux (Jokipii et Jokipii, 1986; Stehr-Green *et al.*, 1987).

C. cuniculus, *C. hominis* et *C. parvum*, sont les 03 espèces connues pour être associées aux épidémies d'origine hydrique de cryptosporidiose humaine (Ryan *et al.*, 2014).

Les bovins constituent le principal réservoir de *Cryptosporidium* et les études moléculaires ont démontré que *C. hominis* et *C. parvum* sont transmis des animaux aux humains (Ryan *et al.*, 2014). *C. hominis* semble être hautement spécifique à l'homme. Alors que certains sous-types de *C. parvum* tels que la famille de sous-types IIc sont anthroponotique et d'autres sous-types de *C. parvum* sont zoonotiques (Xiao, 2010; Ryan *et al.*, 2014).

5.2.1 Rôle du poisson dans la transmission de cryptosporidiose

Les recherches qui ont été menées sur les infections à *Cryptosporidium* spp. chez les poissons jusqu'à présent, indiquent que ces derniers pourraient être infectés par les espèces zoonotiques de *Cryptosporidium* incluant *C. parvum* et *C. hominis* (Golomazou *et al.*, 2021). En effet, *C. parvum* a été observé pour la première fois chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), lorsqu'elle était nourrie avec un aliment commercial contaminé par des oocystes de *C. parvum* isolés de bovins, mais aucune donnée sur le génotypage n'est disponible (Freire-Santos *et al.*, 1998). Ensuite, d'autres chercheurs ont pu identifier *C. parvum* chez d'autres espèces de poisson. Tandis que, *C. hominis* a été observé une seule fois chez le *Decapterus macarellus*, en Paupésie nouvelle guinée (Koinari *et al.*, 2013). En effet, la très faible prévalence de *C. parvum* et *C. hominis* (<1%) chez les poissons révélée chez 18 espèces de poissons d'eau douce et de mer, y compris des poissons comestibles, sauvages et d'élevage, suggère que les poissons ne sont pas un réservoir important pour les infections humaines. Ces recherches constatent que les poissons sont des hôtes sentinelles pour les infections à *Cryptosporidium* spp. et ils n'assureront pas la transmission de l'infection entre les hôtes sensibles (Ryan *et al.*, 2004 ; Ryan *et al.*, 2014 ; Ryan *et al.*, 2015 ; Golomazou et Karanis, 2020). Cependant, au Nord-ouest de l'Espagne, Couso-perez *et al.* (2019), ont supposé que les poissons d'eau douce notamment la truite brune et la truite européenne pourraient jouer le rôle de porteur des infections à *Cryptosporidium* spp. notamment, *C. molnari*, *C. huwi* et *C. parvum*. Par conséquent, ils assureraient la contamination humaine, particulièrement par *C. parvum* (Alvarez-Pellitero et Sitj'a-Bobadilla, 2002 ; Couso perez *et al.*, 2019). Cette constatation est basée sur la prévalence élevée des espèces de *Cryptosporidium* déterminée

chez ces espèces du poisson. Ainsi, à l'observation des oocystes libres et/ou regroupés entièrement sporulés dans l'épithélium gastrique du poisson, qui ne sont pas contenus dans des sacs parasitiphores comme il a été décrit souvent pour les piscines *Cryptosporidium* où ils l'ont considéré comme témoin de l'infection réelle des poissons par *C. parvum* et de la participation de ces derniers dans la transmission de ce protozoaire à l'être humain (Couso Perez *et al.*, 2019). La détection du *Cryptosporidium* dans le filet du poisson (Certad *et al.*, 2015) indique que certaines espèces de *Cryptosporidium* qui infectent les poissons pourraient se transmettre à l'homme, soit par la consommation de poisson insuffisamment cuit, soit par contact avec le poisson pendant la préparation et la manipulation, en particulier, chez les patients immunodéprimés (Golomazou et Karanis, 2020 ; Golomazou *et al.*, 2021).

5.3 Prévalences et facteurs de risque

5.3.1 Cryptosporidiose animale

5.3.1.1 Prévalence

L'importance économique de la cryptosporidiose et son impacte sur la santé public, qualifié les espèces de *Cryptosporidium* pour devenir l'objectif de plusieurs études à travers le monde. En Algérie, des études ont été menées pour isoler *Cryptosporidium* spp. chez plusieurs espèces animales. En effet, Dadda *et al.* (2021), Laatamna *et al.* (2018), Ouakli *et al.* (2018); Benhouda *et al.* (2017), Baroudi *et al.* (2017), Hocine *et al.* (2016), Ouchen *et al.* (2016), Ouchen *et al.* (2014), Ouchen *et al.* (2012) et Akam *et al.* (2009) ont rapporté des taux de prévalence de 15.69%, 7%, 52.5%, 40%, 27.10%, 13.72%, 68%, 26.11%, 24.7% et 28%, respectivement, chez les bovins. Chez les agneaux, Sahraoui *et al.* (2019), ont déterminé une prevalence de 43%. Tandis que, Laatamna *et al.* (2018) ont observé un taux de 15%. Bennadji *et al.* (2022) ont observé une fréquence de 17.02% chez les caprins, Baroudi *et al.* (2018a) ont déclaré un taux d'infection de 8.7% chez les chèvres et 14.5% chez les agneaux. Chez le dromadaire, la prévalence a été 5.1% dans l'étude qui a été menée par Baroudi *et al.* (2018b) et 2% selon Laatamna *et al.* (2018). En revanche, chez les équidés, une prevalence de 2.3% chez les chevaux et de 1.6% chez les ânes, ont été signalées par Laatamna *et al.* (2013 et 2015). La prévalence de cryptosporidiose a été étudiée aussi chez les oiseaux. Laatamna *et al.* (2017) ont enregistré un taux de 8.98% chez ces derniers. Guechtouli *et al.* (2022) ont observé une fréquence de 55% chez le poulet de chair et 41% chez la dinde. Ainsi, Baroudi *et al.* (2013), ont rapporté une prevalence de 34% et 44% chez le poulet de chair et la dinde,

respectivement. Tandis que Iatamna *et al.* (2018) ont rapporté une prévalence de 8.9% chez le poulet de chair.

5.3.1.2 Facteurs de risque

Les animaux sont infectés par *Cryptosporidium* spp. en fonction de plusieurs facteurs tels que l'espèce, l'âge, la saison, le statut sanitaire, mode d'élevage... etc. En effet, les caprins sont les plus sensibles, suivis des bovins et des ovins (Chartier et Paraud, 2010). Les jeunes animaux sont plus susceptibles à être infectés que les adultes (Paraud et Chartier, 2012). En ce qui concerne la saison, de manière générale, le pic d'incidence de la cryptosporidiose est observé lors du pic d'incidence des naissances que ce soit la saison (Paoletti, 2002). Le statut immunitaire influencerait la sévérité mais aussi la distribution de l'infection (Fayer et Ungar, 1986). Des infections sévères ont été décrites chez les jeunes ruminants (système immunitaire immature) et aussi chez des animaux immunodéprimés tels que des chats, des chiens, des chevaux et des singes (O'donoghue, 1995).

5.3.2 Cryptosporidiose des poissons

5.3.2.1 Prévalence

Plusieurs études rapportent différents taux de prévalence chez des poissons marins et d'eau douce, d'élevage, en captivité et d'ornementaux dans un large éventail de régions géographiques (Golomazou et Karanis, 2020). La prévalence de *Cryptosporidium* chez les poissons est très variable, allant de 0,8% à 100% (Landsberg et Paperna, 1986; Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2005; Alvarez-Pellitero *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2009; Reid *et al.*, 2010; Zanguee *et al.*, 2010; Morine *et al.*, 2012; Koinari *et al.*, 2013; Certad *et al.*, 2015; Morgan, 2015; Yang *et al.*, 2015). Le plus souvent, le parasite a été signalé en Australie, où 58% des rapports mondiaux ont été enregistrés. Les trois principales espèces de *Cryptosporidium* infectant les poissons (*C. molnari*, *C. huwiet*, *C. scophthalmi*) ont été signalées principalement en Espagne, en France, en Australie et dans l'Atlantique du Nord-Est, tandis que *C. molnari* et les génotypes similaires ayant la plus large distribution (Golomazou et Karanis, 2020).

Les poissons marins comestibles en France ont montré un taux de 3,2% (Certad *et al.*, 2019). En revanche, Couso-perez *et al.* (2019) en Espagne, ont signalé une prévalence de 16,8% chez les poissons d'eau douce. Chez l'*Oncorhynchus mykiss* (espèce d'eau douce), la prévalence a été de 9,2% (Couso-perez *et al.*, 2018). Certad *et al.* (2015), ont rapporté un taux

de 36,6% chez les poissons d'eau douce en France. Ainsi, une prévalence de 1,14% a été observée chez les poissons d'eau douce en Papouasie-Nouvelle-Guinée (Koinari *et al.*, 2013).

Les études de prévalence réalisées dans différentes régions du monde chez différentes espèces du poisson sont résumées dans le tableau ci-après.

Tableau 7: Prévalence des espèces de *Cryptosporidium* chez les poissons dans le monde

Region	Origine d'hôte	Espèce/ genotype du <i>cryptosporidium</i>	Prévalence (%)	Référence
Espagne	Poissons marin et d'élevage.	<i>C. molnari</i>	100	Sitjà-Bobadilla <i>et al.</i> , 2005.
	Poissons d'élevage d'eau douce.	Genotype 9, <i>C. parvum</i>	9.2	Couso-Pérez <i>et al.</i> , 2018.
	Poissons d'eau douce	<i>C. parvum</i> , <i>Cryptosporidium molnari</i> -like	16.8	Couso-Pérez <i>et al.</i> , 2019.
Australie	Poissons d'élevage d'eau douce et marins. Poissons d'eau douce et marins.	<i>C. parvum</i> , <i>C. xiaoi</i> , pig genotype II, nouvel genotype	0.8	Reid <i>et al.</i> , 2010.
	Poissons d'ornement d'eau douce et marin	<i>C. molnari</i> , PG1, PG2, PG4, PG5, PG6.	10.5	Zanguee <i>et al.</i> 2010.
	Poissons d'ornement d'eau douce et marins	genotype III-like, PG 4, PG 7, PG 6-like	3.5	Morine <i>et al.</i> , 2012.
	Poissons d'ornement d'eau douce	piscine genotype 2, <i>C. huwii</i>	7.1	Ryan <i>et al.</i> , 2015.
	Poissons d'ornement, des eaux douces et marines. Poissons d'eau douce et marins.	<i>c.molnari</i> -like, <i>C. huwii</i> PG2, PG 3-like, PG 4, PG 5, PG 5like, PG 7, PG 7like, PG 8	5.3	Yang <i>et al.</i> 2015.
	Poissons d'ornement d'eau douce	<i>C. bollandi n. sp.</i> , <i>C. huwi</i> , PG 7, PG 4	4.3	Bolland <i>et al.</i> , 2020.
Papouasie Nouvelle Guinée	Poissons d'eau douce et d'eau de mer.	<i>C. parvum</i>	1.14	Koinari <i>et al.</i> 2013.
France	Poissons d'eau douce	<i>C. parvum</i> <i>C. molnari</i>	37	Certad <i>et al.</i> 2015.
Les mers suentourées de la France	Poissons d'eau de mer	<i>C. parvum</i> NG 1, NG 2, NG 3, NG 4, NG 5, NG 6, NG 7	2.3	Certad <i>et al.</i> 2019.
Iran	poissons d'ornement d'eau douce	<i>Cryptosporidium</i> spp. <i>C. parvum</i>	16	Shahbazi <i>et al.</i> , 2020.
Egypte	Poisson d'eau douce	<i>C. molnari</i>	69.3	Shaapan <i>et al.</i> , 2021

PG: piscine gynotype, NG: Nouveau gynotype

5.3.2.2 Facteurs de risque

La plupart des recherches qui ont été réalisées sur la cryptosporidiose des poissons ont été menées sur des espèces de poissons marins d'élevage, captives et ornementales, chez lesquelles *Cryptosporidium* peut provoquer une variété de signes cliniques et entraînent une morbidité et une mortalité élevées, en particulier chez les larves et les juvéniles. En effet, *Cryptosporidium* a été signalé chez 100% des poissons juvéniles de certaines fermes (Alvarez-Pellitero *et al.*, 2004). Des taux de prévalence plus élevés ont été observés chez les jeunes turbots d'élevage et chez les dorades royales en pré-croissance (Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2005; Álvarez-Pellitero *et al.*, 2009). Couso-Pérez *et al.* (2019), ont rapporté 23.1%, 13.5% et 18.4% chez les poissons (*P maxima*) de 2, 2–3 et plus de 3 ans, respectivement. Jusqu'à 21 poissons sur 22 étaient infectés par des espèces de *Cryptosporidium* dans la cohorte âgée de 6 mois par rapport au poisson âgés de 9 mois (Baragahare *et al.*, 2011). La maturité du système immunitaire a joué un rôle primordial dans la prédisposition des poissons juvéniles aux infections à *Cryptosporidium* spp. par rapport aux jeunes et aux adultes. Le régime alimentaire pourrait ainsi influencer ces infections (Couso-Pérez *et al.*, 2019).

Ainsi, le poids a une influence claire sur les infections par *Cryptosporidium* chez les poissons. Une relation significative entre la présence du parasite et le poids des poissons a été prouvée par Alvarez-Pellitero *et al.* (2004). La prévalence et l'intensité des infections les plus élevées ont été signalées chez les poissons qui ont de 30 à 100 g (Alvarez-Pellitero *et al.*, 2004). Les plus gros poissons présentant généralement moins d'infections (Alvarez-Pellitero *et al.*, 2004). Couso-Pérez *et al.* (2019), ont constaté que les taux d'infection augmentaient chez les poissons en pré-croissance avec tendance de diminuer avec le poids des poissons. Alvarez-Pellitero *et al.* (2004) et Sitjà-Bobadilla *et al.* (2005) ont rapporté le même constat.

Les infections des poissons à *Cryptosporidium* spp. présentent une certaine saisonnalité. En effet, Les saisons préférentielles varient selon la région et les conditions bioclimatiques au cours de l'année (Morel, 2000 : Amiel *et al.*, 2004). Les valeurs d'infection les plus élevées ont été enregistrées en printemps dans l'étude menée par Alvarez-Pellitero *et al.* (2004). Ainsi, Sitjà-Bobadilla *et al.* (2005) ont signalé une prévalence et une intensité maximale chez la dorade royale en printemps, suivi de l'été. Couso-Pérez *et al.* (2018) ont rapporté des résultats contradictoires, où ils ont enregistré un taux élevé (60%) chez les poissons infectés par les cryptosporidies au mois octobre par rapport à ceux qui sont infectés en été (20%).

De plus, une relation a été observée entre la présence du parasite et le stade de production chez les poissons d'élevage (Sitja-Bobadilla *et al.*, 2005).

La propagation des infections chez le poisson est importante dans les zones agricoles. Le système de croissance des poissons peut influencer sur leurs infections par *Cryptosporidium* spp. Sitj'a-Bobadilla *et al.* (2005) ont observé des taux de prévalence variant de 40,0 à 94,7% et de 10,0 à 50,0% dans les écloséries et les bassins «en croissance» de dorade royale et de bar européen, respectivement. En revanche, les échanges en eau dans les milieux de vie (élevage) participent dans la transmission des infections chez le poisson (faible taux d'échange en eau indique une grande possibilité de transmission d'infection).

Plusieurs études ont montré que les espèces de *Cryptosporidium* privilégient de se localiser au niveau le tube pylorique par rapport aux intestins. En Espagne, des chercheurs ont enregistré un taux de 69.6% au niveau le tube pylorique contre 14.6% au niveau des intestins d'*Oncorhynchus Mykiss* (Couso-pérez *et al.*, 2019).

Des conditions stressantes telles que celles associées aux pratiques aquacoles intensives et aux infections virales ou bactériennes concomitantes peuvent jouer un rôle dans l'acquisition du parasite, le développement de lésions et la progression de la maladie (Certad *et al.*, 2019 ; couso-pérez *et al.*, 2019).

5.4 Pathogénie et réponse immunitaire

La pathogénicité de *Cryptosporidium* est demeurée inconnu. Cependant, plusieurs facteurs de virulences ont été identifiés chez ce parasite. En effet, ces derniers sont responsables de l'apparition d'un ensemble des signes cliniques. La caractéristique de cette pathogénicité est la diarrhée sécrétoire chez le sujet atteint (Okhuysen et Chappell, 2002; Certad, 2008, Bouzid *et al.*, 2013).

Plusieurs études ont montré qu'une faible dose de *Cryptosporidium* est capable d'être la cause d'une infection sévère chez l'homme. En effet, le pouvoir pathogène du *Cryptosporidium* est différent en fonction de l'espèce infectée, son statut immunitaire, l'espèce de *Cryptosporidium* et même selon l'isolat (Certad, 2008 ; Bouzid *et al.*, 2013). Plusieurs études établissent que de très faibles doses de *Cryptosporidium* spp. pourraient induire une infection chez l'homme et certains modèles murins, et attestent ainsi du fort pouvoir infectieux de *Cryptosporidium* (Benamrouz, 2012).

Ce parasite préfère de s'installer au niveau des entérocytes de l'intestin grêle, notamment au niveau de la bordure microvillositaire et se développe dans des vacuoles parasitophore (Hiwajji *et al.*, 2004). L'organisme de l'hôte à son tour répond à l'infection de *Cryptosporidium* par la réponse immunitaire. En effet, l'effet de la réponse immunitaire et celui des produits parasitaires (facteurs de virulence) sur la surface épithéliale produise la diarrhée (Laatamna *et al.*, 2013). L'augmentation de la perméabilité intestinale (suite à l'augmentation des taux d'interféron gamma), la perturbation du transport des nutriments (suite à la détérioration des villosités) et la baisse des activités enzymatiques (inhibition de l'absorption du sodium, augmentation des sécrétions de Cl et HCO₃⁻ sous l'action de prostaglandines locales) sont responsables de la diarrhée et des pertes hydriques (Wyatt *et al.*, 2010 ; Paraud et Chartier, 2012).

5.4.1 Facteurs de virulence

a- Adhérence

Les molécules parasitaires qui sont impliquées dans l'adhérence de *Cryptosporidium* aux cellules hôte sont : CSL (circumsporozoïte -like) (Riggs *et al.*, 1997), la gp900 (Barnes *et al.*, 1998), le complexe gp15/40/60 (Cevallos *et al.*, 2000; Strong *et al.*, 2000), TRAP-C1 et TRAP-C2 (thrombospondin related adhesion proteins) (Spano *et al.*, 1998), la cp47 (Nesterenko *et al.*, 1999) et la Cps500 (Riggs *et al.*, 1999).

b- Invasion et lésions

L'invasion de la muqueuse entraîne une atrophie modérée à sévère des villosités associée à une réduction de la surface totale de la muqueuse intestinale. Celle-ci est due à une destruction d'entérocytes matures, à l'atrophie des microvillosités et à une augmentation de la perméabilité intestinale (Wyatt *et al.*, 2010). Les mécanismes impliqués dans les modifications des membranes pendant l'invasion de *Cryptosporidium* demeurent inconnus. Néanmoins, une protéine spécifique de *Cryptosporidium* pourrait être associée à l'invasion cellulaire et à la perte de fonction barrière. C'est l'hémolysine H4 codée par le gène hemA (Steele *et al.*, 1995).

c- Production de toxine

Une entérotoxine de type « choléra-like » est suspectée d'être impliquée dans le développement de la diarrhée sécrétoire mais son existence n'a pas été démontrée à ce jour (Thompson *et al.*, 2008). En revanche, 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 pas été observée (Chalmers et Davies, 2010).

d- Apoptose

Liu *et al.* (2008) ont démontré que l'infection par *C. parvum* conduit à une surexpression des gènes codant pour des inhibiteurs de protéines de l'apoptose (IAPs) CIAP1, CIAP2, Xiap et survivine.

C. parvum introduit la mort programmée des entérocytes infectées et non infectées lors de sa pénétration dans l'organisme hôte. Une fois installé, il inhibe l'apoptose en activant le NFkB (McCole *et al.*, 2000).

5.4.2 Réponse immunitaire à l'infection par *Cryptosporidium*

La nature de la réponse immunitaire vis-à-vis les infections aux espèces du *Cryptosporidium* est mal comprises (Thomson, 2016). En effet l'organisme infecté répond par les deux réponses immunitaires innées et adaptatives.

5.4.2.1 Réponse immunitaire innée

Constitue un ensemble de mécanismes (barrières physiques, phagocytose, réaction inflammatoire) mis en place immédiatement lors de l'infection afin d'empêcher la fixation de *Cryptosporidium* sur la surface épithéliale. Des études ont montré que la mucine interfère avec la capacité des sporozoïtes de s'attacher à la paroi cellulaire (Barnes *et al.*, 1998; Cevallos *et al.*, 2000). De plus, les cellules NK 'naturel killer' secrètent des cytokines qui peuvent avoir un effet direct sur le parasite ou signaler autres réponses immunitaires (Thomson, 2016).

Après l'invasion de *Cryptosporidium* dans les entérocytes, les cytokines TNF α et IL12 sont secrétés pour activer les cellules NK. Ces dernières après leur activation, secrètent à leur tour le TNF β et l'IFN- γ . Le TNF β agit directement sur les cellules cibles en causant leur endommagement et par conséquent, il entraîne la lyse cellulaire. Le TNF α stimule les cellules présentatrices d'antigène (qui se retrouvent au niveau de la muqueuse intestinale) pour sécréter d'autres cytokines. Ces dernières interagissent avec les CD4 en induisant leur prolifération en Th1 ou Th2. En effet, la voie Th1 libère certaines cytokines qui sont IL12, IFN- γ , TNF β . Ils sont responsables de la réponse cytotoxique. En revanche, la voie Th2

permet la libération d'autres interleukines par lesquelles la réponse humorale est déclenchée (Thompson *et al.*, 2003). (Figure3)

Plusieurs études ont été réalisées afin de comprendre la réponse immunitaire engendrée par les espèces de *Cryptosporidium* chez l'homme et les souris, mais celles effectuées sur les animaux d'élevages sont rares (Thomson, 2016).

In vitro, chez les souris, l'acquisition d'une flore intestinale mature serait associée à une résistance au parasite. Elle stimulerait des mécanismes non spécifiques tels qu'une possible production d'interféron gamma indépendamment de la voie des lymphocytes T (O'donoghue, 1995). Chez le veau, la flore intestinale présente après la naissance entre en compétition avec les sporozoïtes dans l'attachement aux cellules épithéliales intestinales. De plus, chez les bovins infectés par *Cryptosporidium parvum*, des quantités importantes de défensine β entérique, un peptide antimicrobien, ont été mises en évidence. Cependant, ces mécanismes s'avèrent insuffisants pour neutraliser l'infection (Wyatt *et al.*, 2010).

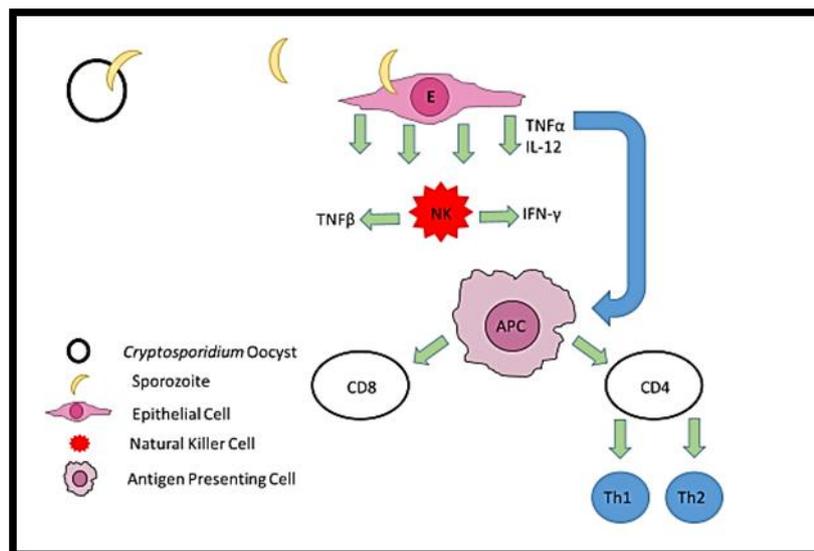


Figure 3 : Les étapes et les interactions les plus importantes de la réponse immunitaire acquise contre l'infection à *Cryptosporidium* spp. (Thomson, 2016).

5.4.2.2 Réponse immunitaire acquise

Elle est plus tardive mais durable dans le temps. Elle est également à l'origine de la mémoire immunitaire. Elle comprend la réponse humorale et la réponse cellulaire. Des anticorps spécifiques IgA, IgM et IgG ont été détectés dans le sérum de veaux, agneaux, souris et poulets infectés par le parasite (O'donoghue, 1995). Il a été décrit chez des veaux n'excrétant plus d'oocystes de *C.parvum*, des anticorps circulants. Ces derniers sont excrétés dans la lumière intestinale et sont compatibles avec des antigènes de taille très variable, comme l'antigène de sporozoïtes p23. Ces antigènes induisent la production d'anticorps neutralisants fournissant ainsi une possible protection contre la maladie (Wyatt *et al.*, 2010). En effet, les mêmes anticorps peuvent se retrouver dans les fèces des veaux. En revanche, une partie de ces anticorps semble provenir du transfert passif d'anticorps depuis le colostrum. Wyatt *et al.* (2010) ont montré que les différentes classes d'anticorps ne sont pas excrétées dans les fèces au même moment après l'infection : les IgG1 sont détectées à partir du 5ème jour après l'infection tandis qu'il faut attendre le 7ème jour pour voir apparaître les IgG2. Selon O'donoghue (1995), la diminution du nombre d'oocystes excrétés chez les veaux et les agneaux infectés est accompagnée avec l'augmentation des taux d'anticorps fécaux. Ces informations suggèrent que les anticorps sont capables de neutraliser les formes libres du parasite. Cependant, ils seraient inefficaces sur les stades intracellulaires et leur courte durée de vie limiterait leur efficacité.

Les lymphocytes T, cytotoxiques et auxiliaires, et les cellules NK sont les principaux acteurs dans la réponse immunitaire dans le cas d'infections à *Cryptosporidium* spp. (Wyatt *et al.*, 2010). Il a été montré que la sévérité de l'infection est croissante avec la diminution du nombre de lymphocytes CD4+ chez l'homme et les souris (Navin *et al.*, 1999). Des études ont montré que la réponse immunitaire adaptative se met en place dans l'intestin avant même le début des signes cliniques. Des lymphocytes T CD4+ et CD8+ ainsi que des cytokines (IL-10) ont n'été pas observés (concentrations minimales) dans les villosités, la lamina propria et les plaques de Peyer de l'iléon après l'infection. Cependant, à 3 jours post-inoculation, la présence de l'IL-10 et l'absence de l'interféron gamma provoquent une inhibition de la réponse Th1 et donc un développement de l'infection et de la diarrhée (Wyatt *et al.*, 2010). La guérison de l'animal est associée à la production d'anticorps et à une réponse Th1 (par la production d'interféron gamma) dans la muqueuse intestinale (Wyatt *et al.*, 2010). Selon certaines études, les lymphocytes CD4+ auraient un rôle dans la durée de l'infection tandis que l'interféron gamma limiterait la sévérité de celle-ci (O'donoghue, 1995). Chez les veaux

guéris, le nombre de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ retrouvés dans l'iléon est encore élevé par rapport à des veaux naïfs (Wyatt *et al.*, 2010).

5.5 Signes cliniques et lésions

Les signes cliniques de la cryptosporidiose sont en fonction de l'espèce en cause. Il existe des espèces qui entraînent des symptômes observables et d'autres passent inaperçus (Thomson, 2016). En effet, *C. ryanae* et *C. bovis*, sont couramment retrouvées chez les veaux, et les animaux infectés excrètent des oocystes. Cependant, ces infections ne sont pas associées à une maladie clinique (Fayer *et al.*, 2005 ; Fayer *et al.*, 2008). Chez la plupart des mammifères, l'infection par *C. parvum* entraîne une diarrhée aqueuse autolimitante, une perte d'appétit et des douleurs abdominales (Clark et Sears, 1996; Klein *et al.*, 2008; Tzipori *et al.*, 1983; Tzipori et Ward, 2002).

5.5.1 Cryptosporidiose animale

5.5.1.1 Signes cliniques

Chez les ruminants, les symptômes apparaissent chez les jeunes animaux. La cryptosporidiose se manifeste par la diarrhée (muqueuse jaune pâle à aqueuse profuse) associée à la dépression, l'anorexie et les douleurs abdominales, la faiblesse et la perte de poids (O'donoghue, 1995, Thompson *et al.*, 2008). Les symptômes peuvent durer de 4 à 14 jours et sont d'une sévérité variable (Thompson *et al.*, 2008). Les taux de morbidité dans les élevages varient très fortement, la mortalité est faible (Smith, 2008). La maladie évolue vers la guérison spontanée, plus rarement vers la mort (Fayer et Ungar, 1986). Chez le chevreau, la morbidité peut atteindre 80 à 100% et la mortalité peut dépasser 50% (Paraud et Chartier, 2012).

Chez le chien, la cryptosporidiose est généralement asymptomatique. Rarement une diarrhée chronique ou intermittente, un amaigrissement et parfois une dysorexie chronique et des vomissements sont observés (Bourdais-Massenet, 2008). Concernant les chats, 50% des individus infectés par *Cryptosporidium* présentent des symptômes de diarrhée (Ramirez *et al.*, 2004).

Chez le cheval, l'infection est également asymptomatique. Les poulains souffrant de SCID (Severe Combined Immuno Deficiency) ont présenté de diarrhée sévère (Fayer et Ungar, 1986). Chez les animaux sauvages, la cryptosporidiose se traduit par de la diarrhée et de la déshydratation pouvant conduire à la mort (Paoletti, 2002).

Chez les oiseaux infectés par *C.meleagridis* des signes cliniques variables au niveau l'appareil digestif sont apparus. La mortalité est modérée (De Graaf *et al.*, 1999a, Baroudi *et al.*, 2013). les oiseaux infectés par *C.baileyi*, présentent des signes respiratoire et oculaire, détresse respiratoire, toux, éternuements, jetage, épiphora, distension des sinus infra-orbitaires etc (Fayer et Ungar, 1986 ; De Graaf *et al.*, 1999a). De rares cas d'infections rénales ont également été rapportés.

Chez les Reptiles la cryptosporidiose est à l'origine de gastrites chroniques chez les adultes. Ils présentent de l'anorexie, la perte de poids progressive et les régurgitations post-prandiales (O'donoghue, 1995).

5.5.1.2 Lésions

Chez les animaux, à l'autopsie, une distension gazeuse ou liquidienne des intestins est observée, associée à une congestion de la muqueuse, une entérite et une colite dans certains cas (O'donoghue, 1995). Aucun élément lésionnel pathognomonique n'est signalé au plan macroscopique (Chartier, 2003). Sur le plan histologique, une atrophie modérée à sévère des villosités, une hyperplasie des cryptes et la présence de plages de nécrose focales sont principalement observés (O'donoghue, 1995). Des cellules mononucléaires et des granulocytes neutrophiles sont infiltrées dans la lamina propria (De Graaf *et al.*, 1999a). 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 chez les patients sidéens (Chalmers et Davies, 2010).

5.5.2 Cryptosporidiose du poisson

La manifestation clinique du cryptosporidiose est due suite à une forte infection par certaines espèces du *Cryptosporidium*. Les signes cliniques notés incluaient l'émaciation, les faibles taux de croissance, la distension coelomique, l'anorexie, l'apathie, des selles blanchâtres, le gonflement abdominal et l'ascite (Murphy *et al.*, 2009, Certad *et al.*, 2015).

Les taux des morbidité et mortalité sont élevés, principalement, chez les juvéniles (Murphy *et al.*, 2009). Ces effets sont renforcés dans certaines conditions d'élevage (c'est.à.dire. haute densité d'hôtes, approvisionnement en eau, température), contribuant à une mauvaise conversion alimentaire, à une faiblesse et à une sensibilité accrue à d'autres infections ou

interactions avec d'autres agents pathogènes (Álvarez-Pellitero *et al.*, 2004; Sitjà Bobadilla *et al.*, 2000).

Les espèces de *piscicryptosporidium* se localisent souvent au niveau l'estomac et les intestins (Certad *et al.*, 2015). Yang *et al.* (2016) ont décrit une espèce de piscine-*Cryptosporidium* infectant la carpe koï (*Cyprinus carpio*), provoquant de graves lésions inflammatoires granulomateuses et des granulomes dans les branchies, le foie, la rate, les reins, l'intestin et à travers la couche sous-cutanée. De plus, l'épithélium infecté par *Cryptosporidium* dans le système gastro-intestinal des poissons peut devenir nécrotique avec un écoulement des cellules épithéliales provoquant d'abondants débris cellulaires à travers la lumière (Alvarez-Pellitero et Sitjà-Bobadilla, 2002).

6 Diagnostic

L'absence de signes cliniques pathogéniques dans le cas de la cryptosporidiose (Bouزيد *et al.*, 2013). La forme de *Cryptosporidium* spp. qui est similaire à celle des composants qui sont internes, la non spécificité d'hôte-espèce *Cryptosporidium* et la possibilité d'un seul hôte peut être infecté par plusieurs espèces parasites rendent le diagnostic de laboratoire nécessaire (Lindsay *et al.*, 2000a).

6.1 Diagnostic microscopique

Cela se fait généralement par la détection (présence ou absence) d'oocystes dans les échantillons de selles par un examen microscopique des frottis colorés avec une coloration tinctoriale après avoir concentrer les oocystes qui sont retrouvés dans l'échantillon. La concentration de ces derniers se fait par l'utilisation des solutions à densité élevée (O'donoghue, 1995 ; Bouزيد *et al.*, 2013). Il est recommandé d'examiner l'échantillon le plus rapidement possible après la préparation en raison des effets délétères de ces solutions sur les oocystes (O'donoghue, 1995).

Les colorations au bleu de méthylène-safranine, Kinyoun, Ziehl-Neelsen et à la carbofuchsine-DMSO font apparaître les oocytes de *Cryptosporidium* en rouge tandis que le fond et les autres particules de l'échantillon ne sont pas colorés (Fayer *et al.*, 2000). La coloration de Ziehl-Neelsen modifiée fait apparaître les oocytes en rouge sur fond vert (figure 4) (Chalmers *et al.*, 2011). Des fluorochromes, tels que l'auramine-rhodamine et l'auramine carbofuchsine, peuvent également être utilisés, ils sont très sensibles mais demeurent coûteux. Ils font apparaître les oocystes en jaune verdâtre brillant, sur fond sombre (figure 4) (Fayer et Ungar, 1986 ; O'Donoghue, 1995 ; Chalmers *et al.*, 2011). La coloration de

dichlorohydrate de 4,6 diamidino-2-phénylindole (DAPI), colore les noyaux d'oocystes viables, ils apparaissent en bleu sous la lumière UV (figure 4) (Chalmers *et al.*, 2011).

Les oocystes peuvent apparaître sans coloration sous microscope à contraste de phase (figure 4) (Chalmers *et al.*, 2011).

Le vert de malachite, la merbromine ou la nigrosine, sont également des colorations dites « négatives », elles colorent le fond, les bactéries et les levures mais pas les oocystes. Cependant, ces techniques sont chronophages et nécessitent un manipulateur expérimenté (Fayer *et al.*, 2000). Les techniques de choix dans les laboratoires sont les colorations acidophiles (Bouزيد *et al.*, 2013).

La spécificité de la microscopie dépend en grande partie de l'habileté du microscopiste à différencier les oocystes des autres corps dans les frottis colorés avec des réactifs tinctoriaux et fluorescents non spécifiques ; les colorations immunofluorescentes sont plus spécifiques (Bouزيد *et al.*, 2013).

Les techniques microscopiques sont couramment utilisées pour le diagnostic. Cependant, pour la recherche scientifique l'utilisation d'autres techniques qui fournies des informations supplémentaires sur le *Cryptosporidium* spp. sont plus recommandées.

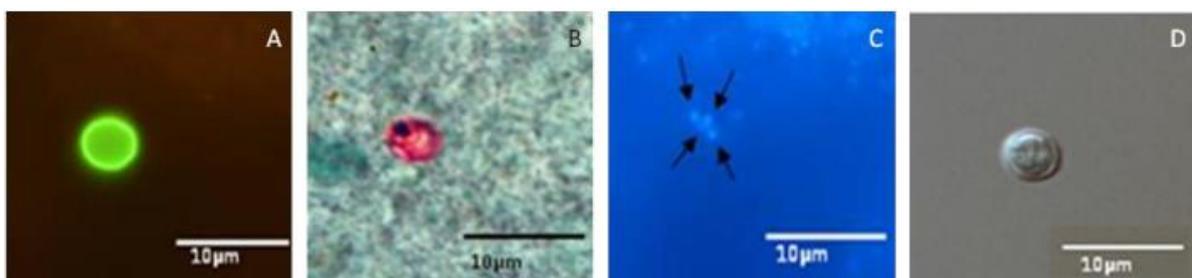


Figure 4 : Oocystes de *Cryptosporidium* observés au microscope en utilisant différentes méthodes de coloration (coloration au phénol auramine (AP) (A) colore les oocystes en vert vif, la Ziehl-Neelsen modifié (ZNm) (B) colore les oocystes en rose sur un fond bleu / vert, la DAPI colore les noyaux des oocystes viables en les faisant apparaître en bleu (C) et il est possible de visualiser les oocystes par microscopie à contraste de phase sans aucune coloration (D) (Robinson *et al.*, 2010).

6.2 Diagnostic immunologique

Ce sont des méthodes basées sur l'utilisation des anticorps polyclonaux ou monoclonaux capables de reconnaître les antigènes de surface des cryptosporidies dans les fèces ou dans des échantillons environnementaux (Jex *et al.*, 2008). Telles que les dosages immuno-enzymatiques (EIA) ou les dosages immunochromatographiques en flux latéral (ICLF) (Bouزيد *et al.*, 2013). Cependant, une réactivité croisée avec d'autres micro-organismes peut se produire en raison de la non spécificité des méthodes à base d'anticorps, ce qui peut limiter leur utilisation (Ryan *et al.*, 2018). Bien que, les méthodes immunologiques soient généralement plus sensibles que les microscopiques, mais manquent de sensibilité de celles des méthodes moléculaires. Par exemple, la sensibilité de la coloration de Ziehl-Neelsen modifiée a été rapportée à 70 - 87,5%, par rapport aux colorations immunofluorescentes (Chalmers *et al.*, 2011 ; Shimelis et Tadesse, 2014; Aghamolaie *et al.*, 2016), mais pourrait manquer plus de la moitié des cas par rapport aux méthodes moléculaires (Checkley *et al.*, 2015).

6.3 Cytométrie de flux

Il consiste à étudier des cellules isolées entraînées par un flux liquide. C'est une caractérisation individuelle, qualitative et quantitative des particules en analysant les signaux optiques ou physiques émis par ceux-ci, coupant le faisceau lumineux d'un laser. Dans le cas de la détection des oocystes de *Cryptosporidium*, le marquage de ceux-ci avec des anticorps fluorescents est effectué préalablement au passage dans le cytomètre de flux (Jex *et al.*, 2008 ; Leconte, 2013). Les techniques de cytométrie de flux et de tri cellulaire auraient une meilleure sensibilité que les techniques de microscopie conventionnelle (O'Donoghue, 1995).

6.4 Diagnostic moléculaire

Les tests moléculaires, sont des tests de confirmation appropriés. Ce sont des tests commerciaux pour la détection d'un locus bien déterminé ou bien le gène entier au sein du parasite (Bouزيد *et al.*, 2013). Il existe plusieurs méthodes de diagnostic moléculaire pour l'identification de *Cryptosporidium*. Ces dernières sont utilisées pour le génotypage, le soustypage et le typage de multi locus ou la génétique de population (Xiao, 2010).

6.4.1 Génotypage

De nombreux gènes conservés ont été ciblés dans le but de différencier les espèces. En effet, plusieurs techniques basées sur l'utilisation de l'ARN ribosomiale et notamment les petites sous unités ribosomiales, ont été développées pour l'identification des espèces de *Cryptosporidium* (Xiao *et al.*, 1999). De plus, d'autres gènes peuvent être le cible de ces techniques, par exemple les gènes codants de la protéine de choc thermique de 70 kDa (HSP70) (Sulaiman *et al.*, 2000), la protéine de paroi de l'oocyste *Cryptosporidium* (COWP) (Xiao *et al.*, 2000b) et le gène de l'actine (Kim *et al.*, 1992).

Le gène SSU rARN est un gène qui a des régions hypervariables et semi-conservées en multi-copies chez *Cryptosporidium*. En effet, dans chaque oocyste de *Cryptosporidium*, il y a 20 copies de ce gène (Le Blancq *et al.*, 1997; Morgan et Thompson, 1999). Cette nature du gène augmente la sensibilité par rapport à un gène à copie unique. En revanche, ça facilite la conception des amorces spécifiques aux espèces de genre. Par conséquent, ce gène est le plus utilisé dans le génotypage de *Cryptosporidium*. Cependant la détection des nouveaux génotypes de *Cryptosporidium* ne devrait pas basée sur la détection de ce gène, en raison de la présence des légères variations des séquences intra isolées entre les espèces et les génotypes du *Cryptosporidium* en utilisant les techniques de PCR. Ainsi, les outils de PCR basés sur d'autres gènes, en général, amplifient uniquement l'ADN de *C. parvum*, *C. hominis*, *Cryptosporidium meleagridis* et les espèces / génotypes qui sont étroitement liés à ce genre. En effet, ces outils ont une faible spécificité dans le génotypage de *Cryptosporidium* chez les animaux. D'autres techniques ont été récemment développées pour identifier le genre de *Cryptosporidium* telles que, qPCR (basée sur l'utilisation du gène Actine), PCR-RFLP (basée sur l'utilisation du gène A135 et la protéine de choc thermique 90Kda comme marqueur). Ces nouvelles méthodes sont plus simples à utiliser et moins contaminées par la PCR (Ryan *et al.*, 2014).

6.4.1.1 PCR standard et nichée

La détection du parasite par la PCR à partir d'échantillons de selles dépend d'une extraction d'ADN efficace, qui est entravée par les oocystes robustes, qui nécessitent des étapes de perturbation supplémentaire, telles que le traitement chimique, le battage des billes, les cycles de gel-dégel ou l'ébullition, pour accéder à l'ADN des sporozoïtes (Manent-Manent, 2014). L'ADN extrait des oocystes (gène ciblé) doit être amplifié. Dans la PCR standard, une paire d'amorces sens et inverse est utilisée pour amplifier un gène ou une région d'un gène, tandis que dans la PCR nichée, deux ensembles d'amorces sont utilisés. Le premier paire (externe)

amplifie le gène d'intérêt et dans un second tour ; les amorces internes amplifient une séquence plus courte de l'amplicon produit dans la première PCR. Ceci est utile si l'échantillon ne contient qu'une petite quantité d'ADN car il en résulte plus de copies d'ADN que la PCR standard, les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose et visualisés par coloration avec un colorant tel que le bromure d'éthidium qui se lie aux acides nucléiques et peut être visualisé sous lumière UV (Spano *et al.*, 1997; Sulaiman *et al.*, 1999). La principale limite réside dans le fait que seul le génotype dominant est détecté dans l'échantillon (Xiao, 2010).

6.4.1.2 PCR-RFLP

Elle est utilisée pour différencier entre les espèces de *Cryptosporidium* chez l'homme, les animaux, et dans l'eau à l'aide d'enzymes de restriction pour digérer les produits de PCR en fragments de différentes tailles. Ces fragments peuvent être visualisés sur le gel d'agarose, produisant des motifs de bandes variables selon l'espèce (Spano *et al.*, 1997; Sulaiman *et al.*, 1999, Ryan *et al.*, 2014). Cette technique est développée en 2007 pour qu'elle donne des résultats plus précis chez les ruminants (Feng *et al.* 2007).

6.4.1.3 PCR en temps réel

Elle est utilisée pour détecter et spécifier les parasites *Cryptosporidium*. Elle est considérée comme le «gold-standard» pour la détection de *Cryptosporidium* (Chalmers *et al.*, 2011). Cette méthode est la plus sensible et seulement 2 oocystes pourraient être détectés par cette dernière (Hadfield *et al.*, 2011). Dans la PCR en temps réel, l'amplification de l'ADN peut être suivie en « temps réel » et la quantité d'ADN présente peut-être quantifiée, c'est un avantage par rapport à la norme PCR qui ne peut qu'indiquer la présence d'ADN parasite mais ne peut pas quantifier la quantité (Chalmers *et al.*, 2011).

6.4.1.4 Séquençage d'ADN des produits de PCR

Les tests du séquençage d'ADN des produits de PCR de la qPCR utilisant des sondes fluorescentes et l'analyse des courbes de fusion sont fréquemment utilisés dans le génotypage de *Cryptosporidium*. En effet, le produit de PCR est purifié et réamplifié en utilisant soit les mêmes amorces dans la PCR initiale, soit des amorces spécifiquement conçues pour le séquençage et les nucléotides marqués par fluorescence. Les nucléotides marqués émettent de

la lumière à des longueurs d'onde spécifiques donnant la séquence du fragment d'ADN qui peut être analysée à l'aide de divers programmes informatiques (Chalmers *et al.*, 2011).

6.4.2 Sous typage et génétique des populations

Les techniques de sous typage sont utilisées beaucoup plus dans les études de transmission de *Cryptosporidium parvum* chez l'homme et les animaux et *Cryptosporidium hominis* chez les humains. Le séquençage d'ADN du gène gp60kDa est utilisée surtout pour identifier le sous type et sa famille des espèces de *Cryptosporidium*. Néanmoins cette technique n'est pas utile pour le sous typage des espèces de *Cryptosporidium* qui sont distantes de *C. parvum* et *C. hominis* (Ryan *et al.*, 2014). Le typage à un seul locus sousestime la diversité, car il ignore le potentiel de recombinaison génétique au sein de la population de *Cryptosporidium* spp. pendant la reproduction (Manent-Manent, 2014). Le séquençage du génome entier du *C. parvum* permet l'identification, des séquences des microsatellites et autres cibles qui ont un grand polymorphisme entre les espèces *C. parvum* et *C. hominis*. Ces derniers sont utilisés dans le typage des fragments et séquences multi locus (MLFT et MLST), pour augmenter la résolution de sous-typage par les analyses de la séquence gp60. De plus, ces données peuvent être analysées afin de déterminer le déséquilibre de liaisons et les taux de recombinaisons en utilisant divers outils informatiques spécifiques aux génétiques de population tels que DnaSP, Arlequin 3.1. Ainsi, elles sont utilisées pour la différenciation des populations (structure panmictique, structure clonale, structure épidémique, structure anclonale...) à l'aide des outils d'analyses (logiciel d'analyse de réseau eBURST) (Ryan *et al.*, 2014).

6.4.2.1 Sous typage de gp60

La protéine gp60 est exprimée à la surface des stades envahissants du parasite et est une cible pour les anticorps neutralisants (O'Connor *et al.*, 2007). Il est formé de deux glycoprotéines de surface cellulaire gp15 et gp45; la gp45 est également appelé gp40 et S45 (Strong *et al.*, 2000; Strong et Nelson, 2000; Winter *et al.*, 2000) et gp15 comme cp17 et S16 (Winter *et al.*, 2000). Le gène gp60 est similaire à un microsatellite car il contient plusieurs répétitions de trois tri-nucléotides (TCA, TCG et TCT) à l'extrémité 5' du gène. L'analyse de séquence du gène gp60 est couramment utilisée pour le génotypage des espèces de *Cryptosporidium* et souvent la gp15 est utilisée comme marqueur microsatellite pour le génotypage multilocus afin d'identifier les sous-types de *Cryptosporidium* (Strong *et al.*, 2000). En plus de la variation du nombre de répétitions trinuécléotidiques dans la région microsatellite de la gp60, il

existe également des différences de séquences importantes dans les régions non répétées du gène. Ces différences nous permettent de définir les espèces de *Cryptosporidium* en familles de sous-types (Sulaiman *et al.*, 2005); le nom des sous-types gp60 commence toujours par l'identification de la famille de sous-types, par ex. IIa (il s'agit de la famille de sous-types de *C. parvum*) suivi du nombre de répétitions TCA (A), TCG (G) et TCT (T) dans la région microsatellite (Sulaiman *et al.*, 2005). Dans certains sous-types de *C. parvum*, à l'intérieur ou immédiatement après la région microsatellite, il existe une répétition ACATCA à six paires de bases qui est comptée et représentée par «R», en outre, certains sous-types de *C. hominis* ont une répétition de 13 ou 15 paires de bases (5' -AAGACGGTGAAGG-3' / 5' -AGGACGGTGGTAAGG-3') à l'extrémité de la région microsatellitaire également représentée par «R».

Le principal avantage de l'utilisation de la gp60 comme marqueur de locus unique est que l'utilisation extensive de ce gène dans le monde signifie que des comparaisons de sous-types peuvent facilement être effectuées entre les études, les pays et les espèces hôtes. Il est également possible de lier les sous-types de la gp60 aux caractéristiques biologiques et à la maladie clinique (Xiao, 2010), car, contrairement à de nombreux autres gènes utilisés pour le sous-typage, il s'agit d'une protéine fonctionnelle qui est impliquée dans l'attachement des cellules hôtes et l'invasion parasitaire (O'Connor *et al.*, 2007). Un inconvénient de l'utilisation de ce locus unique est qu'à l'heure actuelle, il ne peut être utilisé que pour sous-typer certaines espèces (*C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. ubiquitum* et *C. cuniculus*) (thomson, 2016).

7 Traitement

Aucun traitement spécifique réellement efficace contre la cryptosporidiose (humain ou animale) jusqu'à présent. Il est possible que plusieurs facteurs soient la cause de ce manque d'efficacité des médicaments existants, comme par exemple la localisation particulière (intracellulaire mais extra-cytoplasmique) du parasite dans la cellule de l'hôte qui empêche l'action de la drogue, mais aussi l'existence chez le parasite de protéines de transport ou de pompes d'efflux qui permettent le rejet des drogues hors du parasite (Caccio et Pozio, 2006 thomson, 2016).

Les options de traitement actuelles pour la cryptosporidiose sont limitées et un seul médicament, le nitazoxanide (NTZ), a été approuvé par la FDA '**Food and Drug Administration**' des États-Unis (États-Unis). Ce médicament, cependant, ne présente qu'une

efficacité clinique modérée chez les enfants et les personnes immunocompétentes, et aucune chez les personnes vivant avec le VIH (Ryan et Hijjiwi, 2015).

8 Prophylaxie

En vue de la fréquence élevée de la cryptosporidiose et la limitation des moyens de traitement thérapeutique et de prophylaxie, il semble que le seul moyen de contrôle et de prévention de cette maladie est servi par l'assainissement. La disponibilité d'eau propre et de sanitaires, la manipulation fastidieuse des aliments et la compréhension claire des sources de *Cryptosporidium*, constituent une base pour la prévention de la transmission. La prévention, englobe l'épidémiologie qui nécessite une connaissance de la biologie et de la taxonomie des membres du genre responsable de la maladie. Comme les oocystes de nombreuses espèces sont indiscernables, les méthodes moléculaires sont essentielles pour identifier l'espèce, le génotype et le sous-type de *Cryptosporidium* afin d'identifier spécifiquement l'organisme responsable de l'infection ainsi que la source et les voies de transmission (Xiao et Feng, 2008).

— { **Partie Expérimentale** } —

I. Cadre et objectifs

Jusqu'à présent, aucune étude n'a été effectuée en Algérie sur *Cryptosporidium* chez les poissons. En effet, les données sur la prévalence sont particulièrement absentes. Ainsi, aucune information n'est fournie sur les espèces et/ou les sous espèces de ce protozoaire chez les poissons (spécifiques et/ou non spécifiques aux poissons) qui se retrouvent dans le territoire algérien.

Le présent travail a été effectué au centre et à l'est algérien et avait pour objectif général d'apporter une contribution originale à la connaissance des espèces/génotypes, et sous types de *Cryptosporidium* circulantes chez les poissons en Algérie; ainsi, d'identifier les mécanismes et les facteurs de risque pouvant influencer sur l'infection des poissons par ce pathogène.

Les objectifs spécifiques assignés dans cette étude sont :

- a. Mettre en évidence la prévalence de *Cryptosporidium* spp . en recherchant l'ADN de ce parasite dans les échantillons prélevés sur les poissons, dans le centre et l'Est d'Algérie.
- b. Déterminer les indicateurs ou les facteurs du risque susceptibles de favoriser la transmission de ce parasite.
- c. Identifier les différentes espèces/génotypes et les sous-types du *Cryptosporidium* isolés chez les poissons en utilisant les techniques avancées de la biologie moléculaire.
- d. Déterminer le rôle des poissons dans les infections humaines en identifiant les sous types des espèces zoonotiques retrouvées chez ces poissons.

{ **Matériél & Méthodes** }

II. Matériel et méthodes

II.1 Présentation de la zone d'étude

Nous avons effectué notre étude au centre et à l'Est de l'Algérie. Les lieux sur lesquels la partie expérimentale de cette étude a été réalisée sont le centre d'Algérie (wilaya d'Alger) et l'Est Algérien (les wilayas de Guelma, Souk Ahras, Mila, El-taref, Setif et khenchela).

II.1.1 Centre de l'Algérie

Des échantillons (poissons) ont été collectés auprès d'un point de vente des poissons commerciaux, en détaille, lors de la réalisation de notre recherche. Il se situe dans le centre de l'Algérie (wilaya d'Alger). En effet le centre de l'Algérie est caractérisé par une superficie de 1190 km², et une densité de 2086 habitants/km². Son climat est chaud et tempéré. La consommation de la viande du poisson est classée en première position dans le centre algérien.

Le point de vente des poissons sur lequel porte notre étude est à Alger centre. C'est un point de vente parmi les plus grands points à Alger où les poissons comestibles sont vendus aux citoyens par un personnel qui travaille toutes les heures pendant tous les jours de la semaine.

Ce point de vente est équipé de deux salles, l'une contient la chambre froide, lieu de stockage des poissons chargés auprès les fournisseurs, de la production de glace et de la conservation des poissons. L'autre salle est spécialisée de la vente. Elle a toujours une température de 18°C et les poissons sont toujours mises dans la glace, ils se sont interdites à toucher que par les membres de l'équipe de vente (figure 05). Une autre équipe de personelle est responsable du nettoyage de la salle de vente chaque 2 à 3 heures. Après la vente, le nettoyage des poissons vendus est également réalisé par l'équipe de nettoyage des poissons.

Plusieurs variétés des poissons (plus de 20 espèces), sont vendues à cet endroit. Ces dernières pourraient être sauvages ou élevés dans des élevages intensifs qui se retrouvent dans la région. En effet, au niveau de ce point de vente, seulement deux espèces de poisson ont fait l'objectif de notre étude, *Sparus auata* et *Dicentrarcus labrax* appelées communiment daurade royal et loup de mer, respectivement. La raison pour laquelle nous avons choisi ces dernières est leurs origines. Elles sont des espèces proviennes de la pisciculture algérienne suite à un élevage intensif. En effet, le détaillant, apporte quotidiennement, ces espèces auprès de 03 fermes aquacoles marines. Ces fermes sont également situées au centre de l'Algérie, notamment, dans les wilayas de Tipasa, Boumerdès et Tizi ousou. Elles sont également des zones littorales sur

lesquelles les poissons sont élevés intensivement dans des cages flottantes directement dans la mer méditerranéenne (Annexe 01).



Figure 5: Différentes espèces marines vendues au niveau du point de vente étudié (photos personnelle, 2020).

II.1.2 Est de l'Algérie

Les poissons ont été capturés à partir de six barrages d'eau, situés dans l'Est algérien qui sont Hammem Dbagh (wilaya de Guelma) (figure 6), Ain delia (wilaya de Souk Ahras), Babar (wilaya de Khenechla), El-mouene (wilaya de Sétif) et El-chafia (wilaya d'Eltarf) qui sont dirigés par une seule direction (DPRH) située dans la wilaya de Guelma, et aussi le barrage de Beni Haroun (wilaya de Mila) (figure 7). Toutes ces wilayas sont considérées comme des régions rurales par excellence. Leur climat est chaud et tempéré. De plus, elles sont caractérisées par la présence d'une grande surface d'eau douce et des eaux souterraines. En effet, les eaux des barrages étudiés sont utilisées pour l'irrigation agricole, l'alimentation des agglomérations (en eau potable), la boisson pour les animaux ainsi qu'aux activités nautiques de loisir (la baignade) et les besoins de la navigation fluviale (la pêche des animaux).



Figure 6: Barrage de Hammem Dbagh (Guelma) (photo personnelle, 2021).

A. Barrages dirigés par la DPRH de la wilaya de Guelma.

Ces dernières années, le Ministère Algérien de la pêche et des productions halieutiques (MAPRH) a concentré ses efforts sur l'élaboration d'une politique active pour le développement durable de la pêche et de l'aquaculture, en associant toutes les parties prenantes dans le développement des deux secteurs. À cet effet, la direction de la pêche et des ressources halieutiques de la wilaya de Guelma est le secteur responsable pour établir et contrôler la mise en place de la stratégie nationale du développement de la pêche et de l'aquaculture (2015-2030) dans les wilayas de l'Est Algérien suivantes : El-taref, Guelma, Souk Ahras, Tebessa, Setif et Khenechla. Parmi leurs activités dans ce contexte, elle prend la charge du transfert des poissons des écloséries vers les barrages concernés au niveau de ces wilayas (Guelma, El-taref, Tebessa, Khenechla, Sétif et Souk Ahras). De plus, elle effectue cette opération entre ces barrages où notre étude a été effectuée. Ce transfert est établi 1 à 3 fois par an en assurant les échanges des alevins et des géniteurs (Annexe 02). Le but de ces échanges est d'augmenter la capacité des barrages pour produire des poissons en plus. Ainsi, pour assurer la biodiversité dans ces barrages.

Le barrage de Hammem Dbagh est situé à 25Km du chef-lieu de la wilaya de Guelma. Il est implanté à 3 km à l'amont de la localité de Hammam Debagh, son nom est tiré de la zone des sources thermales (Hammem dbagh). Il est situé dans le sous bassin versant de l'Oued Bouhamdane et qui fait partie du grand bassin numéro 14 dénommé la Seybouse. Il a été mis en service en 1987. La superficie du bassin versant est de 1070 Km². Ce barrage est caractérisé par une capacité totale de 220 hm³, une hauteur et une longueur de 95m et de 430m, respectivement. La présence de la faune marine et l'avifaune dans le barrage est noté. Parmi les poissons qui se retrouvent dans l'eau de ce barrage sont : le barbeau, l'anguille, la

Matériel et méthodes

carpe (royal, argenté, à grande bouche et herbivore), le sandre, le gardon, la brème et le carassin. Leur mode d'élevage est extensif. En effet, la production annuelle des poissons de ce barrage est atteinte les 7 tonnes en 2015. Le barrage alimente en eau potable (AEP) les agglomérations d'Ain Hassainia, Hammam Debagh, Medjez Amar, Ben Djerrah et Guelma. Pour l'irrigation, le barrage alimente les deux périmètres irrigués Guelma-Boucheouf d'une part, dont la superficie s'étend sur 13.000 Ha, et Drean-Besbès d'autre part dans la wilaya d'El-Tarf.

Le reste des régions sur lesquelles notre étude a été portée sont les barrages de Hammam Dbagh, Ain delia, Babar, El-Maouane et Elchafia. Ces derniers sont tous dirigés par la DPRH de la wilaya de Guelma. Leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 8: Caractéristiques des barrages étudiés (dirigés par la DPRH du Guelma).

Nom	Localisation	Oued/Effluent	Capacité (m ³)	Usage	Année mise en eau
Ain delia	10km en amont de Souk Ahras 36°15'24''N, 07°49'31''E.	Oued Madjerda	121.4millions	AEP, AEI	1987
Babar	32km de l'aval de Khenechla 36°09'55''N, 07°02'06''E.	Oued El Arab	41millions	AEA	1995
El-Maouane	8 km de l'aval de Sétif 36° 09' 00" N, 5° 26' 00" E	Ighil Emda	148millions	AEP, AEA	2019
Elchafia	Eltarf 36° 36' 40" N, 8° 02' 20" E	Oued Bounamoussa	160 millions	AEP, AEA	1965

B. Barrage d'eau de Beni Haroun,

Le site de barrage de Beni Haroun est dans le nord-est de l'Algérie (wilaya de Mila) sur l'Oued Kebir à une quarantaine de km de son embouchure dans la mer méditerranée (figure 7). Le bassin total d'Oued Kebir au site du barrage couvre une superficie voisine de 7.725 Km². La superficie intéressante du barrage de Beni Haroun est de 6.595Km². L'apport annuel régularisé est estimé à 435 millions de m³. L'eau de ce barrage permet de faire face aux besoins en eau potable et industrielle de 6 wilayas suivantes (2020) ; Batna, Khenchela, Mila, Oum El Bouaghi, Constantine et Jijel (région d'El Milia). Ainsi, elle permet d'équiper de nouveaux périmètres agricoles (Teleghma, Chemoura, Batna-Ain Touta) d'une superficie totale de 29.523 Ha.

Matériel et méthodes

La faune marine dans ce barrage est élevée par le système extensif. En effet, la production annuelle des poissons en 2019 à ce barrage atteint 30 tonnes. Afin de renforcer les ressources halieutiques du plus grand barrage du pays, plusieurs espèces des poissons provenant des autres sources sontensemencées dans ce dernier. En effet, la plupart des alevins qui sont emportés au barrage sont de Sétif, Constantine, Annaba, Skikda et de Jijel. En revanche, pour diminuer les risques de mortalité des poissons du lac, le premier responsable du secteur plaide l'introduction de géniteurs d'espèces carnivores, à savoir le Sandre et le Black-bass, qui apprécient, eux, la chair du carassin, qui se nourrit essentiellement des sujets non carnassiers. Globalement, Cinq espèces de poissons d'eau douce ont été prélevées à partir des barrages étudiés, qui sont *Abramis Brama*, *Rutilus rutilus*, *Carassius carassius* et *Alburnus alburnus*.



Figure 7: Barrage de Beni Haroun (Mila) (photo personnelle, 2021).

La carte géographique ci-après démontre la localisation des différentes régions sur lesquelles notre étude est portée.

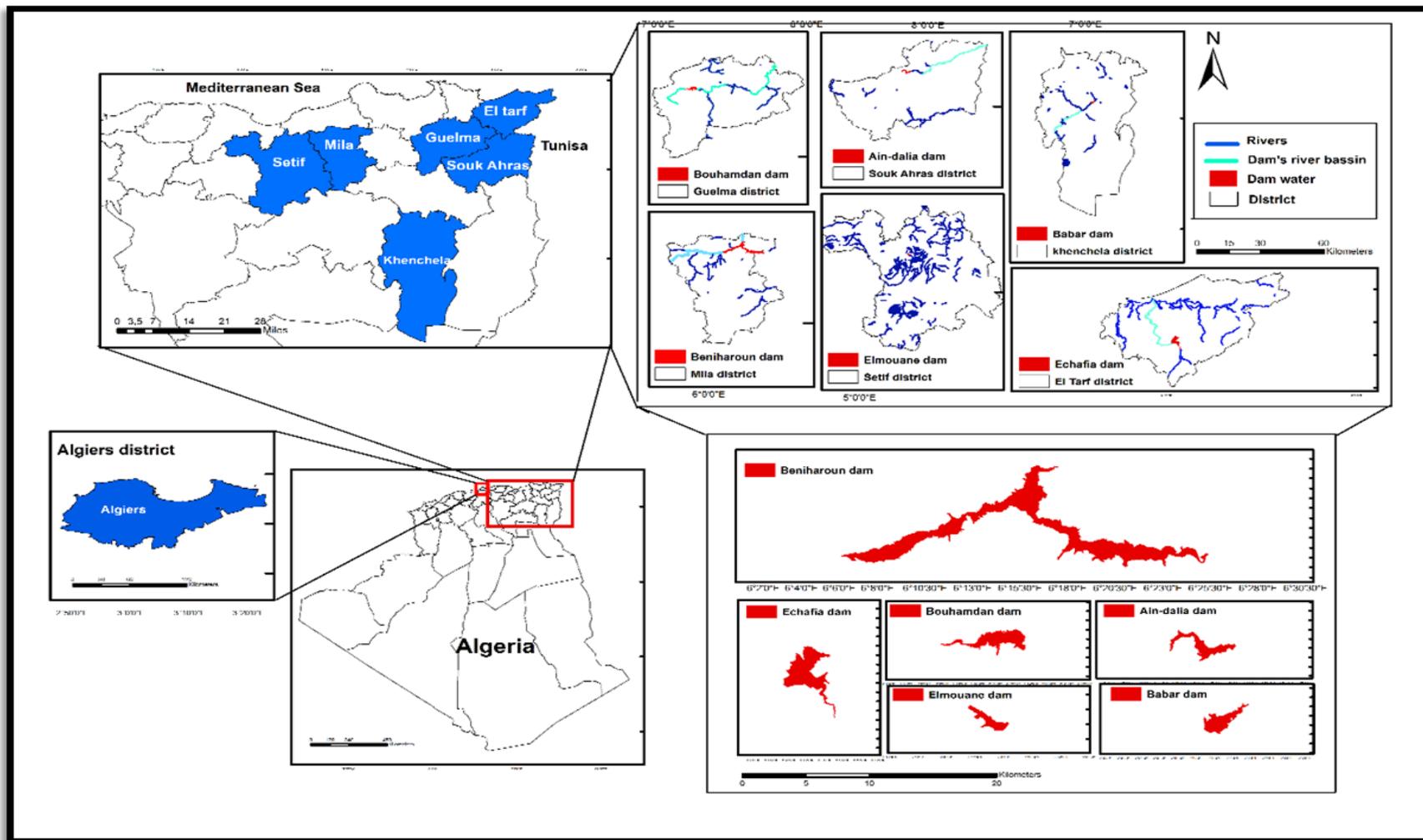


Figure 8 : Localisation de la zone d'étude.

II.2 Plan d'échantillonnage et prélèvements

Notre étude a eu lieu durant la période allant d'août 2018 jusqu'au août 2020. Le choix des poissons prélevés au sein du chaque endroit a été réalisé au hasard. Afin d'effectuer le travail au sein du centre d'Algérie, des visites mensuelles au site de notre recherche (le point de vente) ont été achevées pour prélever entre 20 à 40 poissons par mois. En effet, la période dans laquelle des poissons d'eau de mer sont prélevés, s'est étalée entre août 2018 et janvier 2019. Ensuite, le reste des échantillons a été collecté entre juin 2019 et août 2020 au niveau de toutes les régions citées précédemment dans le centre et l'Est Algérien (les 6 barrages et le point de vente). Nous avons collecté les intestins et la matière fécale de tous les poissons.

Globalement, nous avons collecté 860 poissons. En effet, au niveau du point de vente, les poissons sélectionnés par le consommateur sont nettoyés sur le même endroit par l'équipe responsable du nettoyage des poissons. Par conséquent, nous nous sommes intégrés à cette équipe pour pouvoir réaliser nos prélèvements.

Les échantillons d'eau douce ont été collectés directement par les pêcheurs en utilisant le filet maillant lors des "sorties de pêche" des travailleurs de la direction de la pêche et des ressources halieutiques de la Wilaya de Guelma (figure 9). En revanche, les pêcheurs amateurs utilisent la canne à pêche pour nous aider à prélever nos échantillons auprès du barrage de Beni Haroun.

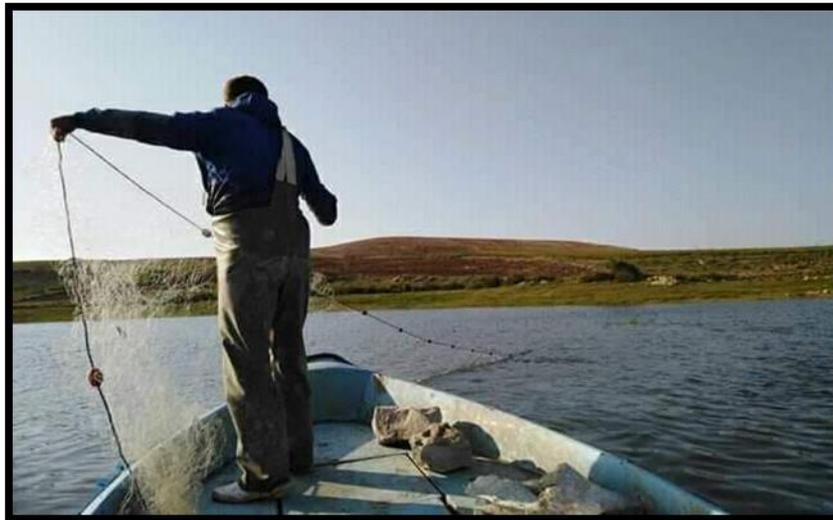


Figure 9: pêche des poissons en utilisant le filet maillant au niveau du barrage de hammam Dbagh (photo personnelle, 2021).

Les poissons capturés sont acheminés vers le laboratoire dans une glacière contenant des bacs de glace. Avant la dissection des poissons prélevés à l'aide d'un couteau stérile, chaque individu est pesé à l'aide d'une balance et mesuré de l'extrémité de la bouche jusqu'à celle de la nageoire caudal (longueur) en utilisant le ruban mètre. Le sexe a été déterminé après la dissection. En effet, les gonades mâles apparaissent aplaties de couleur blanchâtre, alors que les gonades femelles ont un aspect cylindrique de couleur assez foncée variant entre le jaune, le rouge vif et le marron selon le stade de maturité sexuelle.

Ce processus nous a permis de réaliser un échantillonnage constitué de 860 poissons. Nos prélèvements ont concerné 06 espèces de poissons pendant 24 mois d'étude auprès des sites de prélèvements.

La figure ci-après représente quelques espèces de poissons prélevés, et le tableau ci-dessous reprend le nombre des espèces prélevées dans la présente étude

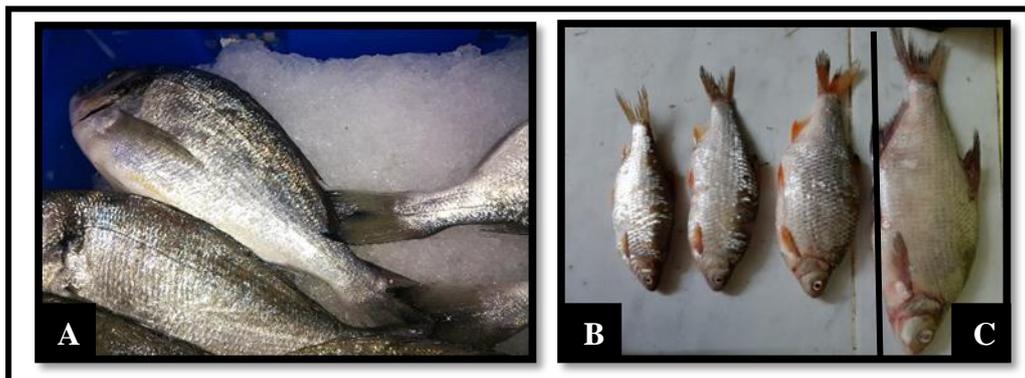


Figure 10 : Quelques espèces de poissons prélevées durant cette étude (A: dorade royal, B; gardon, C: brème) (photo personnelle, 2021).

Tableau 9: Distribution des échantillons prélevés dans les sites d'étude en fonction de la période, des espèces de poissons et de la nature des prélèvements.

Année	Site	Nombre total du poisson	Espec e prelevée	Nom commun	Nombre total/espec
2018	Point de vente	324	<i>Sparus Aurata</i>	Dorad royal	318
			<i>Dicentrarcus labrax</i>	Loup mediterrannée	06
2019	Point de vente	102	<i>Sparus Aurata</i>	Dorad royal	102
2019	Hammem Dbagh	96	<i>Abramis brama</i>	Breme	53
			<i>Carassius carassius</i>	Carassin	34
			<i>Rutilus rutilus</i>	Gardon	9
	Beni Haroun	21	<i>Abramis brama</i>	Breme	21
2020	Point de vente	44	<i>Sparus Aurata</i>	Dorad royal	44
	Hammem Dbagh	109	<i>Abramis brama</i>	Breme	37
			<i>Carassius carassius</i>	Carassin	36
			<i>Rutilus rutilus</i>	Gardon	14
			<i>Albernus albernus</i>	Sardine d'eau douce	22
	Elchafia	22	<i>Rutilus rutilus</i>	Gardon	10
			<i>Albernus albernus</i>	Sardine d'eau douce	12
	Ain Delia	84	<i>Abramis brama</i>	Breme	33
			<i>Carassius carassius</i>	Carassin	20
			<i>Rutilus rutilus</i>	Gardon	08
			<i>Albernus albernus</i>	Sardine d'eau douce	23
	Beni Haroun	19	<i>Rutilus rutilus</i>	Gardon	08
			<i>Carassius carassius</i>	Carassin	05
			<i>Abramis brama</i>	Breme	06
	Babar	04	<i>Abramis brama</i>	Breme	04
	Elmouen	35	<i>Abramis brama</i>	Breme	22
<i>Carassius carassius</i>			Carassin	03	
<i>Rutilus rutilus</i>			Gardon	10	

Les caractéristiques des poissons adultes prélevés dans ce travail, selon la littérature sont résumées dans le tableau ci-après.

Tableau 10 : Caractéristiques générales des poissons adultes prélevés (wikipédia, 2021).

Nom scientifique	Nom commun	Famille	Esperance de vie (ans)	Poids (adulte) (kg)	Longueur (cm)
<i>Sparus aurata</i>	Dorad royal	<i>Sparidae</i>	20	7-9.5	20-50
<i>Dicentrarcus labrax</i>	Loup de mer	<i>Moronidae</i>	30	1-12	30-100
<i>Abramis brama</i>	Breme	<i>Cyprinidae</i>	20-25	0.5-2.5	30-50
<i>Rutilus rutilus</i>	Gardon	<i>Cyprinidae</i>	10-14	1-2	30-35
<i>Carassius carassius</i>	Carassin	<i>Cyprinidae</i>	8-13	0.275-1.5	20-35
<i>Alburnus alburnus</i>	Ablette	<i>Cyprinidae</i>	3-6	0.01-0.05	8-18

II.2.1 Description des poissons prélevés

Les poissons prélevés dans cette étude sont essentiellement locaux (100%). Tous les poissons d'eau de mer (470/860) sont issus des élevages intensifs (54.5%), tandis que ceux des eaux douces (390/860) font partie des élevages extensifs (45.34%). L'échantillonnage comprenait 6 espèces (*alburnus alburnus*: 6.62% (57/860), *abramis brama*: 8.83% (76/860), *Rutilus Rutilus*: 6.86% (59/860), *Carassius Carassius*: 11.39% (98/860), *Sparus Aurata*: 53.95% (464/860), *Dicentrarcus Labrax*: 0.69% (6/860)). Concernant le sexe, 26.27% des mâles (226/860) et 73.72% des femelles (634/860) ont fait l'objet dans cette étude.

Le tableau suivant, reprend le pourcentage des différents caractères liés aux poissons prélevés dans ce travail. Le détail de ces caractères y figure en annexe 3.

Tableau 11: Différents caractères liés aux poissons prélevés dans cette étude

Caractère	Categorie	Nombre	Pourcentage (%)	Nbr total
Region	Alger	476	55.34	860
	Guelma	179	20.81	
	Mila	39	4.53	
	Souk Ahras	87	10.11	
	Eltaref	22	2.55	
	Khanchela	26	3.02	
	Setif	29	3.37	
Especce	<i>Sparus aurata</i>	464	53.95	860
	<i>Dicentrarcus labrax</i>	06	0.69	
	<i>Abramis brama</i>	176	20.46	
	<i>Rutilus rutilus</i>	59	6.86	
	<i>Carassius carassius</i>	98	11.39	
	<i>Alburnus alburnus</i>	57	6.62	
Type d'élevage	Extensif	390	45.34	860
	intensif	470	54.65	
Sexe	Male	226	26.27	860
	Femelle	634	73.72	
Habitat	Eau de mer	470	54.65	860
	Eau douce	390	45.34	
Saison	Eté	218	25.34	860
	Autumn	204	23.72	
	Hiver	230	26.74	
	Printemps	208	24.18	

II.2.2 Nature et préparation des prélèvements

Après la dissection des poissons et la détermination du sexe, les intestins du chaque individu ont été récupérés après l'éviscération. La matière fécale qui se retrouve à l'intérieur de ces intestins a été prélevée et mise dans des tubes eppendorfs identifiés pour chaque individu. Ces dernières sont conservées dans du dichromate de potassium à une température ambiante. Ensuite, environ 10cm des intestins recuperés précédemment a été coupé. Cette partie intestinale a été ouverte longitudinalement pour se racler à l'aide d'un bistouri désinfecté sur une planche propre (figure 11). La désinfection des bistouris et de la planche est faite par l'éthanol absolu après chaque utilisation. Le raclage intestinal obtenu (10 à 100 mg) est mis dans des tubes eppendorfs de 2.5ml identifiés (figure 11) et conservé à -20°C . Le tableau ci-dessous recapitule le nombre des échantillons prelevés (matière fécale et/ou grattage intestinal) en fonction de l'espèce du poisson.

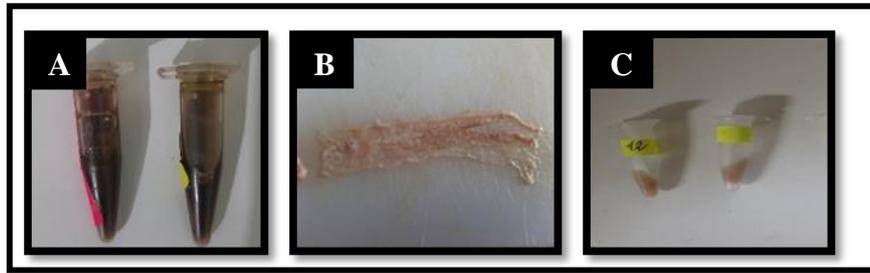


Figure 11 : Prélèvements de poissons après éviscération (A : Matière fécale, B: Fragment intestinal, C : Raclage intestinal dans des eppendorfs identifiés) (photo personnelle ; 2020).

Tableau 12 : Nombre des échantillons prélevés en fonction de l'espèce du poisson

Espèce	Nbr de MF prélevé	Nbr de GI prélevé	Total	Nbr des poissons
<i>Sparus aurata</i>	44	464	508	464
<i>Dicentrarcus labrax</i>	00	06	06	06
<i>Abramis brama</i>	157	19	176	157
<i>Rutilus rutilus</i>	59	00	59	59
<i>Carassius carassius</i>	98	76	174	98
<i>Alburnus alburnus</i>	57	00	57	57
Total	415	565	980	860

MF : Matière fécale, **GI** : grattage intestinal

II.3 Techniques d'analyse des prélèvements

II.3.1 Méthodes moléculaires

Nos échantillons ont été analysés en recherchant l'ADN des cryptosporidies présentes dans les matières fécales et/ou les intestins prélevés. Ces recherches ont été effectuées au niveau du laboratoire de parasitologie moléculaire de l'université de Kent au Royaume Unie. Les recherches moléculaires nécessitent le passage par plusieurs étapes en commençant par l'extraction de l'ADN, puis la PCR classique, ensuite le séquençage et en fin le sous-typage des espèces zoonotiques détectées dans nos prélèvements.

II.3.1.1 Extraction d'ADN

L'ADN total a été extrait à partir de nos échantillons (matières fécales et raclages intestinaux) en utilisant un Kit commercial d'isolation "PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit" (Invitrogen, Carlsbad, Californie, États-Unis) en suivant les instructions du fabricant. En effet, ce kit permet une purification de haute qualité de l'ADN, en grande quantité et en une courte période du temps.

Matériel et méthodes

Le mode opératoire de '**PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit**' est basé sur l'effet de recombinaison de la perturbation thermique, chimique et mécanique. En effet, l'opération d'extraction d'ADN correspond au *Cryptosporidium* spp. a été effectuée en 3 étapes principales précédées par l'homogénéisation des échantillons (annexe 4).

A. Mode opératoire**Etape 1 : Préparation du lysat**

La réalisation de cette étape se fait en environ 35 minutes. Nous avons procédé comme suit :

- a- Homogénéiser l'échantillon, en ajoutant 100 à 150 mg de fèces/raclage intestinal avec 700 µL de la solution 01 '**lysis buffer**' dans un tube '**bead tube**', ensuite mixer le mélange par vortex, en tournant le bouchon de tube vers le bas afin d'assurer une distribution adéquate d'échantillon dans le liquide.
- b- Ajouter 100 µL de la solution 02 '**Lysis Enhancer**', fermer le tube en toute sécurité et le vortexer brièvement.
- c- Incuber à 65 °C pendant 10 minutes.
- d- Homogénéiser encore une fois le mélange pendant 10 minutes à vitesse maximale, en utilisant le vortex avec agitation horizontale.
- e- Centrifuger à 14000 g pendant 5 minutes,
- f- Transférer jusqu'à 400 µL du surnageant dans un tube de centrifugation propre. En évitant le transfert des débris résultants de la cassure des perles contenantes dans le '**bead tube**'.
- g- Ajouter 250 µL de la solution 03 '**Cleanup buffer**' et vortexer immédiatement pour assurer une dispersion uniforme de cette solution. Cette étape aide à l'élimination des inhibiteurs de réaction comme les acides gastriques et la nourriture digérée. Centrifuger le mélange encore à 14000 g pendant 2min.
- h- Transférer 500 µL du surnageant dans un tube de centrifugation propre, en évitant le culot et les débris.

La figure ci-après reprend les étapes constitutives de la préparation du lysat.

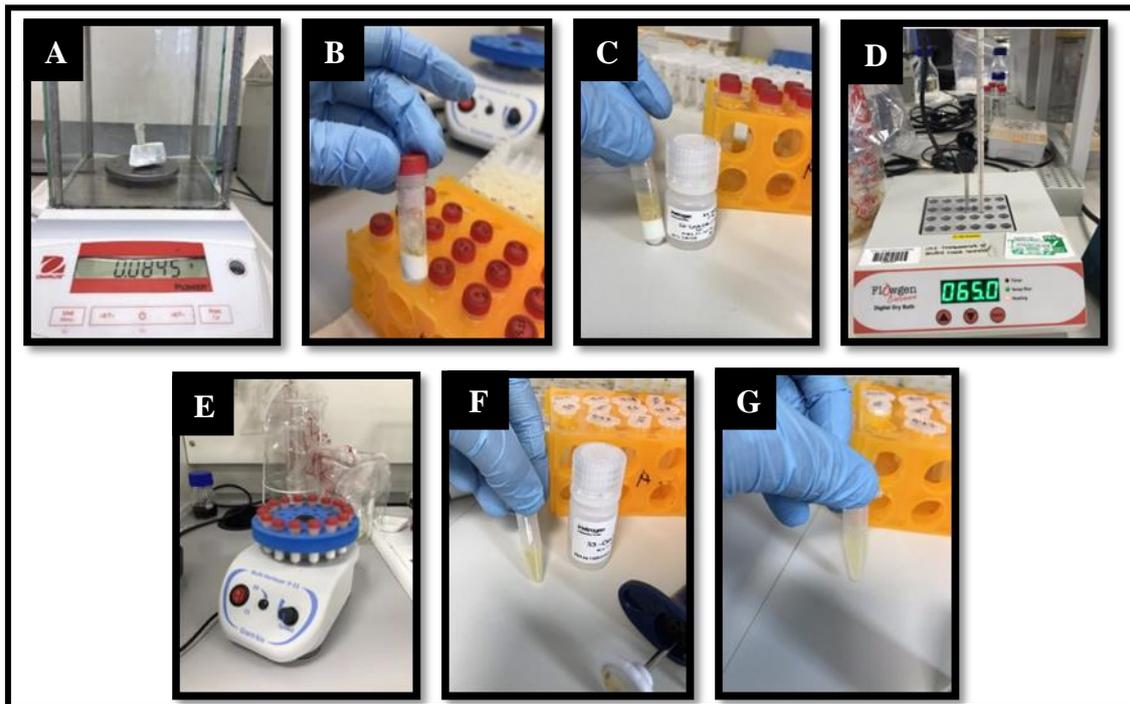


Figure 12 : Homogénéisation des échantillons et préparation du lysat (A : Pèsée de l'échantillon ; B : Rajout de **lysis buffer** dans le **bead tube** ; C : Rajout du **lysis enhancer**; D : Incubation à 65°C ; E : Homogénéisation par vortex ; F : Rajout du **clean buffer** au surnageant ; G : Récupération du surnageant après centrifugation) (photos personnelles, 2020).

Etape 02 : liaison au ‘spin column’

- a- Ajouter 900 μ l de la solution 04 ‘**Binding buffer**’ au surnageant mis dans le tube de centrifugation précédemment, et vortexer brièvement.
- b- Charger 700 μ L du mélange d'échantillon sur l'ensemble ‘**spin-column-centrifugation tube**’ et centrifuger à 14 000 g pendant 1 minute.
- c- Jeter le flux du mélange qui s'est passé à travers le **spin-column** vers le tube de centrifugation, répéter l'étape 2b avec le mélange d'échantillon restant pour que tout le mélange d'échantillon soit passé dans le tube de centrifugation en inspectant la colonne. Si l'échantillon reste dans le **spin-column**, centrifuger à nouveau à 14 000 g pendant 1 minute.

L'ensemble des différentes étapes constatatives de la liaison d'ADN extrait au **spin-column** est démontré dans la figure ci-dessous.

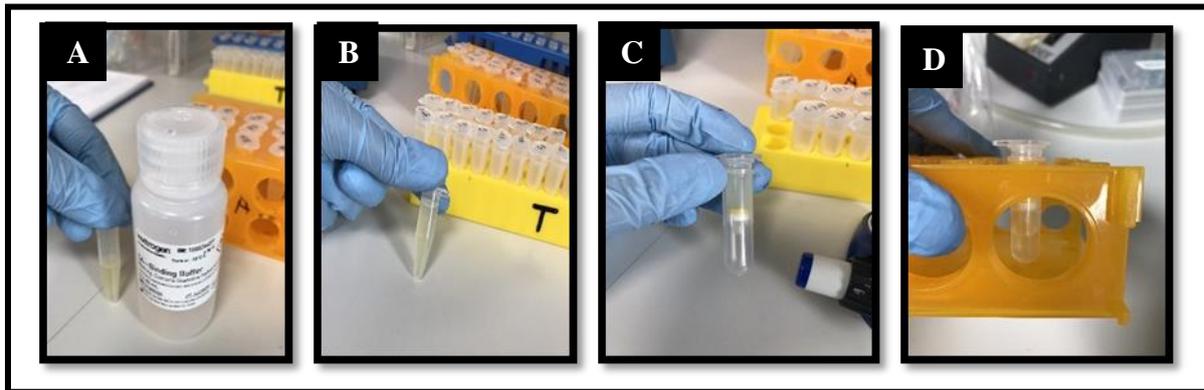


Figure 13 : Différentes étapes de la liaison d'ADN extrait par la colonne de rotation (**spin-column**) (**A et B** : Rajout de binding buffer au lysat préparé précédemment ; **C** : Transfert du mélange au **Spin column-centrifugation tube**, **D** : Infiltration du flux liquide) (photos personnelles, 2020).

Etape 03 : Lavage et élution d'ADN

- a- Placer le **spin-column** dans un tube du prélèvement propre, ajouter 500 μL de la Solution 05 '**Wash buffer**', puis centrifuger l'ensemble '**spin-column-centrifugation tube**' à 14 000 g pendant 1 minute.
- b- Jeter le flux puis centrifuger l'ensemble '**spin-column-centrifugation tube**' et centrifuger à nouveau à 14 000 g pendant 30 secondes. En effet, la deuxième centrifugation optimise l'élimination de la solution 05 qui pourrait interférer avec les applications en aval.
- c- Placer le '**spin-column**' dans un tube de centrifugation propre, ajouter 100 μL de la solution 06 '**Elution buffer**', puis incubé à température ambiante pendant 1 minute.
- d- Centrifuger l'ensemble '**spin-column-centrifugation tube**' à 14000 g pendant 1 minute, puis jeter le **spin-column**.

Afin de vérifier la réussite ou l'échec de notre manipulation. La mesure de la concentration d'ADN extrait qui se retrouve dans 2 μL du chaque échantillon a été fait par un appareil appelé **Nanodrop** (Figure 14). Ensuite, les tubes d'ADN extrait ont été conservés à une température de -20°C jusqu'à la réalisation de la réaction PCR nichée.

La figure ci-dessous résume notre démarche du lavage et élution d'ADN extrait ainsi sa concentration.

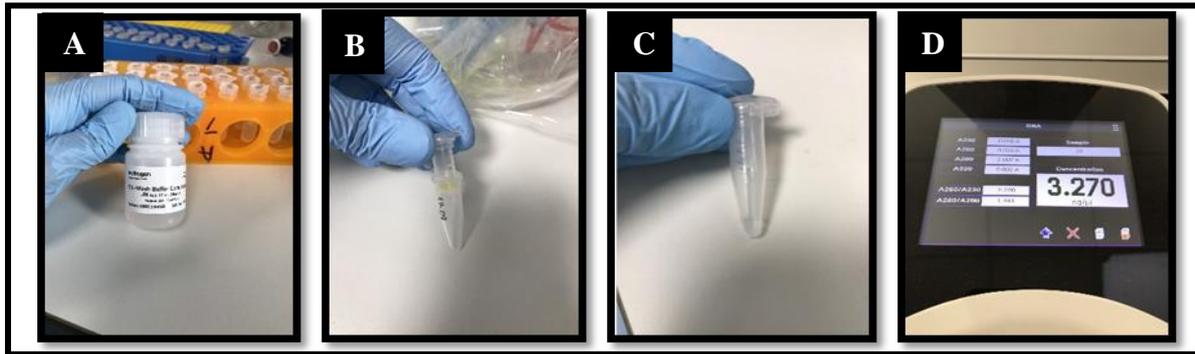


Figure 14: Etapes de lavage et élution d'ADN extrait et concentration d'ADN (A : wash buffer, B : transfert du spin-column dans un nouveau tube et le rajout du **Elution buffer**, C : ADN extrait final, D : concentration d'ADN extrait) (photos personnelle, 2020).

II.3.1.2 Amplification de l'ADN par PCR

II.3.1.2.1 Amplification du gène SSU de l'ARNr

Afin de détecter la présence éventuelle du *Cryptosporidium* spp. dans l'ADN extrait, nous avons procédé à la PCR nichée. En effet, la PCR nichée permet l'identification des cryptosporidies présentes en faible quantité dans l'échantillon analysé, en amplifiant le fragment du gène codant pour l'SSU de l'ARN (Small subunit of ribosomal RNA). Pour obtenir des meilleurs résultats, nous avons procédé à deux amplifications par PCR en utilisant des amorces différentes. Le premier type des amorces est spécifique aux espèces de *Cryptosporidium* qui sont capable d'infecter les espèces animales, et le deuxième type est spécifique aux espèces de *Cryptosporidium* qui infectent les poissons.

A. Première amplification de PCR

Elle a été déroulée en 02 phases suivies par l'électrophorèse sur gel d'agarose. En premier pas, et avant le commencement de la réaction de la PCR, un stock de 10 uM de chaque amorce principale (Forward1, Revers1, Forward2, Revers2) a été préparé (figure 15). En effet, les amorces principales sont lyophilisées à leur état initial. Pour cela, et dans des conditions stériles, nous avons rajouté 10 ul de chaque amorce (volume initial=100 uM) avec 90 ul d'eau ultra pure (miliQ water) dans un tube stérile de 1.5ml. Le tout a été mélangé puis conservé à -20°C. Cette préparation permet à diminuer les risques de contamination de la source des amorces principales. Après cela, les 2 phases de la PCR (primaire et secondaire) ont été

effectuées. En effet, le produit de la PCR primaire sera utilisé comme matrice pour la PCR secondaire.

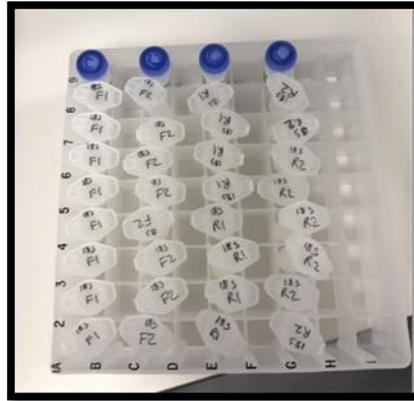


Figure 15 : Stocke de 10uM des amorces principales (Photo personnelle, 2020).

A.1 PCR Primaire

Cette réaction a pour but d'amplifier environ 723 bp de l'SSU de l'rRNA. Pour cela, nous avons utilisé les amorces spécifiques du genre *Cryptosporidium*, préparées en quantité de 10 uM auparavant, qui sont CRY_SSU_F1 et CRY_SSU_R1. Pour chaque échantillon d'ADN, nous avons mis 01ul de F1 et de R1, 01ul d'ADN, 9.5ul de **miliQ water** et 12.5ul de '**taq mastermix**' (mélange de PCR, contient des précurseurs et des enzymes dont le taq polymerase). Tout le mélange a été mis dans le thermocycleur (Figure 16). En effet, ce dernier est programmé pour effectuer l'amplification en plusieurs cycles (24 cycles) à des températures différentes pendant un délai bien précis. Chaque cycle comporte trois phases ; phase de dénaturation (94 C° pendant 50 secondes), phase d'hybridation (53 C° pendant 50 secondes) et phase d'extension (72 C° pendant 60 secondes). L'amplification est précédée par une phase initiale de dénaturation (94 C° pendant 2 minutes) et elle est terminée par une phase finale d'extension (72 C° pendant 10 minutes). Après la fin de la phase finale, le thermocycleur s'est arrêté à 12⁰C.



Figure 16 : Préparation de la PCR primaire (A: mélange de PCR (mastermix + ADN) B et C: programmation du thermocycleur dans la 1ere phase de la PCR) (Photo personnelle, 2020).

A.2 PCR secondaire

La deuxième réaction de la PCR est visée à amplifier environ 631 bp à partir d'01ul d'ADN qui a été déjà amplifiée dans la PCR primaire. Le mode opératoire suivi pour la réalisation de cette phase est similaire à celui qui a été effectué dans la PCR primaire. La différence entre les deux réactions est l'utilisation de deux autres amorces spécifiques de *Cryptosporidium* qui sont CRY_SSU_F2 et CRY_SSU_R2. Ainsi, le nombre du cycle à cette étape est de 30 cycles, aux températures de 94°C, 56°C et 72°C pendant 50 secondes, 30 secondes et 60 secondes, respectivement (figure 17).

Un control négatif composé de 01ul miliQ water (absence d'ADN) et un autre positif constitué d'ADN d'un échantillon déjà connu positif à *Cryptosporidium* sont inclus dans chaque analyse.

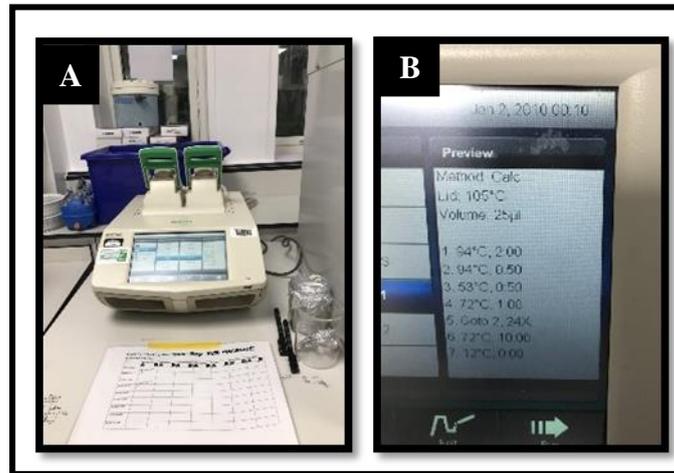


Figure 17: Programmation du thermocycleur pendant la PCR secondaire (A: thermocycleur, B: 2eme programmation du thermocycleur) (Photos personnelles, 2020).

B. Deuxieme amplification

Une deuxième amplification de ce gène par la PCR nichée a été réalisée, mais cette fois-ci, que les produits positifs de la première PCR ont fait l'objet de cette réaction (108/197). Le but de ce processus était d'avoir plus des résultats précis sur les espèces de *Cryptosporidium* qui peuvent infecter les poissons. Pour cela, nous avons utilisé des primers qui ont été déjà utilisés dans la recherche de ce parasite chez les poissons dans une étude réalisée en France par Certad *et al.* (2015). Le protocole expérimental suivi est similaire à celui de la réaction précédente en changeant quelques conditions dans la manipulation. Ce protocole ainsi la description des primers utilisés sont mentionnés en annexe 05.

II.3.1.3 Electrophorese sur gel d'agarose

Les produits issus de la PCR secondaire de *Cryptosporidium* spp. ont été fractionnés en champs du gel d'agarose à 2% avec le bromide d'ethidium. Pour cela, nous avons préparé les plateaux du gel d'agarose nécessaires, ensuite, nous avons visualisé les amplicons sous la lumière ultraviolette après avoir rajouté les produits de la PCR secondaire avec de l'ADN marqueur (**DNA lader**) sur le gel d'agarose (figure 18).

A. Mode opératoire

Pour un petit plateau (30 ml):

1. Le gel d'agarose à 2% a été préparé comme suivant ;
 - A- Mettre 0,6g d'agarose dans une fiole.
 - B- Ajouter 30ml du tampon de migration **TAE 1X**.
 - C- Placer la fiole dans la balance après avoir effectué la tare.
 - D- Faire dissoudre le mélange en utilisant la micro-onde.
 - E- Placer la fiole avec l'agarose dissous dans la même balance utilisée auparavant et ajouter suffisamment du tampon **TAE 1X** jusqu'à ce que le poids atteigne **30.6g** (une partie de l'eau s'évapore pendant le processus du réchauffement, donc cela compense la perte).
 - F- Laisser le mélange refroidir un peu et ajouter 1,5uL de bromure d'éthidium.
 - G- Agiter la fiole pour mélanger le bromure d'éthidium et verser le mélange dans un petit plateau du gel avec un peigne.
 - H- Laissez-le se solidifier.
2. Retirez délicatement le peigne et placez le gel sur l'appareil d'électrophorèse rempli du tampon **TAE 1X**.
3. Charger 5ul/puits d'amplicon du chaque échantillon (ADN produit de la PCR secondaire) et 01ul d'ADN marqueur (ADN marqueur de 100 bp).
4. Faites fonctionner le gel à 80V pendant 30 min.
5. Utilisez le système **gel-doc** pour visualiser le gel et prendre les photos révélatrices des résultats de chaque analyse.

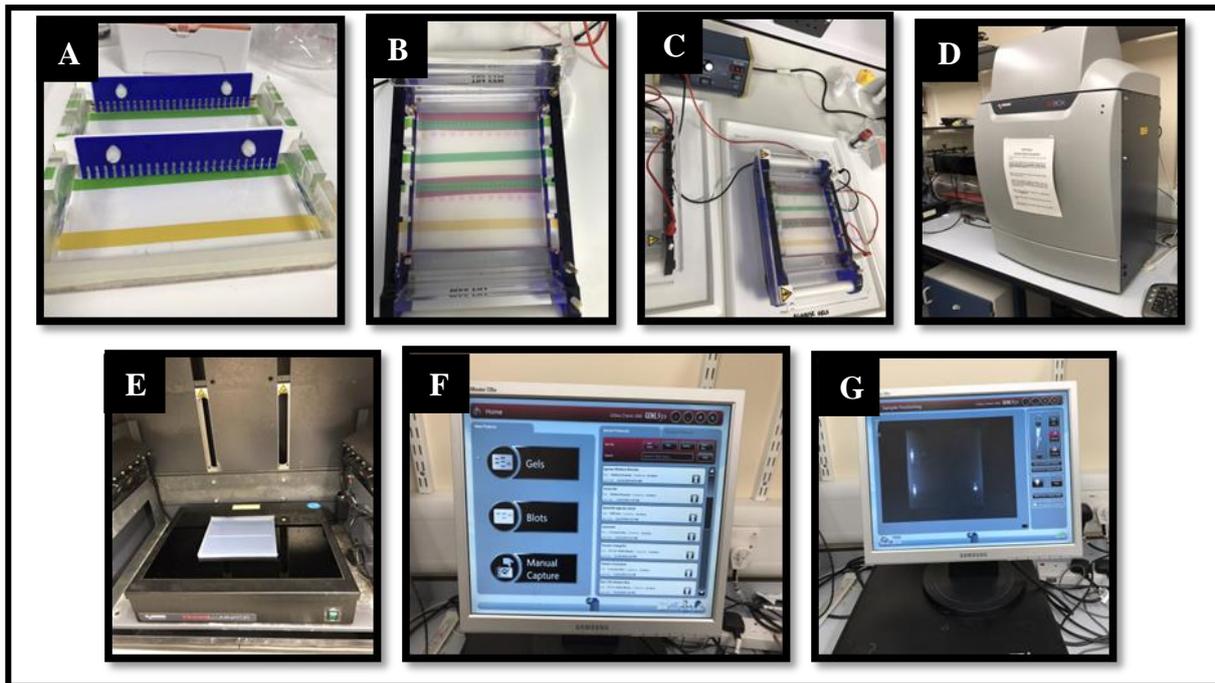


Figure 18: Électrophorèse sur gel d'agarose (**A:** Versement du mélange liquide d'agarose dans un petit plateau du gel avec des peignes, **B:** Refroidissement du gel et retraitement des peignes, **C :** Emplacement du plateau sur l'appareil d'électrophorèse, **D et E :** Transilluminateur des UV, **F et G:** Système **gel-doc**) (Photos personnelles, 2020).

II.3.1.4 Purification de l'ADN des produits de la PCR nichée

La purification de l'ADN a été réalisée par l'utilisation d'un "GeneJET™Gel Extraction Kit" en suivant les instructions du fabricant.

Les fragments du gel de la PCR secondaire positifs au *Cryptosporidium* spp. en électrophorèse ont été coupés du gel d'agarose à l'aide d'un scalpel propre sur un transilluminateur des UV (figure 19). Ils ont été mis dans des eppendorfs pré-pesés et pesés à nouveau, puis nous avons procédé comme suite :

- Ajouter le même volume du Tampon '**Binding Buffer**' au eppendorf comportant le fragment du gel d'agarose (100ul du tampon avec 100mg du fragment du gel).
- Incuber le mélange jusqu'à sa dissolution complète (à 50-60 C° pendant 10 minutes) en mélangeant le contenu par inversion toutes les quelques minutes.
- Vortexer le mélange brièvement et vérifier la couleur de la solution (couleur jaune indique un PH optimal pour la liaison de l'ADN, couleur orange ou violette nécessite l'ajout de 10µL de 3ml de la solution d'acétate de sodium (pH 5,2) et mélanger).
- Transférer 800µL du gel solubilisé (étape précédente) dans un '**spin-column-centrifugation tube**'.

- Centrifuger pendant une minute.
- Eliminer le contenu du tube et garder le '**spin-column**' dans le même tube de centrifugation.
- Ajouter 100µl du Tampon '**Binding Buffer**'.
- Centrifuger encore une fois pendant une minute.
- Eliminer le contenu du tube et garder le '**spin-column**'.
- Ajouter 700 µl du Tampon du lavage '**wash buffer**' dilué par l'éthanol 95%-100% au '**spin-column**' (9ul du tampon avec 45ul d'éthanol).
- Centrifuger pendant une minute et éliminer le contenu du tube et garder le '**spin-column**'.
- Centrifuger encore une fois pendant une minute pour éliminer complètement le tampon du lavage résiduel.
- Transférer le '**spin-column**' dans un eppendorf stérile et ajouter 50 µl de la solution "**Elution EB**".
- Centrifuger pendant une minute.
- Eliminer le '**spin-column**' et conserver l'ADN purifié à -20°C.



Figure 19: Transluminateur des UV utilisé lors du découpage des fragments du gel d'agarose positifs (photo personnelle, 2020).

II.3.1.5 Amplification du gène gp60 (glycoprotéine de surface 60)

Afin de déterminer les sous espèces et les sous génotypes des espèces et des génotypes du *Cyptosporidium* identifiées dans cette étude, tous les produits positif en 18s ont été analysés encore une fois par PCR, en amplifiant le gène codant de la glycoprotéine de surface 60. Pour cela, des amorces spécifiques (Forward et reverse) du *Cryptosporidium* ont été utilisées F1 (AL3531), R1 (AL3535), F2 (AL3532) et R2 (AL3534) (annexe 06). La réalisation de la PCR primaire et secondaire consiste à utiliser le même mode opératoire. Nous avons mis le Taq Mastermix (15uL), l'eau miliQ (11.8) et l'ADN extraité (02uL) dans un tube de PCR. Le F1 (0,6uL) et le R1 (0,6uL) ont été rajoutés au tube pour compléter le mélange correspond la PCR primaire. Concernant la PCR secondaire, nous avons mis la même mesure de F2 et de R2. Le même nombre du cycle a été programmé pour les deux réactions. En effet, cette programmation est de 35 cycles (94°C et 50°C pendant 45 secondes pour chaque degré et 72°C pendant 60 secondes). Les cycles sont précédés par la phase initiale et ils sont terminés par la phase finale pour s'arrêter à 12°C. Toujours le produit de la première réaction (ADN a environ 1000bp) est utilisé comme matrice pour la réalisation de la 2ème réaction du PCR qui donne un ADN d'environ 850bp. Le contrôle positif et négatif sont inclus dans chaque réaction.

II.3.1.6 Séquençage et analyses des séquences

Les produits de la PCR secondaire purifiés et quantifiés sont été destinés au séquençage. Le séquençage a été performé dans les deux sens avec 10ul des amorces de PCR internes (secondaire) afin de séquencer les produits de PCR-niché. Le système **ABI's 3730xl DNA analyzers** (Eurofins Genomics, Cologne, Allemagne) a été utilisé pour achever le processus de séquençage. Les séquences obtenues (les produits positifs de PCRs) ont été édités et alignés par l'utilisation d'un logiciel de séquençage d'ADN **ChromasPro. 1.5**, et parfois par le programme **Bio Edit**. Les séquences propres ont été mises dans la base des données génétiques **BLAST** pour les identifier en déterminant le degré de similarité de ces dernières avec les séquences de références, ensuite elles ont été soumissionnées sur le **GenBank** pour obtenir les **numéros d'accès** de chaque séquence identifiées.

II.4 Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel R (version 3.5.1; R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche) via RStudio (version 1.1.383, RStudio Inc., Boston, MA).

Afin de classer les poissons en fonction du poids et de la taille, ces deux paramètres ont été répartis en groupes bien différenciés par la fonction K-means non hiérarchique de r. Le nombre de grappes a été déterminé comme étant pour des groupes allant des petits poissons aux gros poissons, selon la méthode du coude (Hothorn et Everitt, 2014).

Une analyse de régression logistique univariée a été réalisée pour tous les facteurs du risque supposés ; en utilisant la fonction glm de r. Pour l'analyse des facteurs du risque, des modèles généralisés multiniveaux ont été construits par élimination progressive manuelle en arrière et le modèle multivariable final a été choisi en utilisant les critères d'information d'Akaike (AIC).

— { **Résultats & Discussion** } —

III. Résultats

III.1 Lecture sur gel d'électrophorese

L'ADN des échantillons positifs migre en même niveau que les contrôles positifs de 830bp. 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 20). Certaines bandes faiblement apparues sur le gel d'électrophorèse, ont subi une troisième rotation de PCR pour qu'elles soient plus claires (figure 21).



Figure 20 : Nested PCR de *Cryptosporidium* spp. chez les poissons par l'utilisation des amorces spécifiques du genre et la visualisation des produits en gel d'électrophorèse avec le bromure d'éthidium sous la lumière ultraviolet (- : control negatif, + : control positif, **brm192** : échantillon d'*Abramis brama* à ADN positif, **DNA lader** (ADN marqueur (100 bp) (Photo personnelle, 2021).

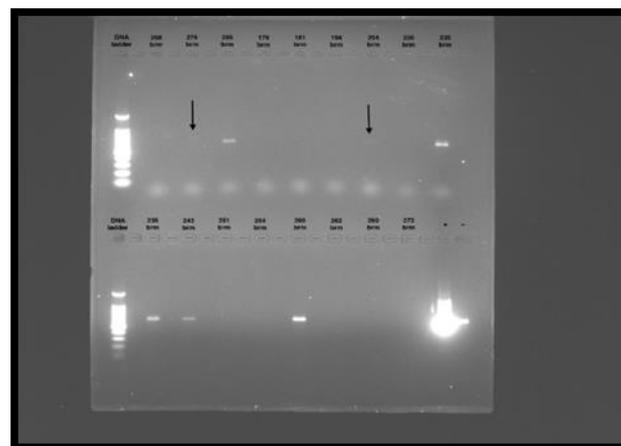


Figure 21: Bandes faibles d'ADN de nested PCR de *Cryptosporidium* spp. chez les poissons (flèches démontrent les bandes faibles sur le gel d'agarose) (photo personnelle, 2021).

III.2 Détection de *Cryptosporidium* spp. par PCR

III.2.1. Prévalence globale

Les bandes d'ADN apparues faibles (09) sont considérées comme positives après avoir obtenu les résultats de la 3^{ème} amplification par PCR du même ADN. Pour cela, au total de 980 prélèvements (Matière fécale= 415, raclage intestinal=565), 190 ont été positifs. Ainsi, les échantillons (poissons) ont été considérés positifs quand l'un des prélèvements analysés est positif. De ce fait, sur les 860 poissons examinés par PCR nichée, 173 étaient positifs, ce qui correspond à une prévalence globale de 20.11% (17.5-23.0) (figure 22). Le tableau ci-dessous reprend le nombre des échantillons positifs en fonction de la nature du prélèvement à partir de chaque espèce de poisson étudiée.

Les facteurs du risque associés à l'infection par *Cryptosporidium* spp. ont été également étudiés dans ce travail.

Tableau 13 : Nombre d'échantillons positifs en fonction de la nature de prélèvement

Espèce	N° d'échantillon	N° de MF	N° positif (MF)	N° de GI	N° positif (GI)	N° d'échantillons (Poissons)	Taux (%)
<i>Abramis brama</i>	176	157	44	19	02	46	26.13
<i>Carassius carassius</i>	98	98	41	76	13	46	46.93
<i>Rutilus rutilus</i>	59	59	11	00	00	11	18.64
<i>Alburnus alburnus</i>	57	57	28	00	00	28	49.12
<i>Sparus aurata</i>	464	44	08	464	32	39	8.40
<i>Dicentrarchus labrax</i>	06	00	00	06	03	03	50.00
Total	860	415	132	565	50	173	20.11

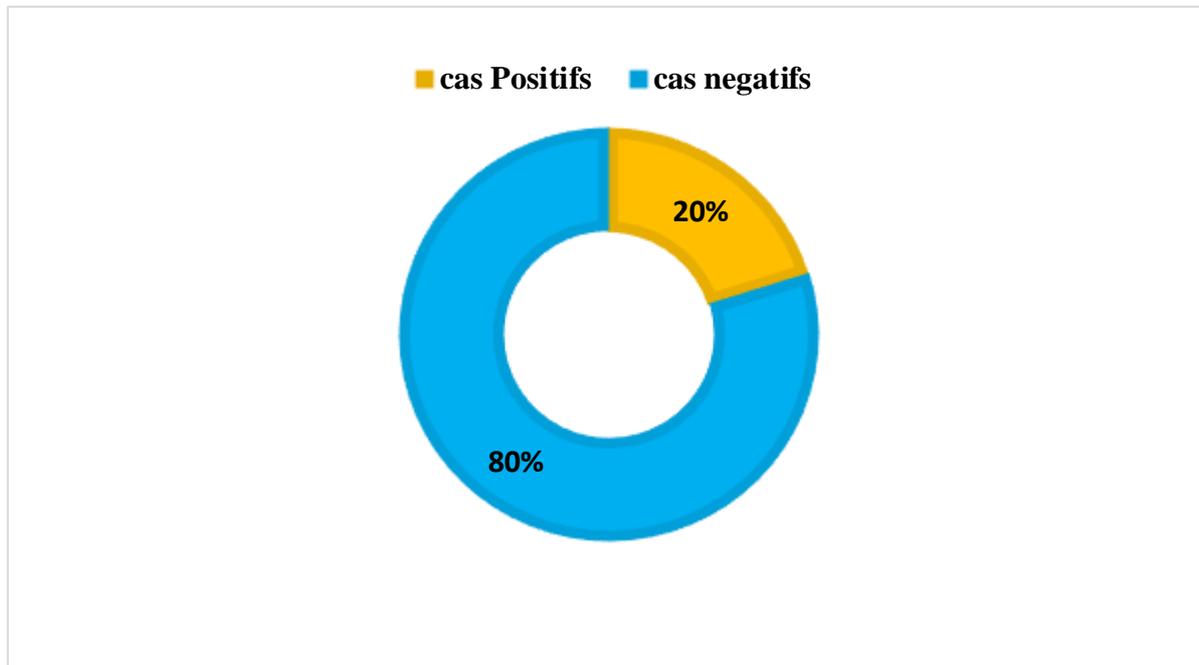


Figure 22 : Taux d'infection global de *Cryptosporidium* spp. chez les poissons par nested PCR.

III.2.2 Etude de la prévalence en fonction des facteurs de risque

Les caractéristiques des poissons (sexe, taille, habitat, espèce et type d'élevage), leurs lieux d'échantillonnage et la saison de collecte, ont été testés statistiquement pour confirmer ou nier l'influence de ces paramètres sur les infections des poissons par *Cryptosporidium* spp. Afin d'étudier le facteur "taille", nous avons appliqué le test de "clustering K-means" pour pouvoir regrouper les poissons étudiés en différentes classes en fonction du poids et de longueur du chaque individu.

III.2.2.1 Etude de regroupement des poissons prélevés

L'étude de "clustering K-means" a permis de classer les poissons étudiés en 03 groupes alliant des petits poissons jusqu'à les grands poissons, selon leurs tailles (figure 23).

Les moyens correspondants du poids et de la longueur du chaque groupe ainsi le nombre total des individus pour chaque catégorie sont démontrés dans le tableau suivant.

Tableau 14 : Classement des poissons selon la taille (Longueur-poids) en utilisant le test de clustering K-means

Categorie	Moyen du poids	SD (+/-)	Moyen de longueur	SD	Nombre des poissons
Petite taille	76.05	51.24	20.41	3.82	286
Taille moyenne	302.64	71.17	23.60	3.87	361
Grande Taille	562.33	127.25	28.43	5.20	213

SD : deviation standard

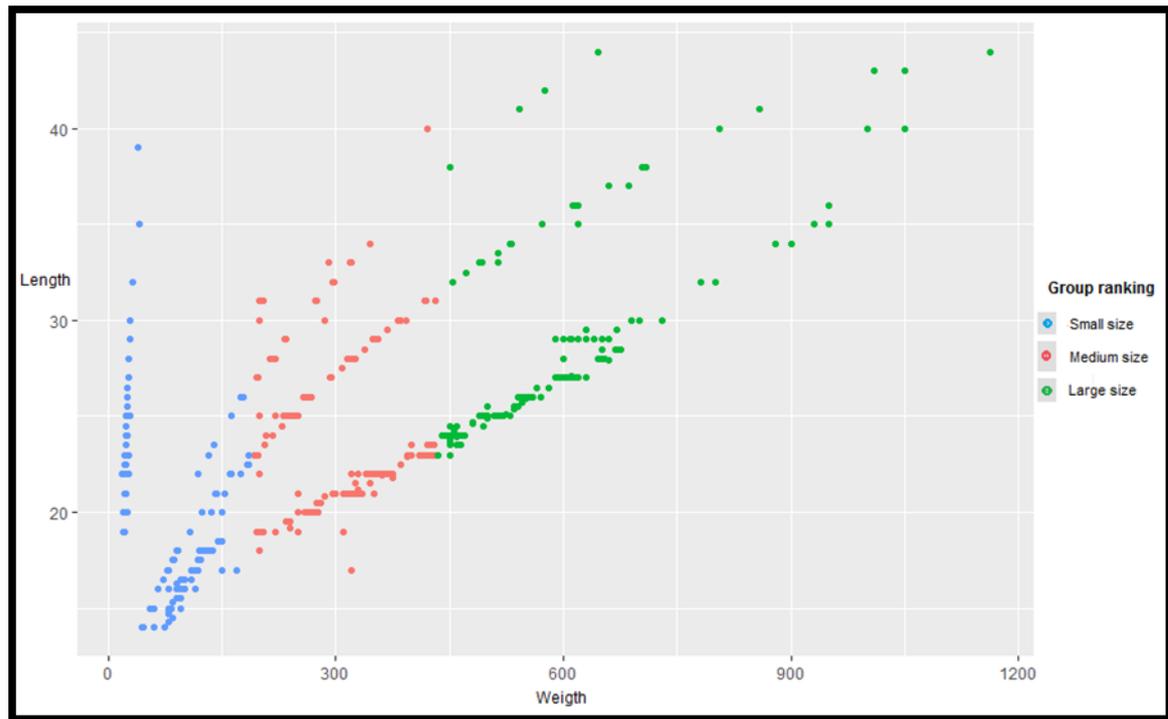


Figure 23 : Classification des poissons selon la taille (poids-longueur) par le test statistique ‘clustering K-means’ (1 : grande taille, 02 : taille moyenne, 03 : petite taille)

III.2.2.2 Analyses univariées

Nous avons vérifié l’influence des facteurs suivants : l’espèce du poisson, le sexe, la taille, l’habitat, la saison et la région d’étude sur les infections du poisson par *Cryptosporidium* spp. (Tableau 14).

Globalement, il s’est avéré que la prévalence de *Cryptosporidium* spp. varie de façon statistiquement significative en fonction de l’espèce ($p < 0.001$), l’habitat ($p < 0.001$), de la saison ($p < 0.001$), de la région d’étude ($p < 0.001$), du type d’élevage ($p < 0.001$), et de la taille des individus ($p < 0.001$). En revanche, aucune influence du sexe sur la prévalence n’a été enregistrée ($p = 0.102$) ;

- Le facteur d’espèce a été étudié pour les six espèces de poissons, et il a révélé qu’il existe une relation très significative entre l’espèce du poisson et la prévalence à *Cryptosporidium* spp. ($p < 0.001$). En effet, les prévalences étaient : 50% (3/6) ; 49.12% (28/57) ; 46.93% (46/98) ; 26.13% (46/176) ; 18.64% (11/59) et 8.40% (39/464) chez le *Dicentrarcus labrax*, *Alburnus alburnus*, *Carassius carassius*, *Abramis brama*, *Rutilus rutilus* et *Sparus aurata* respectivement (figure 25).

- Le facteur d'habitat a été également étudié pour tous les individus et il s'est avéré qu'il influence très significativement (<0.001) sur les infections à *Cryptosporidium* spp. En effet, les poissons d'eau douce présentent une positivité (33.58%) plus élevée que ceux élevés en eau de mer qui présentent uniquement 8.93% des cas positifs (figure 26).
- La taille des poissons est statistiquement significative. Les poissons de petite taille (30.06%) sont plus infectés par *Cryptosporidium* spp. par rapport à ceux de grande taille (12.67%) et ceux de taille moyenne (16.62%) (figure 24).
- Si on considère la prévalence en fonction de la saison de prélèvements, on remarque qu'il y a une influence très significative sur la prévalence de *Cryptosporidium* spp. ($p < 0.001$). Le taux de prévalence est nettement plus élevé en printemps (36.06%) et en été (33.03%) par rapport en automne et en hiver, où on enregistre des prévalences de 7.84% et 4.35%, respectivement (figure 27).
- En outre, la prévalence de *Cryptosporidium* spp. varie de façon significative en fonction de la région investiguée ($p < 0.001$). La région de l'Est d'Algérie présente le taux de prévalence le plus élevé par rapport au centre d'Algérie, où nous avons enregistré 33.58% et 8.93%, respectivement (figure 28).
- Le système d'élevage aussi était objectif pour chercher l'influence de ce dernier sur les infections à *Cryptosporidium* spp. chez les poissons. Nos résultats ont montré que la différence entre les taux d'infection dans le système extensif (33.58%) et intensif (8.93%) est statistiquement significative (figure 29).

Tableau 15: Facteurs de risque associés à l’infection par *Cryptosporidium* spp. dans ce travail.

Variables	Catégorie	Fréquences observées			Prévalence (%) (IC95%)	Valeur « P »	Signifi- cation
		Total	Positif	Négatif			
Sexe	Mâle	226	37	189	16.37 (12.12-21.75)	0.103	NS
	Femelle	634	136	498	21.45 (18.43-24.81)		
Taille	Petite taille	286	86	200	30.06 (24.76-35.3827)	<0.001	S
	Taille moyenne	361	60	301	16.62 (13.14-20.81)		
	Grande taille	213	27	186	12.67 (8.86-17.81)		
Espèce du poisson	<i>Alburnus alburnus</i>	57	28	29	49.1 (36.62-61.74)	<0.001	S
	<i>Abramis brama</i>	176	46	130	26.13 (19.64-32.63)		
	<i>Dicentrarcus labrax</i>	6	3	3	50 (9.99-90.01)		
	<i>Rutilus rutilus et</i>	59	11	48	18.64 (8.71-28.58)		
	<i>Sparus aurata</i>	464	43	424	8.40 (6.21-11.28)		
	<i>Carassius carassius</i>	98	47	51	46.93 (38.07-57.85)		
Habitat	Eau de mer	470	42	428	8.93 (6.70-11.86)	<0.001	S
	Eau douce	390	131	259	33.58 (29.08-38.42)		
Saison	Hiver	230	10	223	4.35 (2.38-7.82)	<0.001	S
	Printemps	208	75	205	36.06 (29.84-42.78)		
	Été	218	72	146	33.03 (27.13-39.52)		
	Automne	204	16	188	7.84 (5.00-12.36)		
Origine	Est	390	131	259	33.58 (29.08-38.42)	<0.001	S
	Centre	470	42	428	8.93 (6.70-11.86)		
Système d'élevage	Intensif	470	42	428	8.93 (6.70-11.86)	<0.001	S
	Extensif	390	131	259	33.58 (29.08-38.42)		

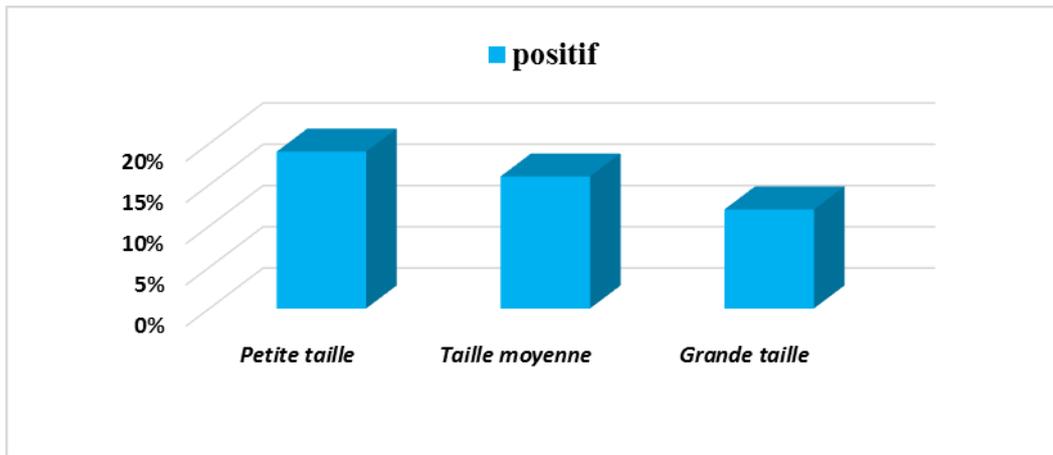


Figure 24 : Prévalence de l'infection par *Cryptosporidium* spp. en fonction de la taille (poids-longueur) des poissons étudiés

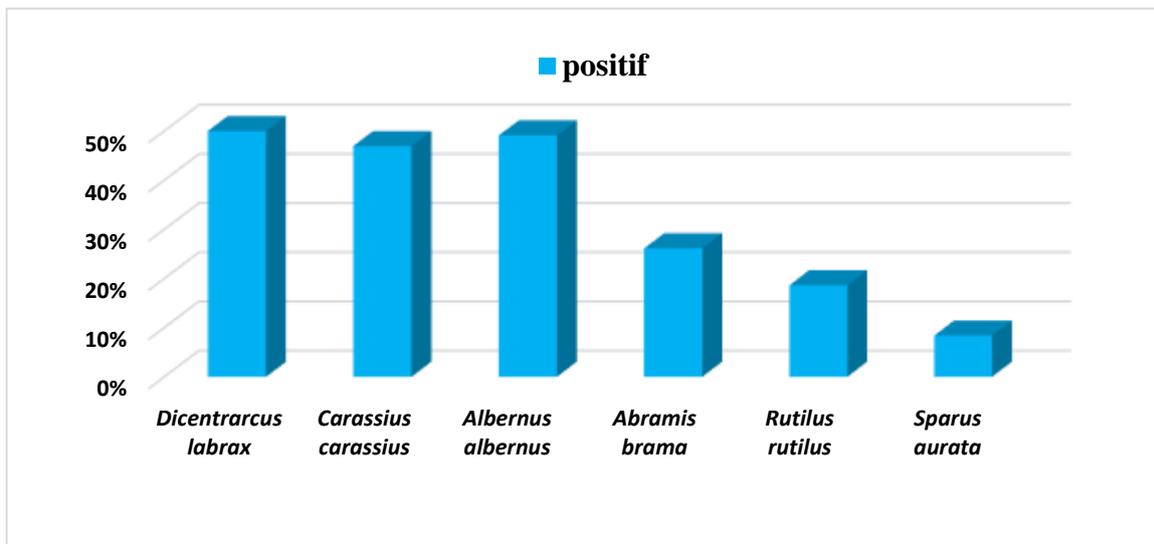


Figure 25 : Prévalence de l'infection par *Cryptosporidium* spp. en fonction des espèces de poissons étudiées

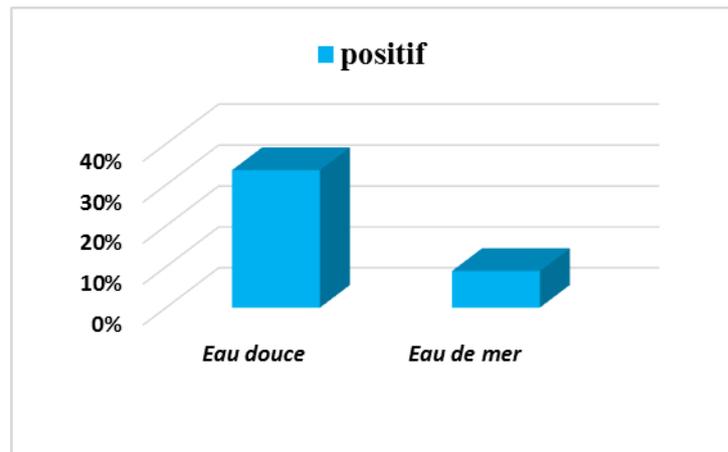


Figure 26 : Prévalence de l'infection par *Cryptosporidium* spp. en fonction de l'habitat des poissons étudiés

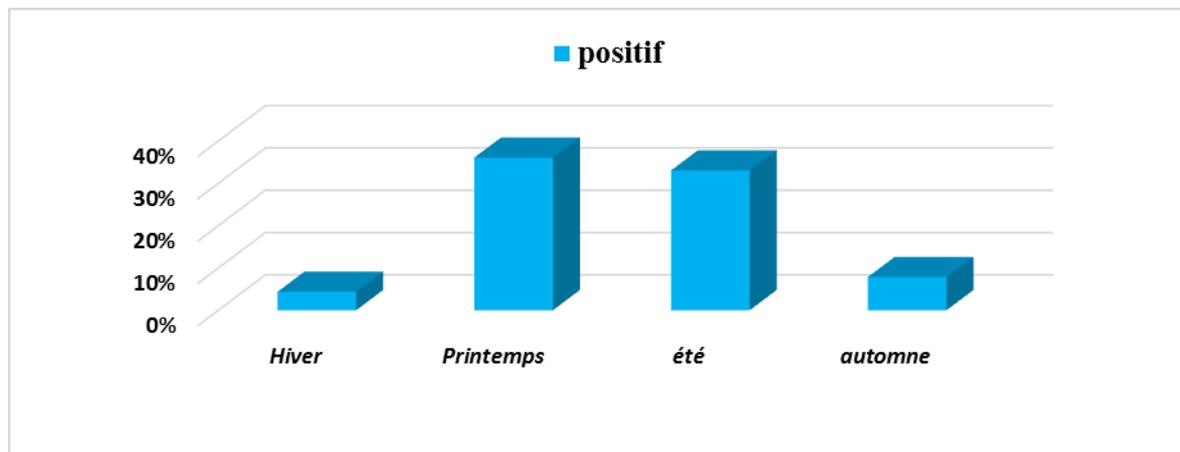


Figure 27 : Prévalence de l'infection par *Cryptosporidium* spp. chez les poissons étudiés en fonction de la saison

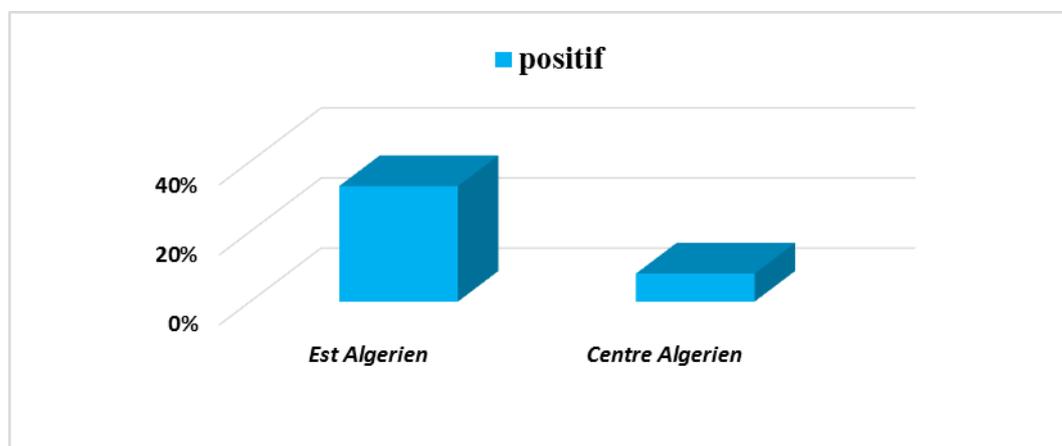


Figure 28: Prévalence de l'infection par *Cryptosporidium* spp. chez les poissons étudiés en fonction de la région étudiée

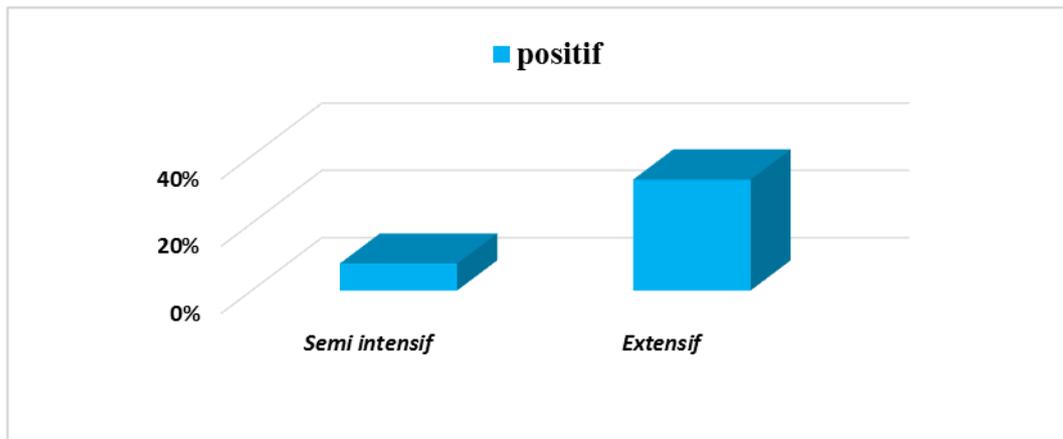


Figure 29 : Prévalence de l'infection par *Cryptosporidium* spp. chez les poissons en fonction du système d'élevage..

III.2.2.3 Analyse de régression logistique multivariée

Cette analyse nous a permis d'étudier les facteurs qui semblent augmenter le risque de la positivité vis-à-vis de *Cryptosporidium* spp. en associant tous les facteurs significatifs de la première analyse. Ainsi, avoir une idée sur les chances d'une variable à attraper l'infection par rapport aux autres variables dans le même facteur étudié en calculant l'odd ratio. Le tableau 16, résume tous les résultats obtenus dans l'analyse multivariée des facteurs du risque liés à l'infection à *Cryptosporidium* spp. En effet, il semble que seulement l'espèce et la saison ont une influence significative sur les infections des poissons par les espèces de *Cryptosporidium*. En revanche, nos résultats montrent que l'espèce '*Dicentriscus labrax*' est l'espèce la plus infectée par rapport aux autres espèces. D'autre part, le gardon (*Rutilus rutilus*) est l'espèce la moins susceptible d'être infectée par le parasite que les autres espèces des poissons étudiés. Ainsi, les infections en printemps et en été sont plus élevées de 10.30 et 8.91 fois, respectivement, que les autres saisons.

Tableau 16: Analyse de la régression logistique multivariée des facteurs du risque liés à l’infection par *Cryptosporidium* spp.

Facteurs	Categorie	Estimation (SE)	OR (95% CI)	Valeur de P
Espèces	<i>Abramis brama</i>	-2.72 (0.92)	0.06 (0.01-0.42)	0.003**
	<i>Carassius carassius</i>	-1.94 (0.93)	0.14 (0.02-0.94)	0.037*
	<i>albernus albernus</i>	-1.86 (0.94)	0.15 (0.02-1.04)	0.049*
	<i>Rutilus rutilus</i>	-3.30 (0.96)	0.03 (0.00- 0.255)	0.0006***
	<i>Sparus aurata</i>	-2.65 (0.86)	0.07 (0.01-0.41)	0.002**
	<i>Dicentrircus labrax</i>	Reference		
Saison	Automne	0.43 (0.43)	1.54 (0.66-3.70)	0.312
	Eté	2.18 (0.45)	8.91 (3.72-22.6)	1.67e-06***
	printemps	2.33 (0.42)	10.30 (4.57-24.69)	4.63e-08***
	Hiver	Reference		

Signification des codes: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1.

III.3 Genotype

III.3.1 Séquençage de l'ADN positif et obtention des séquences nucléotidiques

Les produits positifs (l'ADN) de l'amplification par PCR du gène ciblé (SSU18) ont été coupés du gel d'électrophorèse et purifiés afin de les envoyer au séquençage. Le séquençage a été performé en double direction en utilisant des Kits spécifiques et des amorces de la PCR secondaire. Le séquenceur permet la visualisation de l'ADN sous forme d'un chromatogramme. La lecture de ce dernier se fait par l'utilisation de deux programmes spécifiques ; **chromasPro** et **bioEdit**. La figure (30) représente un chromatogramme d'un ADN positif isolé dans la présente étude (séquence de 617 bp), dont chaque onde avec sa couleur correspond à l'un des nucléotides A, T, C et G.

L'espèce ou le génotype de *Cryptosporidium* est identifié par la lecture de la séquence finale. Cette dernière est produite par le clippage de la séquence initiale qui a été représentée par l'ensemble des nucléotides obtenus durant le séquençage. L'obtention de la séquence finale est faite à l'aide du programme bio-informatique **BioEdit** ou **chromas pro**. La figure 30 représente l'amplification par PCR Nichée d'un fragment (longueur = 630 bp) du gène codant pour SSU rRNA. La longueur du fragment obtenu après l'analyse est de 591 bp, ce qui correspond au nombre total 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.

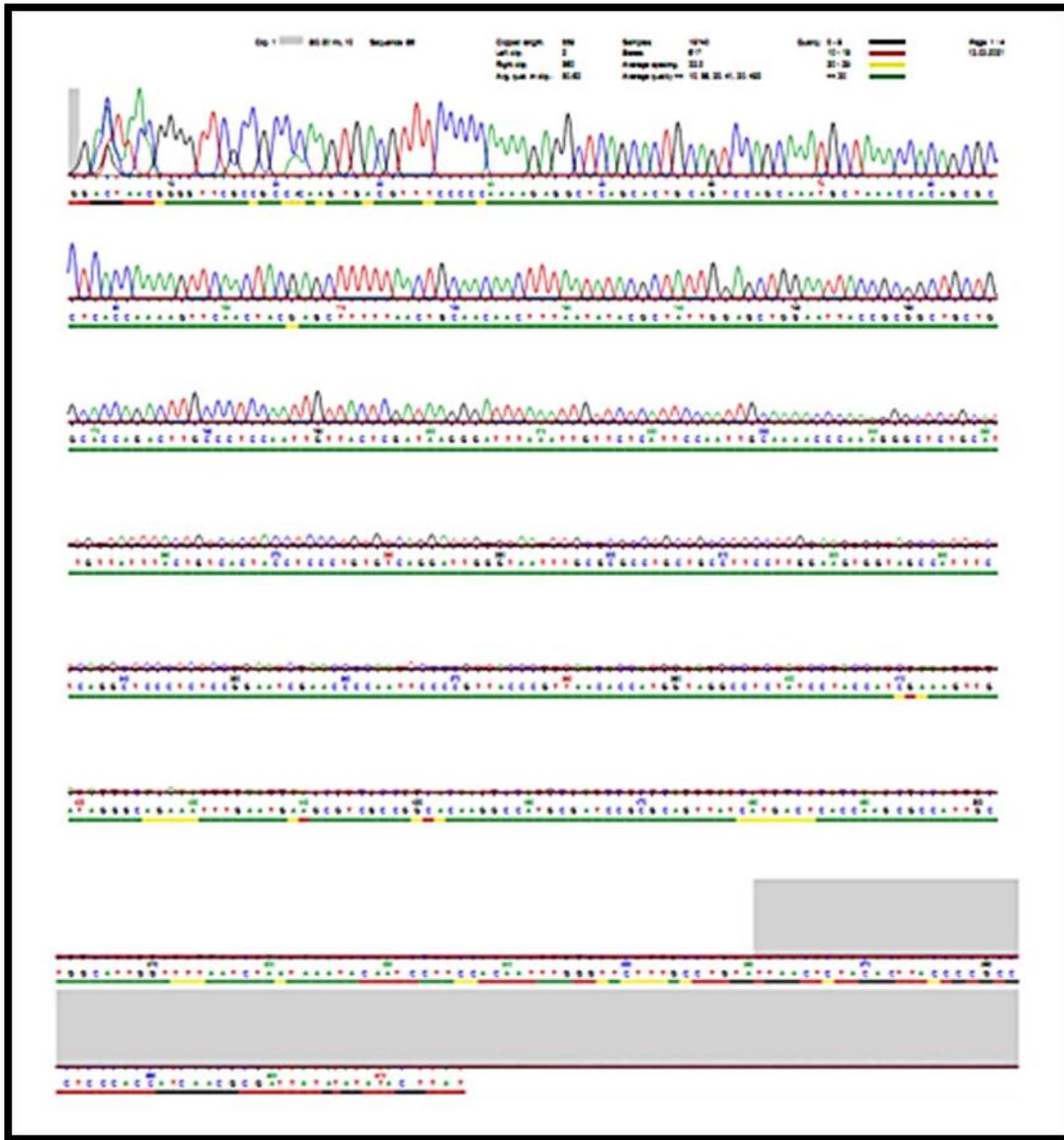


Figure 30: Séquençage de l'AND positif par l'intermédiaire de **ABI's 3730xl DNA analyzers** et la lecture de la séquence par le programme **ChromasPro** (séquence de 617 bp) (séquence de 617 bp) (Photo personnelle, 2021).

```

1   ACTAAAATATATAGTAATATGAATTATGTTAATAITATATAAAATATTCATCAAATATTT   60
61  TATATAAATTATTAACAGAAATCCAACTACGAGCTTTTTAACTGCAACAACTTTAATATA   120
121 CGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCCAATTGATACT   180
181 TGTAAAGGGGTTTATACTTAACTCATTCCAATTACAAAACCAAAAAGTCCTGTATTGTTA   240
241 TTTCTTGTCACTACCTCCCTGTATTAGGATTGGGTAATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT   300
301 AGATGTGGTAGCCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACCTAATCCCGTTACC   360
361 CGTCATTGCCACGGTAGGCCAATACCCTACCGTCTAAAGCTGATAGGTCAGAACTTGAA   420
421 TGATATGTCACATTTAATGTGATCCGTAAAGTTATTATGAGTCAACCAATTATATTGGTTC   480
481 TTTAICTAATAAATACAACCTTCCATAAAGTCGAGTTTTTTTCGCATGTATTAGCTCTAG   540
541 AATTACCACGGTTATCCATGTAAGTAAAGATTATCAAGTAAACTATAACTG   591

```

Figure 31: Séquence finale d'un cas positif, obtenue après l'analyse de la séquence Initiale par des programmes bio-informatiques et déposée dans la base des données génétiques (**GenBank**) (Photo personnelle, 2021).

III.3.4 Espèces de *Cryptosporidium* identifiées chez les poissons

La comparaison des séquences nucléotidiques obtenues dans notre étude avec les séquences de références déposées dans la base des données génétiques ‘‘**GenBank**’’, nous a permis de déterminer les espèces identifiées dans ce travail. Globalement, les 182 échantillons positifs au locus de l'rRNA SSU ont donné seulement 04 séquences propres. En effet, ces séquences sont issues de la première amplification de la PCR (03 séquences/182) (isolats 14.17, 14.11, 26spa) et de la deuxième amplification de la PCR (01 séquence/30) (82car). Malheureusement, les autres amplicons (178/182) ont produit des chromatogrammes chevauchés lors du séquençage, probablement en raison du haut niveau des infections mixtes. Ce qui fait, globalement, 04/182 (2.19% ; 0.06-4.15 IC) séquences propres qui pourraient être utilisées dans l'identification des espèces du *Cryptosporidium* dans ce travail. Celles-ci ont été toutes identifiées comme étant 100% *C. parvum* l'espèce zoonotique. Les isolats séquencés avec succès provenaient de deux espèces de poissons étudiés dans le présent travail : *Sparus aurata* et *Carasius carassius*.

Le tableau ci-dessous représente les espèces identifiées de *Cryptosporidium* dans la présente étude.

Tableau 17: Espèces de *Cryptosporidium* identifiées au locus 18s.

Test d'amplification	Code d'isolat	Type d'échantillon	Especie de poisson	Espèces infectantes
PCR (premiere amplification)	14.17	Grattage intestinal	<i>Sparus Aurata</i>	<i>C. parvum</i>
	14.11	Grattage intestinal	<i>Sparus Aurata</i>	
	26spa	Matière fecale	<i>Sparus Aurata</i>	
PCR (deuxieme amplification)	82car	Matière fecale	<i>Carassius Carassius</i>	

III.3.4.1 Comparaison entre les séquences obtenues et les séquences de référence

Les séquences d'ADN du gène codant pour SSU rDNA d'espèce de *Cryptosporidium parvum* identifiées 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 séquences partielles des isolats 26 spa et 14.17 ont montré 100% de similarité avec les séquences de référence de *C. parvum* (numéro d'accès **GenBank** : MT648442 et AB513876, respectivement) (figure 32 et 33). En effet, l'origine de ces isolats de référence est les bovins pour la première séquence, et les struthios (l'Autriche) pour la deuxième séquence. Concernant la séquence partielle de l'isolat 14.11, elle avait 3 SNPs et présentait une similarité de 99,38% avec la séquence de référence de *C. parvum* (numéro d'accès **GenBank** : KM199755) (figure 34), originaire des caprins. La séquence de l'ADN de l'isolat 82car est similaire de 99.82% à la séquence de référence MG516754.1 d'origine bovine avec une seule SNP entre les deux séquences (figure 35).

Les résultats sont mentionnés dans le tableau 18.

Tableau 18: Identité de *C. parvum* isolée chez les espèces des poissons infectés

Espece de poisson	Séquence identifiée (numéro d'accès)	Espèce infectant	Séquence de référence (numéro d'accès)	N° SNPs	Origine des isolats de référence	Similarité (%)
<i>Sparus aurata</i>	Seq1=14.17 (OL774798)	<i>C. parvum</i>	AB513876	00	Bovin	100
	Seq2= 26spa (OL77479)	<i>C. parvum</i>	MT648442	00	Struthio	100
	Seq3=14.11 (OL774800)	<i>C. parvum</i>	KM199755.1	03	Caprin	99.38
<i>Carassius carassius</i>	Seq4=82car	<i>C. parvum</i>	MG516754.1	01	Bovin	99.82

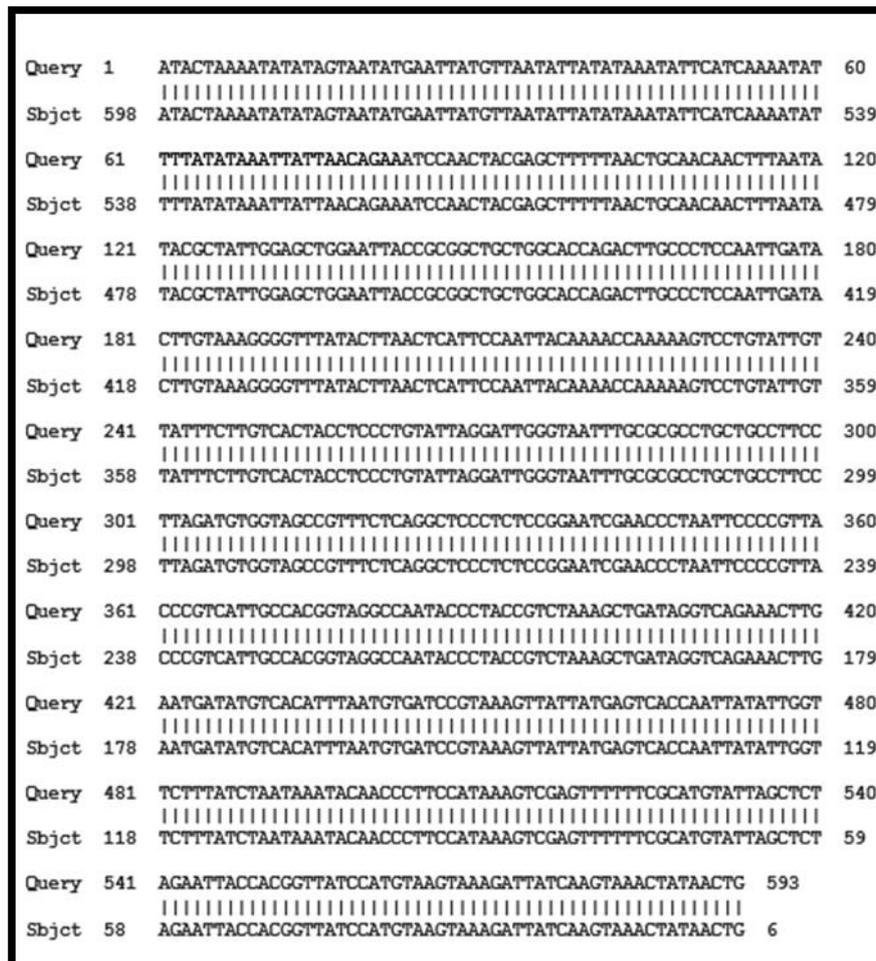


Figure 32 : Analyse BLAST de la séquence du gène SSU de l'échantillon 14.17 et la comparaison avec la séquence de référence de **GenBank** (n° d'accès AB513876.1) (Query cover: 100%; Per ident 100%).

```

Query 1  AAATATATAGTAATATGAATTATGTTAATATTATATAAAATATTCATCAAAATATTTTATA 60
          |||
Sbjct 502 AAATATATAGTAATATGAATTATGTTAATATTATATAAAATATTCATCAAAATATTTTATA 443

Query 61  TAAATTATTAACAGAAATCCAACACTACGAGCTTTTAACTGCAACAACCTTAAATATACGCT 120
          |||
Sbjct 442 TAAATTATTAACAGAAATCCAACACTACGAGCTTTTAACTGCAACAACCTTAAATATACGCT 383

Query 121 ATTGGAGCTGGAATTACCGGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCCAATTGATACTTGTA 180
          |||
Sbjct 382 ATTGGAGCTGGAATTACCGGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCCAATTGATACTTGTA 323

Query 181  AAGGGGTTTATACTTAATCATTCCAATTACAAAACCAAAAAGTCTGTATTGTTATTTTC 240
          |||
Sbjct 322  AAGGGGTTTATACTTAATCATTCCAATTACAAAACCAAAAAGTCTGTATTGTTATTTTC 263

Query 241  TTGTCACCTACCTCCCTGTATTAGGATTGGGTAATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTTAGAT 300
          |||
Sbjct 262  TTGTCACCTACCTCCCTGTATTAGGATTGGGTAATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTTAGAT 203

Query 301  GTGGTAGCCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACCTAATCCCGTTACCCGTC 360
          |||
Sbjct 202  GTGGTAGCCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACCTAATCCCGTTACCCGTC 143

Query 361  ATTGCC 366
          |||
Sbjct 142  ATTGCC 137
    
```

Figure 33 : Analyse BLAST de la séquence du gène SSU de l'échantillon 26SPA et comparaison avec la séquence de référence de **GenBank** (n° d'accès MT648442.1) (Query cover: 100%; Per ident 100%).

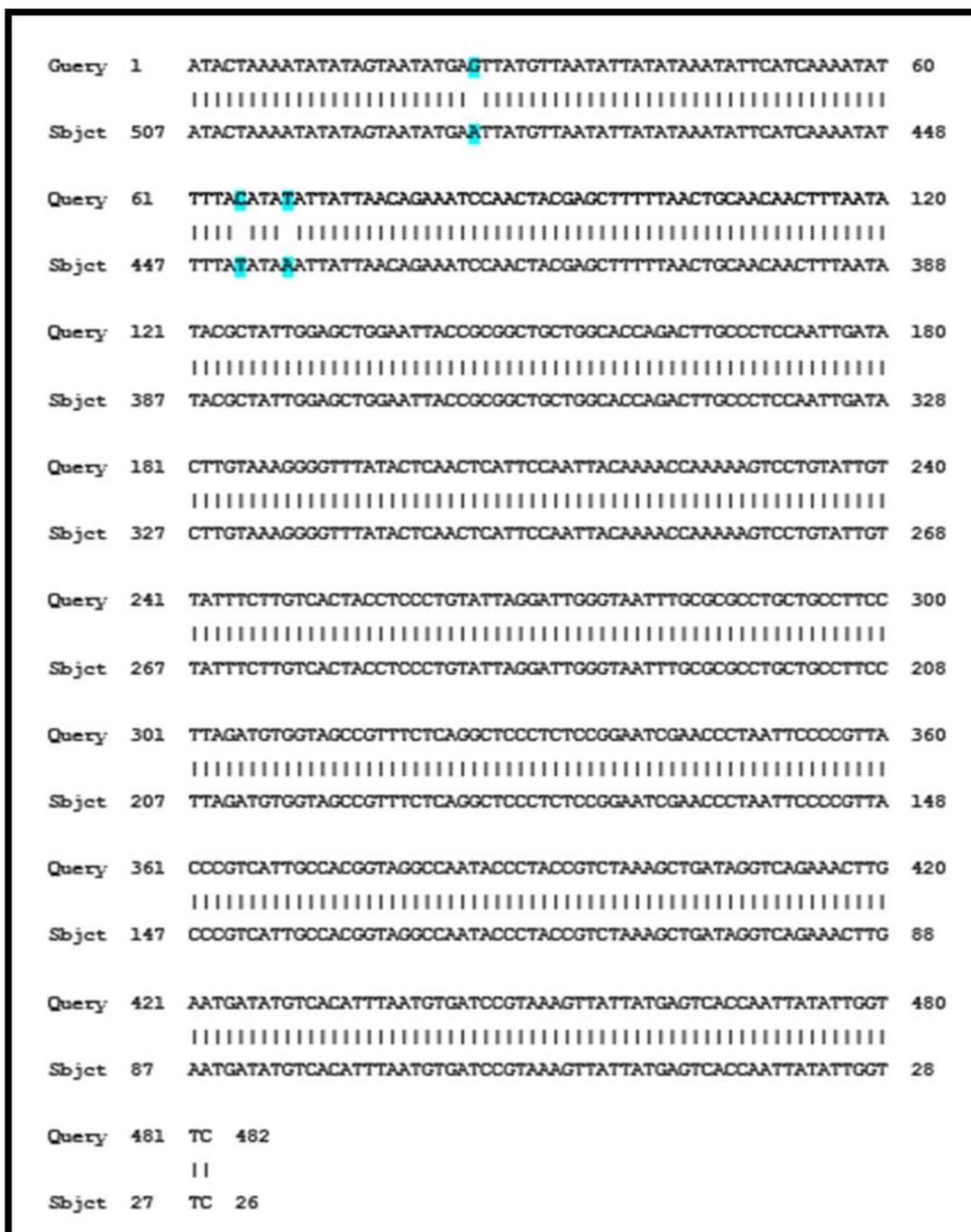


Figure 34 : Analyse BLAST de la séquence du gène SSU de l'échantillon 14.11 et comparaison avec la séquence c de référence de **GenBank** (n° d'accès KM199755.1) (Query cover: 100%; Per ident 99.18%) (Bleue : bases différentes (03)).

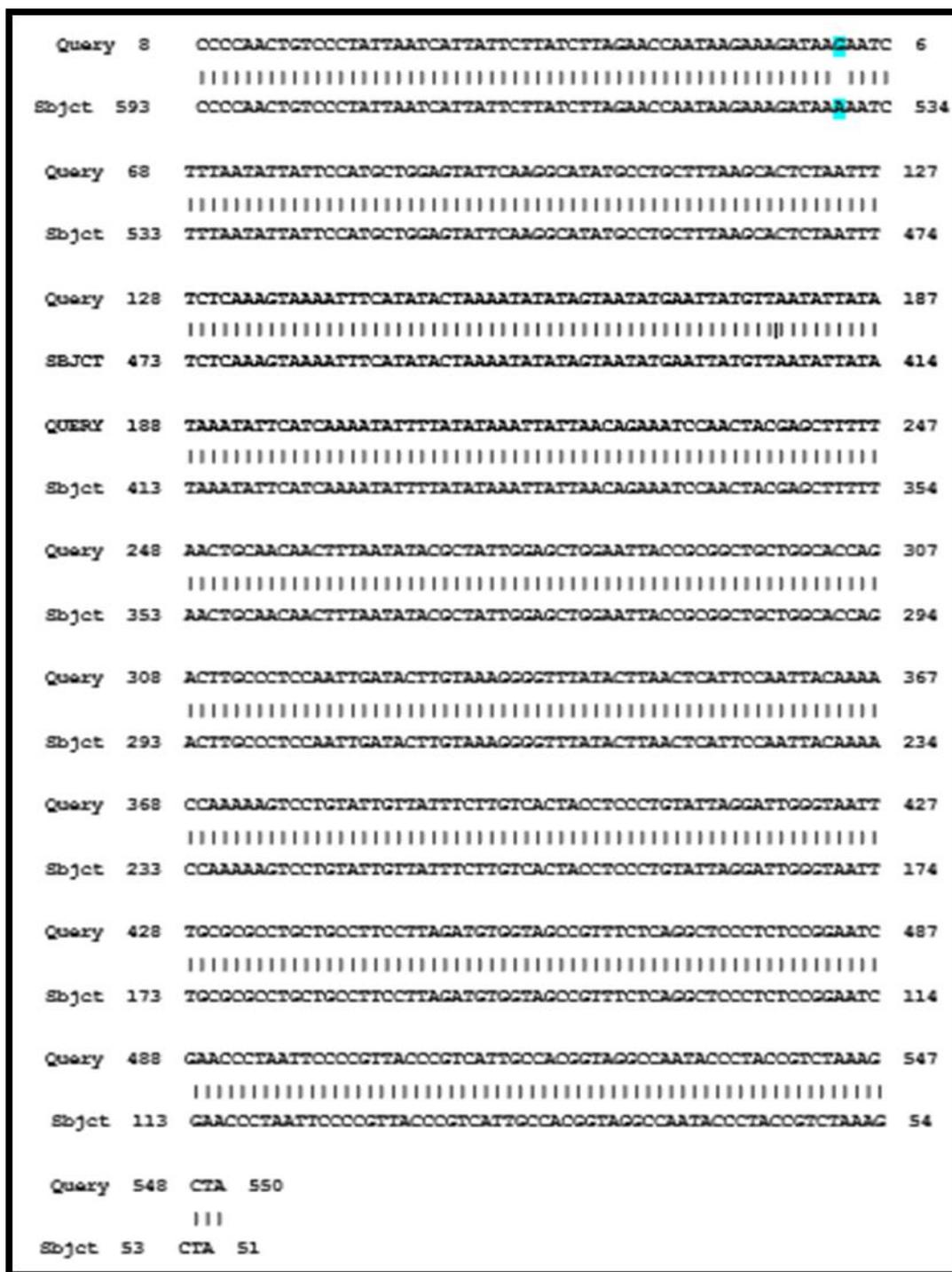


Figure 35 : Analyse BLAST de la séquence du gène SSU de l'échantillon 82car et comparaison avec la séquence de référence de **GenBank** (n° d'accès MG516754.1) (Query cover: 91%; Per ident 99.82%), bleue : bases différentes (01).

III.3.5 Détermination des soustype des espèces de *Cryptosporidium* identifiés

L'analyse des séquences nucléotidiques du gène codant pour gp60, obtenues à partir des prélèvements positifs en SSU rRNA, permet la détermination des différents soustypes. Les isolats identifiés précédemment comme *C. parvum* (n=4) ont été sous-typés. Le sous-typage a été effectué directement sur les produits de PCR nichée du gène gp60 (04/04). Le séquençage a été réussi pour seulement trois (03) échantillons tandis qu'un seul (01) échantillon a produit des chromatogrammes mixtes.

L'analyse des séquences nucléotidiques du gène gp60 de *Cryptosporidium parvum* a permis la détermination de la famille des soustypes IIa, le nombre de tri-nucléotides répétés du type TCA dans les cas positifs est de 16 et 17. Le nombre de tri-nucléotides répétés du type TCG est de deux dans tous les isolats. Ces répétitions sont suivies par une seule répétition des tri-nucléotides du type ACATCA. Dans la présente étude, nous avons pu identifier deux (02) soustypes de *C.parvum* qui sont **IIaA16G2R1** (1/03) et **IIaA17G2R1** (1/03).

La figure ci-dessous représente les 02 sous-types isolés dans le présent travail.

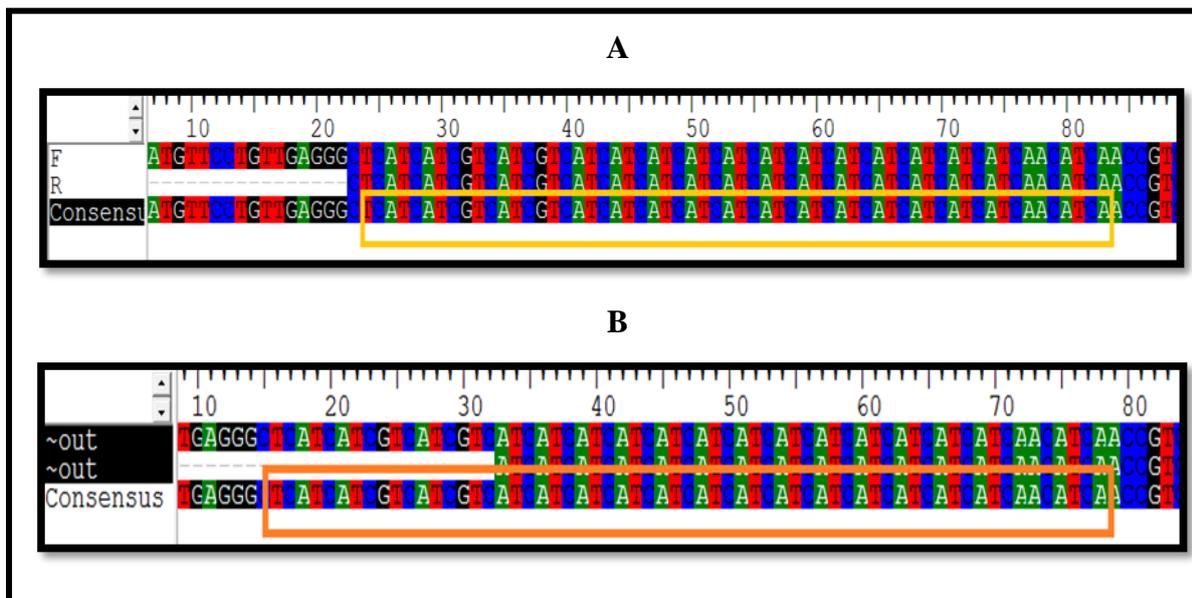


Figure 36 : Analyse des produits du gène GP60 de *Cryptosporidium* à partir de la PCR nichée des échantillons 26spa et 14.17 en utilisant le programme **BioEdit** (A : le soustype **IIaA16G2R1**, B : le soustype **IIaA17G2R1**).

MF142044.1, en présentant un seul (01) SNP (figure 39). Ainsi, la séquence 14.17 est similaire à la séquence de référence (MW411010) à un taux de 99.74% avec la présence de deux (02) SNPs (figure 40). La comparaison de ces séquences a montré les mêmes sous-types identifiés manuellement pour les deux séquences (**IIaA16G2R1**, **IIaA17G2R1**). La séquence 82car a une similarité de 99.48% avec la séquence de référence MN962689.1, en partageant quatre (04) SNPs, et la comparaison entre ces dernières a révélé la présence du sous-type **IIaA13G2R1** au lieu de l'**IIaA12G2T1R1** (figure 41).

La figure 42 récapitule la distribution (en pourcentage) de tous les sous-types obtenus dans le présent travail.

Tableau 20 : Comparaison entre les séquences obtenues et les séquences de référence

Espèce du poisson	ID	Sous-type	Séquence de référence	Similarité (%)	N° SNP
<i>Sparus aurata</i>	26spa	IIaA16G2R1	MF142044.1	99.87	01
	14.17	IIaA17G2R1	MW411010	99.74	02
<i>Carassius carassius</i>	82car	IIaA13G2R1	MN962689.1	99.48	04

Query	1	G TTCCTGTTGAGGGC tcatecatcgctcatcgctcatcatcatcatcatcatcatc tcateca	60
Sbjct	7	G TTCCTGTTGAGGGCTCATCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATCATCATCA	66
Query	61	acatca ACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAA	120
Sbjct	67	ACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAA	126
Query	121	GATTCTAGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGAC	180
Sbjct	127	GATTCTAGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGAC	186
Query	181	GATGGCCAAACTAGTGTGCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGGCC CACT	240
Sbjct	187	GATGGCCAAACTAGTGTGCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGGCC CACT	246
Query	241	ACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAAGAATGCGGCACCTTCATTTGTAATGTGGTTC	300
Sbjct	247	ACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAAGAATGCGGCACCTTCATTTGTAATGTGGTTC	306
Query	301	GGAGAAGGTACCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTACACTATCGTCTATGCACCT	360
Sbjct	307	GGAGAAGGTACCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTACACTATCGTCTATGCACCT	366
Query	361	ATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCTGTAACC	420
Sbjct	367	ATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCTGTAACC	426
Query	421	TTTAAAAGAGTGATAATACAGTTAAATCAAGGTTA CCGGT CAGGATTCAGCACTCTC	480
Sbjct	427	TTTAAAAGAGTGATAATACAGTTAAATCAAGGTTA CCGGT CAGGATTCAGCACTCTC	486
Query	481	TCTGCTAATTCAAGTAGTCCAACCTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGC TCATCAAGA	540
Sbjct	487	TCTGCTAATTCAAGTAGTCCAACCTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGC TCATCAAGA	546
Query	541	TCAAGAAGATCACTCTCAGAGGAAACCAAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCC	600
Sbjct	547	TCAAGAAGATCACTCTCAGAGGAAACCAAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCC	606
Query	601	TTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAAGTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCT	660
Sbjct	607	TTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAAGTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCT	666
Query	661	AAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACCTTTCTATACCGGCGCAAACAGC	720
Sbjct	667	AAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACCTTTCTATACCGGCGCAAACAGC	726
Query	721	GGCACTACCAATGGTGTCTACAGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTT	768
Sbjct	727	GGCACTACCAATGGTGTCTACAGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTT	774

Figure 40 : Analyse BLAST des produits du gène Gp60 de *C. parvum* à partir de la PCR nichée de l'échantillon 82.car et comparée à la séquence partielle du gène Gp60 de subtype **IaA13G2R1** de **GenBank** (n° d'accès MN962689.1. (Query cover: 100%; Per ident 99.48%), bleue : bases différentes (04), jaune : Région microsatellite).

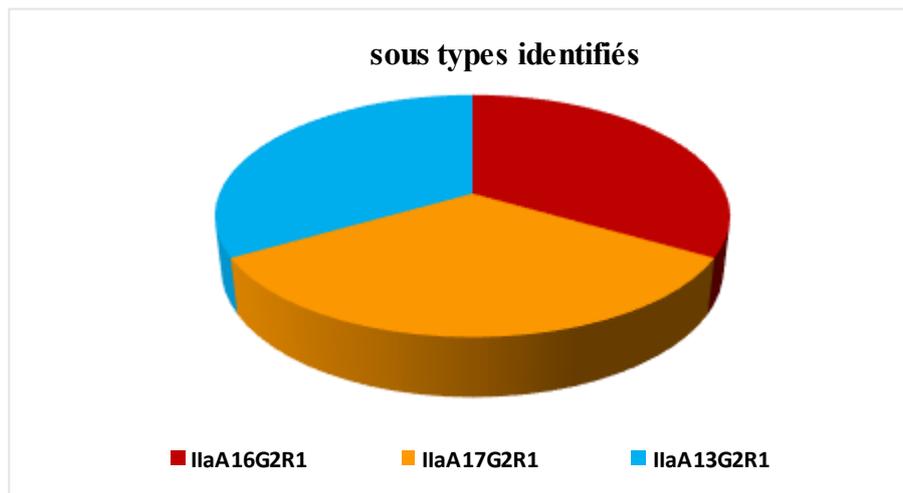


Figure 41 : Distribution des sous-types identifiés dans la présente étude.

IV. Discussion

IV.1 Prévalence globale du *Cryptosporidium* spp.

Dans la présente étude, la prévalence globale de *Cryptosporidium* spp. chez le poisson est de 20.11% (17.5-23.0), (173/860). Des études antérieures ont signalé de faibles prévalences par rapport à la nôtre, dans des groupes similaires de poissons (poissons d'eau douce et d'eau de mer) en utilisant des techniques moléculaires dans la mise en évidence du *Cryptosporidium* spp. En effet, en Australie, des prévalences de 5.3% (41/775) et de 0,8% (6/709) ont été rapportées, respectivement, par Yang *et al.* (2015) et Reid *et al.* (2010). En Paupésie-Nouvelle-Guinée, Koinari *et al.* (2013) ont observé une fréquence de 1.14% (7/614) chez les poissons d'eau douce et d'eau de mer. Ce qui fait des taux d'infection inférieurs par rapport à celui qui a été enregistré dans le présent travail.

En Algérie, plusieurs études moléculaires ont été menées pour rechercher les espèces de *Cryptosporidium* chez la chèvre, le veau, le mouton, le cheval, le poulet et le dromadaire (Laatamna *et al.*, 2013, 2015 ; Baroudi *et al.*, 2018a, 2018b; Ouakli *et al.*, 2018; Benhouda *et al.*, 2019; Sahraoui *et al.*, 2019), cependant, aucune étude n'a été menée chez les poissons à ce jour. Les prévalences enregistrées dans ces études atteignent jusqu'à 52.5% (Ouakli *et al.*, 2018). Il s'est avéré que la prévalence de la cryptosporidiose en Algérie chez la plupart des espèces animales étudiées est plus au moins élevée, ce qui pourrait être la raison de notre résultat, car les animaux infectés pourraient assurer indirectement la transmission du parasite aux poissons. En effet, le poisson pourrait attraper les oocystes du *Cryptosporidium* qui se retrouvent dans l'environnement à travers l'eau souillée avec les déchets des animaux infectés (Certad *et al.*, 2019).

IV.2 Facteurs de risque

IV.2.1 Taux d'infection par *Cryptosporidium* spp. en fonction d'espèce des poissons

Toutes les espèces du poisson qui ont été étudiées dans cette investigation ont présenté une positivité statistiquement significative envers la présence du *Cryptosporidium* spp. dans leurs prélèvements, à savoir ; *Dicentrarcus labrax* (bar méditerranéen/loup de mer) (50% , 3/6), *Alburnus alburnus* (sardine d'eau douce) (49.12%, 28/57), *Carassius carassius* (carassin) (46.93%, 47/98), *Abramis brama* (brème) (26.13%, 46/176), *Rutilus rutilus* (gardon) (18.64%, 11/59) et *Sparus aurata* (dorade royal) (8.40%, 39/464). L'espèce *Dicentrarcus labrax* (bar méditerranéen/loup de mer) est le plus susceptible d'être infectée par *Cryptosporidium* spp.

Discussion

Dans des études antérieures, des prévalences ont été proches, inférieures, et supérieures aux celles du présent travail. Sitja-Bobadilla *et al.* (2005) ont observé une prévalence supérieure à celle de notre étude (varié de 40,0 à 94,7%) chez la dorade royale et le bar européen. En France, Certad *et al.* (2015) ont signalé un taux de 100% (1/1) chez le gardon (*Rutilus rutilus*). Autres études ont enregistré des taux inférieurs à ceux signalés dans la présente étude. Ainsi, Gibson-Kueh *et al.* (2011) ont rapporté 10.0% chez le bar d'Asie (*Lates calcarifer*) en Vietnam et aucun cas d'infection par *Cryptosporidium* spp. n'a été observé chez la brème (*Abramis brama*) (Certad *et al.*, 2015).

À notre connaissance, les infections à *Cryptosporidium* chez la sardine des eaux douces (*Alburnus Alburnus*), la brème (*Abramis brama*) et le carassin (*Carassius auratus*) n'ont pas été rapportés, ces espèces de poissons ne seraient probablement pas hôtes pour *Cryptosporidium* spp., soit pour les espèces spécifiques aux poissons ou pour celles qui infectent les autres espèces animales. En revanche, plusieurs études ont signalé la présence des espèces de *Cryptosporidium* chez le carassin doré d'ornement (*Carassius auratus*) où le taux des infections à *Cryptosporidium* était environ de 5% (Morine *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015), et aucun cas des infections de cette espèce du poisson n'a été observée par d'autres auteurs (Reid *et al.*, 2010; Zanguee *et al.*, 2010; Ryan *et al.*, 2015; Bolland *et al.*, 2020).

Dans la littérature, plusieurs espèces du poisson ont été définies comme étant hôte potentiel pour les espèces de *Cryptosporidium* spécifiques et non spécifiques aux poissons. Jusqu'à présent, le taux des infections à piscine-*Cryptosporidium* chez les espèces de poissons étudiées était entre 1.5% et 100%. En effet, la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Freire-Santos *et al.*, 1998), le tambour rouge (*Sciaenops ocellatus*) (Camus et Lopez., 1996; Bolland *et al.*, 2020), le guppy (*Poecilia reticulata*) (Ryan *et al.*, 2004; 2015; Yang *et al.*, 2015), le scalaire (*Pterophyllum scalare*) (Murphy *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2015); le brochet (*Esox lucius*) (Certad *et al.*, 2015), la truite commune (*Salmo trutta*) (Couso-Pérez *et al.*, 2019), le barbu de Sumatra (*Puntigrus tetrazona*) (Ryan *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015), le tetra neon (*Paracheirodon innesi*) (Zanguee *et al.*, 2010; Ryan *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015; Bolland *et al.*, 2020), l'oscar (*Astronotus ocellatus*) (Ryan *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015), la loche à ventouse alguivore (*Crossocheilus aymonieri*), le poisson-chat à l'envers taché (*Synodontis nigriventris*), le poisson couteau (*Apteronotus albifron*) (Zanguee *et al.*, 2010), le pelmato (*Pelvicachromis pulcher*, *Pterophyllum altum*) (Yang *et al.*, 2015), le platy (*Xiphophorus maculatus*) (Bolland *et al.*, 2020; Shahbazi *et al.*, 2020), la tétra aux yeux rouges (*Moenkhausia sanctaefilomenae*) (Bolland *et al.*, 2020; Zahedi *et al.*, 2021), le

Discussion

poisson-lune argenté (*Monodactylus argenteus*) (Zanguee *et al.*, 2010), le mullet (*Mugil cephalus*), le poisson-chirurgien à deux taches (*Ctenochaetus tominiensis*), la demoiselle bleu-ciel (*Chrysiptera hemicyanea*) (Yang *et al.*, 2015; Papparini *et al.*, 2017), le barbier (*Pseudanthias dispar*) (Zanguee *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015; Papparini *et al.*, 2017), le poisson-ange à queue noire (*Centropyge eibli*), la marionnette tête d'or (*Opistognathus aurifrons*) (Yang *et al.*, 2015; Papparini *et al.*, 2017), le molly voile (*P. latipinna*), le Barbus rosé (*P. conchoni*), le Gourami perlé (*T. leerii*), le poisson combattant (*B. splendens*), le poisson arc-en-ciel élancée (*Mylochromis gracilis*), le Labido jaune (*L. caeruleus*) (Shahbazi *et al.*, 2020), le nason à éperon orange (*Naso literatus*) (Hoover *et al.*, 1981), le turbot (*Scophthalmus maximus*) (Alvarez-Pellitero *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2015), le turbot (*Psetta maxima*) (McOliver *et al.*, 2009), le chirurgien bleu (*Paracanthurus hepatus*), le poisson-clown du Pacifique (*Amphiprion percula*) (Yang *et al.*, 2015), le morue de l'Atlantique (*Gadus morhua*), le lieu noir (*Pollachius virens*), la carpe commune (*Molva dypterygia*), le merlan (*Merlangius merlangus*), le lingue franche (*Molva molva*), le merlu commun (*Merluccius merluccius*), le maquereau bleu (*Scomberscombrus*) (Gibson-Kueh *et al.*, 2011; Certad *et al.*, 2019), le morue de murray (*Maccullochella peelii peelii*) (Barugahare *et al.*, 2011), le turbot (*P. maxima*) (Álvarez-Pellitero *et al.*, 2004) et l'argent biddy (*Gerres oyena*) (Koinari *et al.*, 2013) sont connues pour être infectées par les espèces de piscine-*Cryptosporidium*.

Dans notre étude, la prévalence élevée constatée chez le loup pourrait être expliquée par la nature d'élevage de cette espèce. Cette espèce est élevée environ 30 mois dans les cages flottantes d'élevage pour qu'il soit destiné à la vente. Cela pourrait former une sorte de stress pour ces animaux, ce qui augmente la sensibilité des individus à contracter les différentes infections (Sitjà Bobadilla *et al.*, 2000 ; Álvarez-Pellitero *et al.*, 2004). Ainsi, cette longue période pourrait augmenter les chances d'exposition du poisson aux espèces de *Cryptosporidium* spp. retrouvées dans les eaux de mer. En effet, Freire-Santos *et al.* (1999, 2000a) ont rapporté la capacité de *C. parvum* de rester viable et infectieux dans l'eau de mer artificielle (salinité 35 ppm) à 18°C jusqu'à 40 jours. Cependant, cette espèce est élevée directement dans l'eau de mer (une superficie près de 6Ha) qui pourrait être contaminée par les espèces de *Cryptosporidium* proviennent des déchets humains (fèces), car la localisation des cages flottantes d'élevage est située dans les zones côtières de la littoral Algérien. Ces dernières reçoivent des apports d'eaux usées d'origine humaine et/ou animale avec un risque potentiel de contamination par les entéropathogènes. Ce constat a été confirmé par Certad *et*

Discussion

al. (2019), quand ils ont enregistré une faible prévalence de *Cryptosporidium* chez les poissons marins car ils appartiennent de l'eau de large et non de l'eau côtière. La contamination d'eau de la mer méditerranéenne pourrait également résulter suite à la décomposition des cadavres des immigrants illégaux (Ryan *et al.*, 2015). En outre, les autres espèces marines pourraient présenter un risque de contamination de l'eau (céphalopodes, crabes nageurs, crustacés...), en secrétant leur contenu intestinal dans l'eau surtout que certaines espèces marines sont considérées comme un hôte potentiel et transporteur des espèces de *Cryptosporidium* (Graczyk et Schwab, 2000). En effet, Gómez-Couso *et al.* (2003) ont observé une prévalence de 34.4% chez les bivalves crustacés présentés dans la côte de plusieurs pays de l'union européenne ; les crustacés (*moule méditerranéenne* ou *Mytilus galloprovincialis*) (42.6%), les palourdes (*Ruditapes decussatus*, *Ruditapes philippinarum*, *Veneru pispulastra* et *Dosinia exoleta*) (29.4%), les huîtres (*Ostrea edulis*) (54.8%), et les coques (*Cerastoderma edule*) (20.8%).

Concernant la prévalence élevée observée chez le carassin et la sardine d'eau douce pourrait expliquer par le fait que ces espèces se sont des prédateurs, s'alimenter principalement des crustacées et des mollusques. En effet, *Cryptosporidium* pourrait être transmis à d'autres poissons à travers la chaîne alimentaire, comme il est rapporté auparavant où ils ont démontré que le micro-crustacé *Artemia salina* a un rôle potentiel dans la transmission des espèces de *Cryptosporidium* aux poissons (Mendez-Hermida *et al.*, 2007).

IV.2.3 Taux d'infection par *Cryptosporidium* spp. en fonction de l'habitat des poissons

Les poissons d'eau douce prélevés au cours de cette étude appartiennent aux plusieurs barrages d'eau d'Algérie. A notre connaissance, c'est la première étude qui a été effectuée au sein de ces barrages.

Nos résultats montrent que les poissons d'eau douce sont plus sensibles à l'infection par *Cryptosporidium* spp. (33.58%) par rapport à ceux d'eau de mer (8.93%). Yang *et al.* (2015) ont démontré le même résultat (un taux d'infection plus élevé chez les poissons d'eau douce), où ils ont constaté 6.55% et 1.5% chez les poissons d'eau douce et d'eau de mer respectivement. Koinari *et al.* (2013) ont enregistré des taux de prévalence qui sont quasi-similaires chez les poissons de deux habitats, 0.8% chez les poissons d'eau douce et 0.6% chez ceux d'eau de mer. Nos résultats sont contradictoires avec ce qui a été signalé par Reid *et al.* (2010), où ils ont enregistré un taux d'infection à *Cryptosporidium* spp. de 2.4% chez les poissons d'eau de mer, et aucun cas d'infection chez les poissons d'eau douce (0%).

Discussion

Plusieurs études ont été menées sur les infections à *Cryptosporidium* spp. chez les poissons d'eau douce. Chez la variété sauvage de cet habitat, une fréquence plus élevée que la nôtre a été enregistrée en Egypte (84%) (Shappan *et al.*, 2021). Une fréquence similaire à la nôtre (33.58%) a été enregistrée par Certad et ses collaborateurs (2015) en France, où ils ont trouvé un taux de 37%. Ainsi, Couso-perez *et al.* (2019), en Espagne, ont enregistré un taux inférieur (16.8%) à celui qui a été rapporté dans cette étude. Autres études ont été effectuées chez les poissons d'eau douce mais sur ceux d'ornement, la plupart de celles-ci ont été faites en Australie et les prévalences étaient entre 3.5% et 10.5% (Zangee *et al.*, 2010 ; Morine *et al.*, 2012 ; Ryan *et al.*, 2015). Shahbazi *et al.* (2020) ont également enregistré un taux des infections à *Cryptosporidium* spp chez les poissons d'ornement de 16% qui est inférieur à notre prévalence. Les poissons d'eau douce ont fait aussi l'objectif d'une étude menée en Espagne par Couso-perez *et al.* (2018) où ils ont rapporté une fréquence de 9.2%.

Chez les poissons d'eau de mer (prélevés auprès des vendeurs), nous avons constaté un taux de 8.93%. Celui-ci est supérieur à celui qui a été observé par Certad *et al.* (2019), où ils ont rapporté une prévalence de 2.48%, dont 3.2% est observé chez les individus collectés à partir des vendeurs des poissons en détaille. En effet, d'autres études qui ont été menées sur les poissons marins, ont démontré des prévalences supérieures à la nôtre. La prévalence de *Cryptosporidium* était entre 50 et 95% chez les poissons d'eau de mer dans l'étude qui a été menée par Sitjà-Bobadilla *et al.*, (2005). De plus, un taux de prévalence allant jusqu'à 100% a également été signalé chez le poisson marin connu communément par le nom du "turbot" (*Psetta maxima*) (Avarez-Pellitero *et al.*, 2004).

Notre prévalence importante enregistrée chez les poissons d'eau douce par rapport à celle des espèces marines peut être due à l'abondance des proximités des eaux de ruissellement et des eaux usées agricoles près aux eaux de la région étudiée. En outre, les barrages échantillonnés sont situés dans des zones rurales (Guelma, Souk Ahras, Khenchela, Setif, Mila et El-taref), ce qui pourrait expliquer la contamination des poissons à travers leurs eaux souillées par les déchets des animaux, notamment les animaux de rente, les animaux sauvage, et les oiseaux (éventuellement les oiseaux migratoires). En revanche, selon plusieurs auteurs, les poissons d'eau de mer sont connus par le faible taux naturel des infections à *Cryptosporidium* spp. (Certad *et al.*, 2019).

IV.2.4 Taux d'infection par *Cryptosporidium* spp. en fonction de la taille des poissons

En classant les poissons en 03 catégories selon leur taille, la prévalence de cette dernière a été jugée statistiquement significative. En effet, les poissons qui ont la taille la plus petite ont été plus souvent infectés (30.06%) que les autres groupes de poissons, avec une fréquence d'infection de 16.62% chez les poissons qui ont une taille moyenne et de 12.67% chez les grands poissons. Plusieurs études ont cherchées le rôle de la taille le poids et/ou l'âge (des poissons appartiennent de la même espèce) des poissons dans la propagation des infections à *Cryptosporidium* spp. La plus part de toutes ces études vont dans le même sens de notre étude. En effet, Sitja` Bobadilla *et al.* (2005) ont observé un pic des infections chez les jeunes dorades royales pesées de 31 à 100 g. Les mêmes résultats ont été rapportés par Murphy *et al.* (2009) et Couso-Pérez *et al.*, (2018), où ils ont enregistré un taux d'infection par *Cryptosporidium* plus élevés chez les jeunes poissons. En effet, Murphy *et al.* (2009) ont rapporté que la morbidité et la mortalité les plus élevées ont été rapportées chez les plus jeunes poissons parasités (*Pterophyllum scalare*). De plus, dans l'étude qui a été réalisée par Couso-Pérez *et al.* (2018), les poissons (*Oncorhynchus mykiss*) de 2 ans ont été plus susceptibles à attraper l'infection par rapport aux poissons de 2 à 3 ans (23,1% via 13,5%; P, 0,01). Ainsi, ils ont rapporté un taux de 14% chez les mêmes poissons jeunes via un taux de 5% chez les adultes. Ces chercheurs ont constaté que les taux d'infection augmentaient chez les poissons avant le grossissement, et ils avaient tendance à diminuer avec le poids des poissons. Ce qui fait le taux de prévalence est inversement proportionnel à la taille du poisson (certade *et al.*, 2019). Le même constat a été accordé chez le bétail, où les infections à *Cryptosporidium* sont généralement élevées chez les nouveau-nés et moins fréquentes chez les adultes (Harp *et al.*, 1990; Ortega-Mora et Wright, 1994 ; Kvac *et al.*, 2014) En revanche, une étude a été réalisée par Certad *et al.* (2019) chez les poissons marins, a montré des résultats contradictoires aux notre. Ils ont signalé que la prévalence la plus élevée de *Cryptosporidium* spp. était chez les poissons qui présentent la plus grande taille. La prévalence élevée (30%) de *Cryptosporidium* spp. chez les poissons de petites tailles retrouvée dans le présent travail, pourrait être due à l'immaturation du système immunitaire de ce groupe par rapport aux autres groupes (Couso perez, 2018). Une étude expérimentale a été effectuée chez les souris et a montré que les souris n'ont pas besoin d'être exposées au parasite pour développer une résistance à un âge plus avancé (Harp *et al.*, 1992; Harp *et al.*, 1988). Ce qui prouve la capacité du système immunitaire des animaux adultes à défendre les nouvelles infections. De plus, la pathogénie du *Cryptosporidium* est liée principalement à la

Discussion

déformation de l'architecture des muqueuses digestives normales (Landsberg et Paperna, 1986; Paperna, 1987; Camus et López, 1996; Alvarez-Pellitero *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2004a; Gabor *et al.*, 2011). La même étude chez la souris a aussi montré que l'âge auquel la souris devient résistante à l'infection est également l'âge auquel la flore intestinale est complètement mature (Harp *et al.*, 1992).

L'infection des poissons de grande taille pourrait être due à l'accumulation du parasite au cours de la vie du poisson (Couso-Pérez *et al.*, 2018). Cette accumulation est déterminée chez plusieurs parasites comme le cas de *Bothriocephalus* spp. et *Diplostomum adamsi* chez la Perchaude (*Perca flavescens*) et les Anisakis chez Le Merlan bleu (*Micromesistius poutassou* Risso), le Merlu (*Merluccius Merluccius*), la Morue (*Gadus morhua* L.) et la sardine (*Sardina pilchardus*) (Zelmer et Arai, 1998; Takao, 1990 ; Hemmingsen *et al.*, 2000; Valero *et al.*, 2000, 2006). Elle pourrait résulter suite à la longue exposition aux sources du parasite comme les eaux contaminées par les éléments infectants du parasite (oocystes cryptosporidiques), et/ou à la consommation des proies potentiellement porteuses du parasite par les poissons (Couso-Pérez *et al.*, 2018 ; Certad *et al.*, 2019). Le type d'alimentation pourrait influencer également l'infection des poissons par certains parasites. Zelemer et Arai (1998) ont confirmé ce constat chez la perchaude adulte lors des infections à *Raphidascaris acus* et *Crepidostomum isostomum* par *Bothriocephalus* spp. et *Diplostomum adamsi*. En effet, le régime alimentaire des poissons adultes est différent à celui des jeunes. Les juvéniles se nourrissent principalement de macro invertébrés benthiques, tandis que les adultes se nourrissent de mollusques, de crustacés et de petits poissons (Mladineo *et al.*, 2009). Cependant, quel que soit les macro invertébrés benthiques ou les mollusques ainsi que les crustacés sont connus pour être infecter par *Cryptosporidium* spp. (Hohweyer *et al.*, 2013 ; Reboredo-Fernandez *et al.*, 2014). Les mollusques et les crustacés (majore aliment des poissons adultes) ont été la cible de plusieurs études épidémiologiques des infections à *Cryptosporidium* à travers le monde entier. En Amérique du Nord, 80% des huîtres et des moules de la baie de Chesapeake sont contaminées par le *Cryptosporidium* (Fayer *et al.*, 1998, 1999, 2002; Graczyk 1999, 2001, 2007) et 3.7% des mollusques ont été contaminés par les oocystes du *Cryptosporidium* (Fayer *et al.*, 2003). Au Québec, Canada. *Cryptosporidium* a été détecté dans 73% des *Mytilus edulis* (Lévesque *et al.*, 2010). En Europe, la prévalence du *Cryptosporidium* dans plusieurs espèces de coquillages (palourdes, moules et huitres) est de 29 à 56% en Espagne (Giangasper *et al.*, 2005; Gómez-Couso *et al.*, 2004 ; Gómez-Couso *et al.*, 2005, 2006), 33,3% au Portugal (Melo *et al.*, 2006) et 11% au Royaume-Uni (Gómez-

Discussion

Couso *et al.*, 2004). De plus, le cannibalisme dans les communautés de piscines est un phénomène courant, notamment chez les poissons d'élevage, ce qui pourrait favoriser l'entrée et la concentration des parasites et de la dispersion des oocystes chez ces derniers dans les installations d'aquaculture (Sitjà- Bobadilla *et al.*, 2005; Ryan, 2010). Dans une grande partie de notre étude, nous avons prélevé les poissons commercialisés qui ont un poids de plus de 350g, ce qui indique que la majorité des individus étudiés sont en phase de croissance ou sont adultes. En augmentant la possibilité de prélever les poissons qui sont alimentés par les crustacés, les mollusques, les huitres et les petits poissons, la raison par laquelle on peut expliquer l'abondance du parasite chez les trois catégories étudiées avec la forte infection des poissons de petite taille surtout qu'on a pas étudié des poissons juvéniles dans le présent travail.

IV.2.5 Taux d'infection par *Cryptosporidium* spp. en fonction de l'origine

Nous avons constaté que la prévalence vis-à-vis *Cryptosporidium* spp est variable d'une manière significative en fonction des régions investiguées. Toutefois, nous avons remarqué que la région Est d'Algérie est plus touchées (33.58 %) que la région Centre d'Algérie (8.93%). En effet, les études qui ont été réalisées en Algérie sur la cryptosporidiose animale ont présenté des taux variés en fonction de l'espèce animale infectée et la région étudiée. Dans l'Est algérien, Ouakli *et al.* (2018) ont signalé chez les bovins des taux de 39.37% (100/254) et 100% (16/16) dans la région de Tizi-ouzou et de Sétif respectivement, ce qui fait un taux total dans cette région Est de 42.96% (115/270). Chez les bovins de la wilaya de Betna, Benhouda *et al.* (2017) ont enregistré une prévalence de 40%. Chez le dromadaire dans la wilaya de Biskra, les infections à *Cryptosporidium* ont été de 5.1% (Baroudi *et al.*, 2018). Concernant les études qui ont été effectuées dans le centre algérien, on note les résultats enregistrés par Ouakli *et al.* (2018) chez les bovins dans la wilaya de Blida, où ils ont observé une prévalence de 91.42% (64/70). Baroudi *et al.* (2013) ont constaté les prévalences de 34% et 44% chez les volailles (poulet et dinde respectivement) dans la wilaya d'Alger. En revanche, des taux faibles d'infection à *Cryptosporidium* ont été rapportés par d'autres études. Au proximités d'Alger, un taux de 11% a été observé chez les jeunes petits ruminants (Baroudi *et al.*, 2018), une prévalence de 13.7% a été enregistré chez les bovins (Baroudi *et al.*, 2017). On peut expliquer nos résultats par la nature des zones d'études. En effet, l'Est Algérien renferme en grande partie des zones rurales où le parasite peut se transmettre aux poissons via les eaux de barrages contaminées par le fumier des autres animaux infectés par le

Discussion

parasite, surtout que les poissons sont connus par leur susceptibilité d'être contaminés par les espèces de *Cryptosporidium* non piscine (Zanguee *et al.*, 2010 ; Certad *et al.*, 2015; Couso perez *et al.*, 2018; Goulomazou et Panaris 2020). Ainsi, le type d'élevage des poissons peuvent influencer les infections à *Cryptosporidium*.

En effet, les poissons collectés de la région centre d'Algérie sont tous appartient à des élevages intensifs. Cependant, ce type d'élevage peut former une sorte du stress sur les poissons, et par conséquent la diminution de la défense immunitaire et l'augmentation du risque d'attraper les infections (Álvarez-Pellitero *et al.*, 2009), pour cela, on pourrait expliquer la faible prévalence observée dans notre étude par la bonne pratique d'élevage d'une part, et à la faible infection naturelle des poissons marins par les espèces de *Cryptosporidium* d'une autre part.

IV.2.6 Taux d'infection par *Cryptosporidium* spp. en fonction de la saison

Globalement, nos résultats rapportent que la saison est statistiquement significative. La positivité est nettement plus élevée en printemps (36.06%) et en été (33.03%) comparée aux autres saisons ; automne (7.84%) et hiver (4.35%). De plus, les poissons sont plus prédisposés en printemps et en été à un risque d'être infectés par les espèces de *Cryptosporidium* de 10.30 fois et de 8.91 fois, respectivement, par rapport à l'hiver. Nos résultats concordent à ce qui a été montré par Sitjà-Bobadilla *et al.* (2005) où une distribution saisonnière de *Cryptosporidium* a été signalée chez la dorade royale d'élevage, avec une prévalence et une intensité maximale au printemps et en été. De même, Álvarez-Pellitero *et al.* (2009) ont observé une influence saisonnière sur les niveaux de *Cryptosporidium* dans le turbot d'élevage (1.74% en printemps, 1.02% en été et 0.33% en automne). Certad *et al.* (2019) ont également observé un taux élevé (3.5%) des infections à *Cryptosporidium* spp en printemps-été chez les poissons marins. Ces auteurs suggèrent que la température peut être le principal facteur des fluctuations saisonnières de la cryptosporidiose, en effet, les changements saisonniers peuvent influencer la physiologie de l'hôte, y compris la fonction immunitaire ou l'intensité de l'alimentation. Cependant, la densité de l'hôte et la disponibilité des stades infectieux, entre autres, facteurs puissent influencer le modèle saisonnier. En revanche, des taux de prévalence importants ont été observés chez les poissons échantillonnés en octobre 2015 (60,0%) et août 2016 (20,0%) dans une étude réalisée par Couso-Perez *et al.* (2018) en Espagne. En revanche, l'effet saison sur les infections à *Cryptosporidium* n'est pas encore bien défini.

Les études qui ont été réalisées sur les infections à *Cryptosporidium* chez les mammifères n'ont pas trouvé une différence statistique significative dépendante de la saison d'infection (Laatamna, 2014). Pour pouvoir confirmer ou nier la saisonnalité de la cryptosporidiose, il est important de réaliser plusieurs études pendant plusieurs années consécutives (Couso perez *et al.*, 2018).

IV.2.7 Taux d'infection par *Cryptosporidium* spp. en fonction de type d'élevage des poissons

Les poissons élevés extensivement ont présenté une positivité plus élevée comparé à ceux qui font partie du système intensif. Ceci va dans le même sens que les résultats enregistrés par certains auteurs. Chez le poisson, les infections à *Cryptosporidium* spp ont un taux élevé chez les poissons sauvages (6/482) que ceux qui appartiennent à des élevages (0/277) selon l'étude réalisée par Reid *et al.* (2010). Contrairement, Koinari *et al.* (2013) ont démontré la présence similaire du *Cryptosporidium* spp. chez les poissons cultivés dans des aquariums (1.5%, 2/133) et chez les poissons sauvages (1.03%, 5/481).

Plusieurs auteurs s'accordent sur le fait que les conditions stressantes telles que celles associées aux pratiques d'aquaculture intensive, et aux infections virales ou bactériennes concomitantes peuvent jouer un rôle dans l'acquisition de l'infection par ce parasite, et la progression de la maladie (Couso-perez *et al.*, 2018). En effet, des infections abondantes ont été observées chez le turbot cultivé dans des conditions déficientes (Álvarez-Pellitero *et al.*, 2009). Autres auteurs ont signalé l'augmentation du nombre de structures intracellulaires sphériques dans les tubes pyloriques de la truite arc-en-ciel exposée à des oocystes de *C. parvum*, dans une étude de la transmission expérimentale dans des conditions du stress (Freire-Santos *et al.*, 1998).

Chez les ruminants, plusieurs auteurs ont confirmés l'effet du système de stabulation sur l'infection de ces animaux par *Cryptosporidium* spp. Chez les bovins, en Malaysia, Abdullah *et al.* (2019) ont signalé une fréquence plus élevée dans le système intensif (71%) par rapport au système extensif (14%) et intensif (18%). En Ethiopie, le même constat a été déterminé par Manyazewal *et al.* (2018). Les vaches élevées sous système de gestion intensive étaient plus affectées par *Cryptosporidium* (21,4%) que ceux sous un système extensif (11,2%). En Egypte, Fereig *et al.* (2016) ont également enregistré l'effet significatif du type d'élevage sur les infections à *Cryptosporidium*, où ils ont montré un taux d'infection dans le system intensif

Discussion

(37.8%) inférieur que celui des autres systèmes (50.2%). Chez les caprins, dans une étude menée en Malaisie par Yusof *et al.* (2017), l'effet du système d'élevage était également statistiquement significatif. Ces auteurs ont observé que les caprins élevés dans un système intensif sont plus infectés (49.7%) que ceux qui sont élevés dans le système intensif (37.4%) et l'extensif (41%).

Nos résultats pourraient être expliqués par le fait que les mesures de bonne pratique d'élevage sont respectées dans le système d'élevage intensif en évitant toute sorte de stress (bonnes mesures de biosécurité et surveillance des ressources alimentaires). Ainsi, la présence de tous les poissons qui appartiennent au système extensif (alimentation non contrôlée) dans des zones rurales pourrait augmenter les chances d'attraper l'infection (via les eaux contaminées).

IV.2.8 Taux d'infection par *Cryptosporidium* spp. en fonction du sexe des poissons

Le sexe du poisson est semblé statistiquement non significatif dans notre étude ($P > 0.005$) avec l'infection élevée des femelles. Il s'est avéré que ce facteur n'a aucune influence sur les infections à *Cryptosporidium* spp. chez toutes les espèces animales (Laatamna *et al.*, 2017). Chez le poisson, Certad *et al.*, (2019) ont montré le même résultat mais avec des taux d'infections proches chez les deux sexes (2.2% et 2.1% chez les femelles et les mâles respectivement). La plupart des autres enquêtes chez les poissons n'ont pas inclus l'effet du facteur 'sexe' dans la variation de la prévalence des cryptosporidies.

IV.3 Caractérisation moléculaire**IV.3.1 Espèces de *Cryptosporidium* identifiées**

Malheureusement, le séquençage de la majorité des échantillons obtenus par la PCR nichée du locus 18S, en utilisant les deux types des amorces, a été échoué à cause du haut niveau des infections mixtes dans ces échantillons. Ces infections mixtes ont été représentées par l'apparition des chevauchements dans les graphes du séquençage des séquences mal séquencées. Ce problème des infections mixtes chez les poissons a été noté dans plusieurs études de la cryptosporidiose chez les poissons et par conséquent, il a également empêché la réussite du séquençage en utilisant la méthode Sanger (Certade *et al.*, 2015). En effet, la méthode traditionnelle du séquençage (Sanger) ne peut pas être utilisée pour séquencer un mélange d'amplicons obtenus par la co-amplification de plusieurs variantes génétiques (Paparini *et al.*, 2017). Il est généralement reconnu que les approches de la PCR nichée présentent un risque inhérent de la contamination, et il a déjà été démontré qu'elles

Discussion

présentaient de forts biais d'amplification et/ou d'une variation stochastique (Park et Crowley, 2010). La formation d'hétéro-duplex, causé par la cross-hybridation de séquences hétérologues et résultant d'un niveau élevé de similarité des contenus d'ADN dans les PCR multi-modèles, et la construction des composants chimériques lors de l'amplification (recombinaisons médiée par PCR) résultant par exemple d'une extension incomplète de l'amorce ou bien des erreurs de la Taq polymérase, sont connus pour être l'une des causes de l'amplification préférentielle et de l'apparition des produits hétérogènes (Shuldiner *et al.*, 1989; Wang et Wang, 1996 ; Judo *et al.*, 1998; Kanagawa, 2003). En effet, il a été démontré que la formation d'hétéro-duplex augmentait au cours des cycles ultérieurs de PCR multi-modèles, après que les produits amplifiés atteignent des concentrations suffisamment élevées pour entrer en compétition avec les amorces aux sites de liaison (Rueckre *et al.*, 2011). En outre, en impliquant deux cycles séquentiels d'amplification, la PCR nichée ne peut pas représenter avec précision l'étendue de la diversité génétique initialement présente dans l'échantillon, car elle introduit un goulot d'étranglement entre le premier et le deuxième cycle. Cependant, dans les études de parasitologie moléculaire, la PCR nichée est souvent essentielle pour obtenir suffisamment de copies d'ADN à séquencer par la méthode Sanger. Il s'agit d'un problème inhérent à l'épidémiologie de *Cryptosporidium* car les échantillons d'eau, les tissus gastriques/intestinaux de poissons, et les excréments d'animaux sauvages contiennent souvent un très faible nombre d'oocystes et des niveaux élevés d'inhibiteurs de la PCR, et par conséquent, la PCR nichée est souvent nécessaire pour amplifier l'ADN du parasite (Paparini *et al.*, 2017).

Globalement, nos résultats du séquençage et d'analyse phylogénétique ont identifiés une seule espèce de *Cryptosporidium* (*C. parvum*) chez les poissons étudiés. Cette espèce a été isolée chez le *Carassius carassius* (01) et le *Sparus aurata* (03).

Jusqu'à présent, les poissons sont connus pour être infectés par cinq espèces de *Cryptosporidium* qui sont spécifiques aux ces derniers ; *C. molnari*, *C. scophthalmi*, *C. huwi*, *C. bollandi* et *C. abrahamseni* (Alvarez-Pellitero et Sitjà-Bobadilla, 2002 ; Alvarez-Pellitero *et al.*, 2004 ; Ryan *et al.*, 2015 ; Bolland *et al.*, 2020 ; Zahedi *et al.*, 2021). *Cryptosporidium parvum* a déjà été signalé chez les poissons auparavant (Reid *et al.*, 2010 ; Koinari *et al.*, 2013 ; Certad *et al.*, 2015 ; Couso-perez *et al.*, 2018, Couso-perez *et al.*, 2019 ; Certad *et al.*, 2019), bien que le nombre des études moléculaires qui ont été réalisées sur les poissons à travers le monde soit réduit. L'ensemble de ces études ont ciblé le gène ARNr 18S pour pouvoir détecter les infections à *Cryptosporidium* spp. certains rapports ont permis la

Discussion

caractérisation moléculaire d'un nombre important de cas positifs au *Cryptosporidium parvum*, et d'autres se sont limités sur quelques cas de poissons infectés. En effet, dans l'étude de Reid *et al.* (2009), *C. parvum* a été identifié chez le poisson marin *Sillago vittata* (le merlan doré) (n=01). Koinari *et al.* (2013) ont identifié *C. parvum* dans des élevages de tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) (n=02), de maquereau marin capturé (*Decapterus macarellus*) (n=02) et de barbillon de Java d'eau douce (poisson sauvage) (*Barbonymus gonionotus*) (n=01). Certad *et al.*, (2015) ont observé cette espèce de *Cryptosporidium* chez l'Omble chevalier (*Salvelinus Alpinus*) (n=04), le brochet (*Esox lucius*) (n=01), le lavaret (*Coregonus lavaretus*) (n=04), la perche commune (*Perca fluviatilis*) (n=04) et le gardon (*Rutilus rutilus*) (n=01). Couso-Pérez *et al.*, (2018) ont également noté la présence de *C. parvum* chez sept (07) poissons d'élevage "La truite arc-en-ciel" (*Onchorynchus mykiss*). Couso- Pérez *et al.* (2019) ont signalé la présence de *C. parvum* chez 47 poissons sauvage d'eau douce "Truite commune" (*Salmo trutta*). Certad *et al.* (2019) ont rapporté l'infection de plusieurs espèces de poissons marins par *C. parvum*; la morue de l'Atlantique (*Gadus morhua*) (n=01), la lingue bleue (*Molva dypterygia*) (n=01), le maquereau (*Scomber scombrus*) (n=01), la sardine (*Sardina pilchardus*) (n=01), le maquereau espagnol (*Scomber japonicus*) (n=02), l'anchois commun (*Engraulis encrasicolus*) (n=01) et le hareng (*Clupea harengus*) (n=01).

Cryptosporidium parvum est l'une des principales espèces infectant les humains (Xiao, 2010). Cependant, il n'est pas clair si les poissons étaient réellement infectés par *Cryptosporidium* ou si la détection de l'ADN de *Cryptosporidium* chez ces poissons était due à l'ingestion mécanique des oocystes. En effet, des études antérieures suggèrent que *C. parvum* peut se développer et se multiplier chez les hôtes aquatiques. Certad *et al.* (2019) ont observé des corps ronds intracellulaires en position apicale, évocateurs des stades du développement de *C. parvum*, sur les cellules épithéliales intestinales lors de l'analyse des coupes histologiques digestives d'un poisson marin positif par la PCR pour *C. parvum*. Couso *et al.* (2018) ont observé sous le microscope à fluorescence des regroupements des oocystes de *C. parvum* dans le tube pylorique d'une jeune truite arc-en-ciel, ce qui pourrait suggérer l'existence de véritables infections des poissons par *C. parvum*, car le traitement des tubes pyloriques avec l'homogénéisateur pourrait casser les cellules épithéliales et libérant des oocystes (libres ou en grappes). Certad *et al.* (2015) ont rapporté que l'analyse histologique des tissus de l'estomac et de l'intestin de poissons PCR-positifs pour *C. parvum* indiquait une véritable infection. De plus, dans une tentative d'établir une infection expérimentale chez la truite arc-en-ciel, Freire-Santos *et al.* (1998) ont signalé la présence d'organismes du type

Discussion

Cryptosporidium dans des coupes histologiques de la région pylorique, après exposition à des oocystes de *C. parvum*.

L'identification de *Cryptosporidium parvum* chez le poisson, pour la première fois en Algérie, indique que la spécificité d'hôte des cryptosporidies est plus large que celle déjà pensée par les chercheurs, et les poissons peuvent contribuer dans la transmission de ce parasite à l'être humain. Plus d'enquêtes utilisant les outils moléculaires et histologiques sont nécessaires pour supporter ces résultats et pour bien comprendre cette spécificité d'hôte et l'épidémiologie de la cryptosporidiose des animaux aquatiques.

IV.3.2 Sous-types obtenus

Dans la présente étude, les sous-types de *C. parvum* issus de l'analyse moléculaire de gp60 par la PCR nichée sont **IaA16G2R1** (01/03), **IaA17G2R1** (01/03) et **IaA12G2T1R1**. Étonnamment, nous avons constaté la présence du tri-nucléotide TCT dans la famille Ia de l'espèce *C. parvum*. En effet, cette famille et toutes les familles de cette espèce du *Cryptosporidium* sont caractérisées par la présence de deux types de tri-nucléotide, qui sont **TCA** et **TCG** avec l'absence totale de la répétition **TCT** (Ryan *et al.*, 2014), ce qui rend l'apparition du sous-type **IaA12G2T1R1**, identifié dans cette étude, inhabituelle. L'observation de ce dernier sous-type présentant une variation d'une seule molécule du gène gp60 pourrait être due soit à l'hétérogénéité de la séquence initiale (produit de PCR), qui pourrait survenir suite à la recombinaison génétique au sein de la population de *Cryptosporidium* spp. pendant la reproduction dans le cas des infections mixtes (Manent-Manent, 2014), soit aux erreurs de la Taq polymérase (Rueckre *et al.*, 2011) en augmentant les chances de mutations par substitution sur la séquence d'ADN et par conséquent, le changement de l'un des tri-nucléotides **TCA** et **TCG** en **TCT**. Cependant, la détection des nouveaux sous-types de *Cryptosporidium* ne devrait pas être éloignée car, pour de nombreux micro-organismes, l'adaptation génétique est souvent proposée comme le principal moteur d'une émergence réussie chez une nouvelle espèce hôte (Pepin *et al.*, 2010 ; Chabas *et al.*, 2018). Ainsi, la forte prévalence et la grande diversité génétique de *C. parvum* dans les pays en développement indiquent que la recombinaison génétique entre divers sous-types pourrait s'y produire plus fréquemment, surtout que la base génétique de l'adaptation des sous-types de *C. parvum* chez l'hôte n'est pas encore claire (Feng *et al.*, 2018). En effet, les changements génétiques peuvent se produire en raison des réparations adaptatives spécifiques à l'hôte, en

particulier lorsque les parasites se croisent entre des hôtes éloignés sur le plan évolutif (Garcia *et al.*, 2020).

La comparaison des sous-types obtenus avec les séquences de référence sur GenBank nous a permis d'identifier ceux qui ont été isolés dans la présente étude. En effet, nous avons déterminé les sous-types qui font partie de la famille IIA. Généralement, les sous-types IIA présentent un risque réel pour la santé publique, car cette famille est connue pour inclure de nombreux sous-types potentiellement zoonotiques (Xiao, 2010). Les sous-types de la famille IIA ont une distribution mondiale chez les mammifères y compris les humains, les bovins et les moutons (Xiao, 2010). Dans notre travail, les sous-types identifiés sont IIAA16G2R1 (01/03), IIAA17G2R1 (1/03) et IIAA13G2R1 (1/03).

La découverte de trois (03) sous-types différents de *C. parvum* dans la population des poissons, révèle une diversité génétique proche à celle précédemment signalée dans les mères entourés la France, la lac Geneva en France, en Espagne, en Australie et en Nouvelle Guinée où 04, 03, 03, 01 et 03 sous-types différents ont été trouvés chez les poissons, respectivement (Reid *et al.*, 2010 ; Koinari *et al.*, 2013 ; Certad *et al.*, 2015, Couso perez *et al.*, 2018, Couso perez *et al.*, 2019 Certad *et al.*, 2019 ;). En effet, le sous-type **IIAA16G2R1** de *Cryptosporidium parvum* est observé dans plusieurs régions du monde chez l'homme et plusieurs espèces animales. Il a été identifié chez les bovins en Pologne, en France, en Portugal, en Pays-Bas, en Belgique, en Espagne, en Allemagne, aux Etats unis, au Canada et en Colombie (Chalmers *et al.*, 2007; Imre *et al.*, 2011 ; Holzhausen *et al.*, 2019). En Algérie, ce sous-type a été rapporté également par Baroudi *et al.* (2017), Sahraoui *et al.* (2019) et Ouakli *et al.* (2018) chez la même espèce animale (le bovin). En Chine, le sous type IIAA16G2R1 est observé chez le yak (Mi *et al.*, 2013) et chez le sanglier en Espagne (García-Preledo *et al.*, 2013). Ainsi, le poisson est connu pour être infecté par ce sous-type. En effet, l'European perch (*Perca fluviatilis*), une espèce des eaux douces, est la seule espèce identifiée comme un hôte de ce sous-type par Certad *et al.* (2015) en France. Notre étude rapporte la première présence de ce sous-type chez le *Sparus aurata* (la dorade). Le sous-type **IIAA17G2R1** de *C. parvum* est également connu pour infecter les humains et les animaux dans le monde entier (Xiao *et al.*, 2007 ; Broglia *et al.*, 2008 ; Wielinga *et al.*, 2008 ; Mi *et al.*, 2014 ; Certad *et al.*, 2015). En Malaisie, KaiTana *et al.* (2019) ont rapporté sa présence chez les rongeurs. En Australie et en Chine, il a été isolé chez les caprins par Al-Habsi *et al.* (2016) et Mi *et al.* (2014), respectivement. Aux Etats unis, Wagnerova *et al.* (2016) ont observé ce sous-type chez les chevaux. En Australie, la présence de sous-type IIAA17G2R1 a été signalé

Discussion

chez le dromadaire (Zahedi *et al.*, 2018). Les ovins sont aussi considérés comme un hôte de ce type en Royaume Uni et en Chine (Smith *et al.*, 2010 ; Mi *et al.*, 2018). Les bovins sont l'espèce animale la plus infectée par ce type, comme il est rapporté dans plusieurs régions du monde à savoir la Pologne, l'Allemagne, le Royaume uni, l'Italie et les Pays bas (Wielinga *et al.*, 2007 ; ; Broglia *et al.*, 2008 ; Brook *et al.*, 2009 ; Duranti *et al.*, 2009 ; Kaupke et Rzeżutka 2015 ; Holzhausen *et al.*, 2019). En revanche, le poisson aussi est connu pour être infecté par le sous-type IIaA17G2R1 de *C. parvum*. En effet, ce dernier a été signalé chez les poissons capturés des eaux douces en France (Arctic char (*Salvelinus alpinus*); Northern pike (*Esox lucius*); European whitefish (*Coregonus lavaretus*) et Roach (*Rutilus rutilus*)) (Certad *et al.*, 2015), chez les poissons cultivés d'eaux douces en Espagne (Rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*)) (Couso perez *et al.*, 2018) et chez les poissons capturés des eaux de mer en France (Blue (*ling Molva*)) (Certad *et al.*, 2019). La description de ce sous-type dans ce travail est faite pour la première fois chez le *Sparus aurata*. En revanche, en Algérie, cet isolat n'a été pas signalé par aucun auteur chez aucune espèce animale.

Concernant le dernier sous-type qu'on a pu l'identifier est **IIaA13G2R1**, il est connu pour infecter l'homme, les bovins, les ovins, les caprins et les équidés dans plusieurs régions dans le monde (Belgique, Pays-Bas, Turquie, Tunisie et les Etats Unis) (Geurden *et al.*, 2007 ; Wielinga *et al.*, 2008; Iqbal *et al.*, 2012 ; Rahmouni *et al.*, 2014 ; Wagnerova *et al.*, 2016 ; Taylan-Ozkan *et al.*, 2016, Yildirim *et al.*, 2020), y compris l'Algérie (Baroudi *et al.*, 2018 ; Benhouda *et al.*, 2017 ; Sahraoui *et al.*, 2019). L'observation de ce sous-type chez les espèces marines ou les poissons n'a pas été mentionnée dans aucune étude auparavant dans le monde entier. En effet, nous avons rapporté sa première présence chez ces espèces par cette recherche. Nous avons observé le sous-type IIaA13G2R1 chez l'espèce des eaux douces "le carassin" (*Carassius carassius*).

D'autres auteurs ont rapporté l'infection des poissons par d'autres sous-types de *C. parvum* qui ne sont pas détectés dans notre travaille. En effet, le sous-type **IIaA14G2R1** est décrit une seule fois chez le tilapia du Nile (*Oreochromis niloticus*) en Papouasie, Nouvelle Guinée (Koinari *et al.*, 2013). Le sous-type **IIaA15G2R1** a été isolé chez l'Omble chevalier (*Salvelinus alpinus*), le lavaret (*Coregonus lavaretus*) et La perche commune (*Perca fluviatilis*) en France (Certad *et al.*, 2015), et chez la truite commune (*Salmo trutta*) en Espagne (Couso perez *et al.*, 2019). Ce sous-type a été également identifié chez les poissons capturés dans l'Est de l'Atlantique chez la morue de l'Atlantique (*Gadus morhua*) (Certad *et al.*, 2019). La description du sous-type **IIaA18G3R1** a été faite chez la truite commune (*Salmo*

Discussion

trutta) provenant des rivières de l'Espagne, la Lingue blanche (*Dypterygia*), le Maquereau (*Scomber scombrus*), la sardine (*Sardina pilchardus*), Le maquereau espagnol (*Scomber japonicus*), L'anchois commun (*Engraulis encrasicolus*), le hareng atlantique (*Clupea harengus*) qui vivent dans les eaux de mer de la France, et chez le merlan (*Sillago vittata*) en Australie (Reid *et al.*, 2010 ; Couso perez *et al.*, 2019 ; Certad *et al.*, 2019). Koinari *et al.* (2013) ont signalé la présence de deux sous-types **IlaA15G2R2** et **IlaA19G4R1** chez le poisson en Australie, ainsi, Certad *et al.* (2019) ont isolé le sous-type **IlaA13G1R1** en France. L'infection des poissons par les trois sous-types observés pourrait être liée au mode de vie de ces derniers. En effet, l'habitat aquatique du l'hôte facilite la libération fréquente d'oocystes et les déjections de fèces contribuent à la distribution et à la transmission des oocystes qui provient du l'homme et des différents animaux contaminés (Masangkay *et al.*, 2020). En revanche, l'infection du poisson par les espèces de *Cryptosporidium* est faible naturellement (Golomazou *et al.*, 2021). Cependant, les études moléculaires réalisées jusqu'à présent (06 études) ont rapporté huit (08) sous-types différents et dans ce travail, nous avons observé un autre sous-type de plus (IlaA13G2R1). Ce qui indique la diversité génétique des sous-types de *Cryptosporidium parvum* qui sont capables d'héberger le poisson. Néanmoins, le rôle zoonotique des poissons infectés par ce parasite n'est pas encore bien défini. D'autres études sont nécessaires pour confirmer ou nier la capacité du poisson dans la transmission des espèces zoonotiques de *Cryptosporidium*, vu le risque lié à son mode de vie et ses taux de consommation dans certains pays.

Il est important d'élucider cette diversité de *Cryptosporidium* spp. pour faire progresser notre compréhension des interactions parasite-hôte, de la spécificité de l'hôte, de l'épidémiologie, de la phylogénie et des implications en santé publique et vétérinaire.

IV.4 Evalaution du risque zoonotique chez les poissons

Le rôle zoonotique des poissons dans la transmission de la cryptosporidiose chez l'homme est mal connu. La plupart des cas d'infection humaine à travers le monde ont impliqué l'espèce *Cryptosporidium parvum* (Xiao, 2010 ; Robertson *et al.*, 2014; Dixon, 2015; Ryan *et al.*, 2016; Efstratiou *et al.*, 2017). L'isolement de cette espèce dans notre étude et dans divers rapports (Reid *et al.*, 2010 ; Koinari *et al.*, 2013 ; Certad *et al.*, 2015; Couso-P'erez *et al.*, 2018) permet de considérer les poissons comme un réservoir potentiel de *Cryptosporidium* pour l'homme et ils peuvent contribuer à la contamination environnementale par ces cryptosporidies zoonotiques. De plus, les fortes précipitations et l'utilisation continue de

Discussion

certaines pratiques agricoles (telles que l'épandage du lisier non traité sur les terres agricoles) favorisent la propagation des oocystes dans les plans d'eau, sans exclure d'autres activités humaines et fauniques, car les espèces zoonotique du *Cryptosporidium* ont un large éventail d'hôtes, ce qui peut contribuer à la contamination de l'environnement (Castro-Hermida *et al.*, 2006 ; Reboredo-Fernández *et al.*, 2015 ; Khan *et al.*, 2018). Bien que le poisson n'est pas connu s'il assure la multiplication du *Cryptosporidium* ou juste il participe dans son passage après avoir l'acquérir du son environnement contaminé par les déchets d'origine humaine et animale (Ryan *et al.*, 2014). Dans notre étude, nous avons pu isolé cette espèce à partir des intestins de poissons en indiquant la possibilité de l'infection des poissons par *Cryptosporidium parvum*, ce qui a été suggéré par certains auteurs (Couso-Pérez *et al.*, 2018; Certad *et al.*, 2015). En outre, les espèces du *Cryptosporidium* sont divisé en deux branches, celles qui infectent seulement l'homme ou *C. parvum* anthroponotique et celles qui se retrouvent chez les animaux (Kissinger, 2019 ; Nader *et al.*, 2019), ce qui rend la détermination des sous-types des espèces du *cryptosporidium parvum* indispensable dans la détermination du risque zoonotique du *C. parvum*. En effet, les sous-types zoonotiques de *C. parvum* représentent la source la plus courante d'infection zoonotique (Ryan *et al.*, 2014). La première détection du *Cryptosporidium parvum* chez le poisson a été signalée chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), suite à la consommation des aliments commerciaux contaminés par des oocystes de *C. parvum* isolés de bovins, mais aucune information sur le génotypage n'est disponible (Freire-Santos *et al.*, 1998). De 2010 à 2021, *C. parvum* a été signalée dans 18 espèces de poissons d'eau douce et de mer. Toutes les études effectuées pendant cette période ont observé la présence des sous-types de la famille zoonotiques IIa (Golomazou *et al.*, 2021). Dans notre étude, nous avons pu identifier trois (03) sous-types différents du *C. parvum* qui font tous partie de la famille zoonotique IIa (**IIaA13G2R1**, **IIaA16G2R1** et **IIaA17G2R1**). Une recherche antérieure sur un cas de *C. parvum* infectant des poissons comestibles, a suggéré le risque zoonotique potentiel de la contamination croisée du tube digestif du poisson au filet du poisson (Certad *et al.*, 2015). Ce qui augmente le risque d'attraper le parasite lors de la consommation des poissons crus ou mal cuit, ainsi, le manque d'hygiène pourrait former une voie de transmission de *Cryptosporidium parvum* à l'homme en particulier chez les patients immunodéprimés (McOliver *et al.*, 2009). Dans ce travail, les espèces de *Cryptosporidium parvum* identifiées sont isolées, à la fois, à partir des intestin et des matières fécales de poissons échantillonnés. Ce qui constitue un risque de la transmission aux pêcheurs et aux consommateurs, surtout que la consommation des poissons est élevée à

l'échelle nationale dans les dernières années. Selon Roberts *et al.* (2007), les pêcheurs sont exposés au risque de la cryptosporidiose après avoir pêcher et consommer des poissons capturés. Selon une variété de facteurs de confusion, tels que l'immunité, les maladies préexistantes et d'autres facteurs spécifiques à l'hôte, cette probabilité indiquait qu'en moyenne un à huit sur dix des pêcheurs pourraient être infectés. La transmission de *C. parvum* par manipulation a été également prouvée dans un cas de crabes bleus (Graczyk *et al.*, 2007). Tandis que la possibilité de l'homme d'être infecter par les espèces piscines du *Cryptosporidium* n'est pas encore déterminée. En effet, une infection expérimentale d'un mammifère (Sourie SCID) par *C. molnari* a été échouée, ce qui indique l'incapacité de cette espèce de se multiplier dans le tractus digestif des mammifères (Certad *et al.*, 2010). En outre, du point de vu moléculaire, et à cause des infections mixtes des poissons par les espèces du *Cryptosporidium* qui sont très fréquentes (lié à l'abondance des oocystes dans l'environnement aquatique), on a suggéré que l'apparition des nouveaux génotypes et sous-types soient liés à l'interaction génétique entre les espèces infectantes. En effet, la co-évolution, la recombinaison génétique, la sélection adaptative et la ségrégation géographique au sein des espèces du *Cryptosporidium* contribuent toutes à façonner la génétique des populations de *Cryptosporidium* spp. Ces processus ont conduit à l'association de certaines structures de population avec des schémas de transmission spécifiques et à l'émergence de populations adaptées à l'hôte, virulentes et hyper transmissibles avec des structures génétiques et un potentiel de santé publique différents (Feng *et al.*, 2018). Le risque zoonotique de la transmission par les poissons des espèces de *Cryptosporidium* est d'une importance majeure du point de vue de la santé publique. La présence de ces parasites dans les poissons comestibles, qui sont couramment consommés crus ou légèrement transformés sans éviscération, pourrait être responsable des épidémies de la cryptosporidiose transmise par les poissons (d'origine alimentaire). Le poisson pourrait être une « nouvelle » source d'infection pour l'homme, même en tant que porteur mécanique, dans la mesure où les parasites sont présents chez les espèces d'intérêt commercial. Le risque d'infection dû à la chair du poisson contaminée lors de l'éviscération, de la transformation, au cours du transport et de l'entrepôt, demeure même si le tractus gastro-intestinal n'est pas consommé (Moratal *et al.*, 2020).

— { **Conclusion & Perspectives** } —

IV. Conclusion et perspectives

Ce travail apporte une contribution originale de l'étude des infections des poissons par les espèces du *Cryptosporidium* en Algérie et en Afrique du nord. Cette étude fournit les premières données épidémiologiques sur la prévalence et les facteurs du risque associés à l'infection par *Cryptosporidium* spp. chez les poissons marins (d'élevage) et d'eau douce (sauvages), dans le Centre et l'Est de l'Algérie. Pour une meilleure estimation de la prévalence de ce parasite chez les poissons, nous avons utilisé les techniques de la biologie moléculaire. Nous constatons que les infections des poissons à *Cryptosporidium* spp. présentent une prévalence globale de 20.10% assez considérable chez la population étudiée des poissons. Le taux d'infection par *Cryptosporidium* spp. obtenu chez les poissons marins d'élevage est aussi bien faible (8.93%) par rapport à celui des poissons sauvages d'eau douce (33.58%) qui est plus au moins élevé, comme il est élevé aussi en comparaison avec d'autres résultats de nombreuses enquêtes menées dans différents pays du monde. Nous avons identifié le parasite chez six (06) espèces du poisson, *Abramis brama* (26.13%), *Carassius carassius* (46.93%), *Rutilus rutilus* (18.64%), *Alburnus alburnus* (49.12%), *Sparus aurata* (8.40%) et *Dicentrarchus labrax* (50%) avec la susceptibilité de *Dicentrarchus labrax* d'être plus infectée que les autres espèces étudiées. En effet, l'isolement de *Cryptosporidium* spp. chez les trois espèces *Carassius carassius*, *Rutilus rutilus* et *Alburnus alburnus*, représente le premier rapport de l'infection de ces espèces animales par le protozoaire. La présente étude démontre ainsi que le parasite circule de plus dans les saisons chaudes (en été (33.03%) et en printemps (36.06%)) à l'Est algérien (33.58%), chez les poissons de petites tailles (30.06%) et ceux provenant des élevages extensifs (33.03%). En revanche, la saison n'influence pas sur la détection du *Cryptosporidium* spp. chez le poisson. D'autres études sont nécessaires pour arriver à bien comprendre l'influence de ces facteurs (la taille, l'habitat, la saison, la région, le type d'élevage et le sexe) sur la variation du taux d'infection par *Cryptosporidium* spp.

De plus, la présente étude rapporte la première caractérisation moléculaire et le sous-typage de *C. parvum* zoonotique chez les espèces de poissons *Carassius carassius* et *Sparus aurata* d'Afrique du Nord (Algérie). Au cours de notre étude, le taux élevé des infections mixtes des poissons par les espèces du *Cryptosporidium* nous a empêché l'isolement de ces espèces en utilisant seulement la PCR nichée, bien que, nous avons arrivé à identifier quatre séquences comme étant *Cryptosporidium parvum*. Ces résultats laissent actuellement la spécificité d'hôte de *Cryptosporidium* spp. chez le poisson mal connue. Bien que la plupart des études moléculaires réalisées jusqu'à présent ont révélé la susceptibilité des poissons au *C. parvum*.

L'infection des poissons particulièrement les espèces *Carassius carassius* et *Sparus aurata* par *C. parvum* représente la première caractérisation moléculaire des cryptosporidies isolés chez le poisson dans le monde entier.

La susceptibilité du poisson au *C. parvum* préalablement rapporté dans certains cas de cryptosporidiose humaine, laisse considérer les poissons comme un réservoir zoonotique non négligeable pour l'homme. Le rôle des poissons dans la dissémination des espèces zoonotiques incluant *C. parvum* reste limité à notre enquête et aux quelques autres enquêtes à travers le monde, et beaucoup d'investigations épidémiologiques supportées par des données moléculaires sont nécessaires pour illustrer cette situation. Nos résultats pourraient être plus vastes et plus déductifs que l'on a obtenu si le séquençage des échantillons positifs aux gènes amplifiés a été réussi et elles n'ont pas présenté des cas d'infection mixte. Pour cela, d'autres études moléculaires sont nécessaires pour mieux comprendre l'épidémiologie de la cryptosporidiose chez les poissons en Algérie et pour évaluer le risque des différentes espèces de poissons d'eau de mer et d'eau douce en tant qu'hôtes potentiels de sous-types zoonotiques de *Cryptosporidium*. En effet, il existe des méthodes moléculaires qui peuvent mettre en place pour résoudre le défi des cas d'infection mixte avec l'investigation des séquences inhabituelles chez le poisson, ce qui nous a constitué un obstacle lors de l'identification des espèces de *Cryptosporidium* dans cette étude. Le taux élevé des infections mixtes dans la présente étude est certainement dû au mode de vie des animaux étudiés (environnement aquatique), ce qui facilite l'attraction de plusieurs espèces du *Cryptosporidium*, surtout que ce dernier est un parasite hydrique. La méthode du clonage suivie par le séquençage (Sanger) ou l'utilisation du NGS (Nexte Generation Sequencing) peuvent permettre de résoudre le problème du séquençage des mélanges d'amplicons (produit de la PCR dans le cas des infections mixtes). Les méthodes de NGS (MLTS, WGS) permettent la détection du polymorphisme de la longueur et de la substitution des nucléotides dans les marqueurs microsatellites et mini-satellites, et l'inclusion des marqueurs avec uniquement les SNPs, ce qui permet l'isolement correcte du gène recherché. Le NGS a déjà été exploité avec succès pour caractériser les génotypes présents dans les infections humaines mixtes par des souches du virus de la grippe (H1N1) et du cytomégalovirus (HCMV). Récemment, des stratégies de séquençage en profondeur ont été utilisées pour découvrir l'étendue des infections mixtes chez les poissons à l'aide de la plateforme de NGS (l'Ion Torrent). En revanche, le clonage (incorporation d'un amplicon au niveau d'un plasmide bactérien) permet d'isoler seulement le gène cible pour donner une identification précise du gène recherché. Il a la capacité de détecter dans une seule molécule d'ADN d'un gène des variations causées soit par

l'hétérogénéité de la séquence d'ADN, soit par les erreurs de la Taq polymérase au cours de l'amplification, il est donc plus susceptible à détecter les polymorphismes de bas niveau par rapport au séquençage du type Sanger. De plus, les chances de la persistance des hétéro-duplex (résultant de l'association des bases nucléotidiques d'origine différente sur le brin complémentaire d'ADN) lors du processus du clonage sont minimales en raison de la capacité du système bactérien (*E. coli*) d'éliminer les mésappariements au niveau du gène cloné, ce qui peut conduire à la conversion de l'hétéro-duplex en une seule séquence hybride. Le clonage a déjà été exploité avec succès pour caractériser les espèces du *Cryptosporidium* présentes dans les infections mixtes chez le porc en Irlande. Cependant, les résultats du clonage ne sont fiables que pour les espèces et les génotypes qui sont déjà bien décrits en raison de la surestimation de la véritable diversité génétique de ce parasite dans l'échantillon, et conduire à des conclusions erronées sur les sources de la contamination. Ainsi, les séquences d'ADN clonées de *Cryptosporidium* provenant des échantillons environnementaux, gastriques des poissons ou des excréments des animaux sauvages, et qui ne fournissent pas une correspondance à 100% avec les séquences de référence sur **GenBank**, peuvent représenter des artefacts chimériques ou des hétéro-duplex provenant de la PCR multi-modèles.

Références

Références

1. **Aghamolaie, S., Rostami, A., Fallahi, Sh., Tahvildar-Biderouni, F., Haghghi, A., Salehi, N.** 2016. Evaluation of modified Ziehl-Neelsen, direct fluorescent-antibody and PCR assay for detection of *Cryptosporidium* spp. in children faecal specimens. *Journal of Parasite Disease* 40, 958-63
2. **Akam, A., Lafri, M., Khelef, D., Kaidi, R., Bouchène, Z., Cozma, V.** et al. 2007. Cryptosporidiose bovine dans la region de la mitidja (algerie). *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Veterinary Medicine*, 64
3. **Aldeyarbi, H.M., Karanis, P.** 2016a. Electron microscopic observation of the early stages of *Cryptosporidium parvum* asexual multiplication and development in in vitro axenic culture. *European Journal of parasitology* 52, 36-44
4. **Aldeyarbi, H.M., Karanis, P.** 2016b. The fine structure of sexual stage development and sporogony of *Cryptosporidium parvum* in cell-free culture. *Parasitology* 143, 749-761
5. **Aldeyarbi, H.M., Karanis, P.** 2016c. The Ultra-Structural Similarities between *Cryptosporidium parvum* and the Gregarines. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 63, 79-85
6. **Al-Habsi, K., Yang, R., Williams, A., Miller, D., Ryan, U., Jacobson, C.** 2017. Zoonotic *Cryptosporidium* and *Giardia* shedding by captured rangeland goats. *Veterinary Parasitology: Regional Study Reports* 7, 32-35
7. **Alvarez- Pellitero, P., Quiroga, M.I., Sitja-Bobadilla, A., Redondo, M.J., Palenzuela, O., Padros, F., Vazquez, S., Nieto, J.M.** 2004. *Cryptosporidium scopthalmi* n. sp. (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Diseases of Aquatic Organisms* 62, 133-145
8. **Álvarez-Pellitero, P., Sitjà-Bobadilla, A.** 2002. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *International Journal Parasitology* 32, 1007–1021
9. **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. *Journal of clinical Microbiology* 41, 2744-2747
10. **Bamaiyi, P. and Redhuan, N.** 2017. Prevalence and risk factors for cryptosporidiosis: A global, emerging, neglected zoonosis. *Asian Biomedcal* 10, 309-325
11. **Barker, I.K., Carbonell PL.** 1974. *Cryptosporidium Agni* sp. n. from lambs and *Cryptosporidium bovis* sp. n. from a calf, with observations on the oocyst. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 44, 289–298
12. **Barnes, D.A., Bonnin, A., Huang, J.X., Gousset, L., Wu, J., Gut, J.,**

- Doyle, P., Dubremetz, J.F., Ward, H., Petersen, C. 1998. A novel multi-domain mucin-like glycoprotein of *Cryptosporidium parvum* mediates invasion. *Molecular and biochemical parasitology* 96, 93-110
13. Baroudi, D., Hakem, A., Adamu, H., Amer, S., Khelef, D., Adjou, K., Dahmani, H., Chen, X., Roellig, D., Feng, Y., Xiao, L. 2018a. Zoonotic *Cryptosporidium* species and subtypes in lambs and goat kids in Algeria. *Parasites and Vectors* 11, 582
14. Baroudi, D., Khelef, D., Hakem, A., Abdelaziz, A., Chen, X., Lysen, C. Roellig, D., Xiao, L. 2017. Molecular characterization of zoonotic pathogens *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in calves in Algeria. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 8, 66–9
15. Baroudi, D., Khelef D., Goucem, R., Adjou, K.T., Adamu, H., Zhang, H. 2013. Common occurrence of zoonotic pathogen *Cryptosporidium meleagridis* in broiler chickens and turkeys in Algeria. *Veterinary Parasitology* 196, 334-340
16. Baroudi, D., Zhang, H., Amer, S., Khelef, D., Roellig, D.M., Wang, Y. 2018b. Divergent *Cryptosporidium parvum* subtype and *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in dromedary camels in Algeria. *Parasitology Research* 117, 905–10
17. Barugahare, R., Becker, J.A., Landos, M., Slapeta, J., Dennis, M.M. 2011. Gastric cryptosporidiosis in farmed Australian Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*. *Aquaculture*. 314, 1-6
18. Benamrouz, S., Conseil, V., Chabé, M., Praet, M., Audebert, C., Blervaque, R., Guyot, K., Gazzola, S., Mouray, A., Chassat, T., Delaire, B., Goetinck, N., Gantois, N., Osman, M., Slomianny, C., Dehennaut, V., Lefebvre, T., Viscogliosi, E., Cuvelier, C., De-Cas, E., Creusy, C., Certad, G. 2014. *Cryptosporidium parvum*-induced ileo-caecal adenocarcinoma and Wnt signaling in a mouse model. *Disease models & mechanisms*. 7, 693-700
19. Bennadji, M., Mimoune, N., Khelef, D., Oumouna, M. 2022. Prevalence of cryptosporidiosis in goats in central Algeria. *Veterinarska stanica* 53
20. Benhouda, D., Hakem, A., Sannella, A.R., Benhouda, A. Cacciò, S.M. First molecular investigation of *Cryptosporidium* spp. in young calves in Algeria. *Parasite* 24
21. 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
22. Bolland, S.J., Zahedi, A., Oskam, C., Murphy, B. and Ryan, U. 2020. *Cryptosporidium bollandi* n. sp. (*Apicomplexa; Cryptosporididae*) from angelfish (*Pterophyllum scalare*) and Oscar fish (*Astronotus ocellatus*). *Experimental Parasitology*, 217, 107956
23. Bones, A.J., Jossé, L., More, C., Miller, C.N., Michaelis, M.,

- Tsaousis, A.** 2018. Past and future trends of *Cryptosporidium* in vitro research. *Experimental Parasitology*. 196, 28-37
24. **Borowski, H., Thompson, R.C., Armstrong, T., Clode, P.L.** 2010. Morphological characterization of *Cryptosporidium parvum* life-cycle stages in an in vitro model system. *Parasitology* 137, 13-26
25. **Bourdais-Massenet, D.** 2008. Étude de la prévalence de la cryptosporidiose en élevage canin. Thèse Médecine Vétérinaire., Alfort
26. **Bourgouin, H.,** 1996. La place de la cryptosporidiose dans les maladies néonatales du veau en Corrèze. G.T.V.19-41
27. **Bouزيد, M., Hunter, P., Chalmers, R., Tyler, K.** 2013. *Cryptosporidium* Pathogenicity and Virulence. *Journal of clinical microbiology*. 26, 115-34
28. **Broglia, A., Reckinger, S., Caccio, S.M., Nockler, K.** 2008. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. *Veterinary Parasitology* 154, 8-13
29. **Brook, E.J., Anthony, Hart C., French, NP.** 2009. Christley RM. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. *The veterinary journal* 179, 378-82.
30. **Burnet, J.B., Penny, C., Ogorzaly, L. and Cauchie, H.M.** 2014. Spatial and temporal distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* in a drinking water resource: Implications for monitoring and risk assessment. *The Science of the total environment* 472, 1023-1035
31. **Cacciò S, Chalmers R M.** 2016. Human Cryptosporidiosis in Europe. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 22, 471-80
32. **Cacciò, S., Pozio, E.** 2006. Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. *Expert review of anti-infective therapy* 4, 429-43
33. **Cama, V.A., Bern, C., Roberts, J., Cabrera, L., Sterling, C.R., Ortega, Y., Gilman, R.H., Xiao, L.** 2008. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerging infectious diseases* 14, 1567- 1574
34. **Camus, A.C., Lopez, M.K.** 1996. Gastric cryptosporidiosis in juvenile Red Drum. *Journal of Aquatic Animal Health* 8, 167-172
35. **Castro-Hermida, J. A., Carro-Corral, C., González-Warleta, M., Mezo, M.** 2006. Prevalence and intensity of infection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Galicia (NW Spain). *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 53, 244-246
36. **CDC (Centers for disease Control and Prevention),** 2019. https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/modules/Cryptosporidium_Life_Cycle_lg.jpg.
37. **Certad, G.** 2008. De la caracterisation genetique et phenotypique de *Cryptosporidium* (Alveolata :

- Apicomplexa*) a la mise en évidence du rôle de *C. parvum* dans l'induction de neoplasie digestive. Université de Droit et Santé de Lille 2, these de doctort.
38. Certad, G., Dupouy-Camet, J., Gantois, N., Hammouma-Ghelboun, O., Pottier, M., Guyot, K., Benamrouz, S., Osman, M., Delaire, B., Creusy, C., Viscogliosi, E., Dei-Cas, E., Aliouat-Denis, CM., Follet, J. 2015. Identification of *Cryptosporidium* species in fish from Lake Geneva (Lac Lemman) in France. PLoS One 0133047
 39. Certad, G., Follet, J., Gantois, N., Hammouma-Ghelboun, O., Guyot, K., Benamrouz-Vanneste, S., Fréalle, E., Seesao Y., Delaire, B., Creusy, C., Even G., Verrez-Bagnis, V., Ryan, U., Gay, M., Aliouat-Denis, C. Viscogliosi, E. 2019. Prevalence, Molecular Identification, and Risk Factors for *Cryptosporidium* Infection in Edible Marine Fish: A Survey across Sea Areas Surrounding France. *Frontiers in microbiology* 10:1037
 40. Certad, G., Creusy, C., Guyot, K., Mouray, A., Chassat, T., Delaire, B., Pinon, A., Sitja- Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P., Praet, M., Cuvelier, C., Dei-Cas, E. 2010. Fulminant cryptosporidiosis associated with digestive adenocarcinoma in SCID mice infected with *Cryptosporidium parvum* TUM1 strain. *International Journal of Parasitology* 40, 1469–1475
 41. Cevallos, A.M., Zhang, X., Waldor, M.K., Jaison, S., Zhou, X., Tzipori, S., Neutra, M.R., Ward, H.D. 2000. Molecular cloning and expression of a gene encoding *Cryptosporidium parvum* glycoproteins gp40 and gp15. *Infection and immunity* 68, 4108-4116
 42. Chabas, H., Lion, S., Nicot, A., Meaden, S., van Houte, S., Moineau, S., Wahl, L. M., Westra, E. R., Gandon, S. 2018. Evolutionary emergence of infectious diseases in heterogeneous host populations. *PLoS Biology* 16, e2006738
 43. Chacín-Bonilla, L. 2007. *Cryptosporidium*: phylogeny and taxonomy. *Investigación clínica* 48(1), 1–4
 44. Chalmers, R., Campbell, B.M., Crouch, N., Charlett, A., Davies, A.P. 2011. Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven *Cryptosporidium* assays used in the UK. *Journal of medical microbiology* 60, 1598-1604
 45. Chalmers, R., Davies, A. P., 2010. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology* 124,138–146.
 46. Chalmers, R., Jackson, C., Elwin, K., Hadfield, S., Hunter, P. 2007. Investigation of genetic variation within *Cryptosporidium hominis* for epidemiological purposes. Final report to DWI. National Public Health Service for Wales
 47. 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

48. **Chartier, C., Paraud C.** 2010. La cryptosporidiose des ruminants. Bull. GTV 52, 83-92
49. **Chappell, C.L., Okhuysen P.C., Langer-Curry, R., Widmer, G., Akiyoshi, D.E., Tanriverdi, S., Tzipori, S.** 2006. *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. American Journal of Tropical Medicine Hygiene 75, 851-857
50. **Checkley, W. White Jr, AC., Jaganath, D., Arrowood, MJ., Chalmers, RM., Chen, XM., Fayer, R., Griffiths, JK., Guerrant, RL., Hedstrom, L., Huston, CD., Kotloff, KL., Kang, G., Mead, JR., Miller, M., Petri, WA., Priest, JW., Roos, DS., Striepen, B., Thompson, RC., Ward, HD., Van Voorhis, WA., Xiao, L., Zhu, G., Houpt, ER.** 2015. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *cryptosporidium*. The Lancet Infectious Diseases 15, 85–94
51. **Chyzheuskaya, A., Cormican, M., Srivinas, R., O'Donovan, D., Prendergast, M., O'Donoghue, C., Morris, D.** 2017. Economic Assessment of Waterborne Outbreak of Cryptosporidiosis. Emerging infectious diseases 23, 1650-1656
52. **Clark, D.P., Sears, C.L.** 1996. The pathogenesis of cryptosporidiosis. Parasitology Today 12, 221-225
53. **Costa, J., Cristina, C., Eiras, J. C., Saraira, A.** 2016. Characterization of a *Cryptosporidium scophthalmi*-like isolate in farmed turbot (*Scophthalmus maximus*) using histological and molecular tools. Diseases of Aquatic Organisms
54. **Costa, J.; Saraiva, A.** 2018. *Cryptosporidium cf. scophthalmi* JFC-2015 18S Ribosomal RNA Gene, Partial Sequence.
55. **Couso-Pérez, S., Ares-Mazás, E., Gómez-Couso, H.** 2018. Identification of a novel piscine *Cryptosporidium* genotype and *Cryptosporidium parvum* in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Parasitology 117, 2987–2996
56. **Couso-Pérez, S., Ares-Mazás, E., Gómez-Couso, H.** 2019. First Report of *Cryptosporidium molnari*-Like Genotype and *Cryptosporidium parvum* Zoonotic Subtypes (IIaA15G2R1 and IIaA18G3R1) in Brown Trout (*Salmo trutta*). Journal of Parasitology 105, 170-179
57. **Couso-Pérez, S., de Limia, FB., Ares-Mazás, E., Gómez-Couso, H.** 2020. First report of zoonotic *Cryptosporidium parvum* GP60 subtypes IIaA15G2R1 and IIaA16G3R1 in wild ponies from the northern Iberian Peninsula. Parasitology Research 119, 249-254
58. **Current, W.L., Garcia, L.S.,** 1991. Cryptosporidiosis. Clinical Laboratory of Medicine 11, 873-897.
59. **Dadda, A., Mohamed-Cherif, A., Ait-Oudhia, K., Aoun, L., Khelef, D.**

2022. Epidemiology of cryptosporidiosis in dairy calves in central and eastern Algeria. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 72, 3285-3292
60. **De Graaf, DC.** 2000. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *International journal of parasitology* 29, 1269-87
61. **De Graaf D.C., Spano F., Petry F. Sagodira S., Bonnin A.,** 1999. Speculation on whether a vaccine against cryptosporidiosis is a reality or fantasy. *International journal for parasitology* 29, 1289-1306
62. **DGPA (Direction générale de la pêche et de l'aquaculture).** 2018. la pêche et l'aquaculture en Algérie, situation et enjeux économiques. Séminaire organisé dans le cadre du projet du ministère de l'agriculture et du développement rural et de la pêche sur la planification du développement de l'aquaculture (Tunisie, Octobre 2018). <http://www.fao.org/fi/staticmedia/MeetingDocuments/BlueHope/Inception/6f.pdf> (consulté le 21/11/2021)
63. **Díaz, P., Quílez, J., Prieto, A., Navarro, E., Pérez-Creo, A., Fernández, G., Panadero, R., López, C., Díez-Baños, P., Morrondo, P.** 2015. *Cryptosporidium* species and subtype analysis in diarrhoeic pre-weaned lambs and goat kids from north-western Spain. *Parasitology Research* 114, -105
64. **Dixon, B. R.** 2015. Transmission dynamics of foodborne parasites on fresh produce. *Foodborne parasites in the food supply web.* Woodhead Publishing 317-353
65. **DuPont, H.L., Chappell, C.L., Sterling, C.R., Okhuysen, P.C., Rose, J.B., Jakubowski, W.** 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *The New England journal of medicine* 332, 855-859
66. **Duranti A., Cacciò, SM., Pozio, E., Di Egidio, A., De Curtis, M., Battisti, A., Scaramozzino, P.** 2009 Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in cattle. *Zoonoses Public Health* 56, 176-82
67. **Efstathiou, A., Ongerth, J.E., Karanis, P.** 2017. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - An update 2011–2016. *Water research.* 114, 14–22
68. **Elwin, K., Robinson, G., Hadfield, S.J., Fairclough, H.V., Iturriza-Gómara, M., Chalmers, R.M.** 2012. A comparison of two approaches to extracting *Cryptosporidium* DNA from human stools as measured by a real-time PCR assay. *Journal of microbiological methods* 89, 38-40
69. **Fayer, R.** 2004. Review *Cryptosporidium: A water-borne Zoonotic Parasite.* *Veterinary Parasitology* 126, 37–56
70. **Fayer, R., 2008.** General biology. In: **Fayer R., Xiao L.** (eds) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, 2nd edn. CRC Press, BocaRatón, Florida, pp 1–42
71. **Fayer, R.** 2010. Taxonomy and species delimitation in

- Cryptosporidium*. Experimental Parasitology 124, 90–97
72. **Fayer, R., Lewis, E. J., Trout, J. M., Graczyk, T. K., Jenkins, M. C., Higgins, J., Xiao, L., Lal, A.A.** 1999. *Cryptosporidium parvum* in oysters from commercial harvesting sites in the Chesapeake Bay. Emerging infectious diseases 5, 706–710
 73. **Fayer, R., Trout, J. M., Lewis, E. J., Santin, M., Zhou L., Lal, A. A., Xiao, L.** 2003. Contamination of Atlantic coast commercial shellfish with *Cryptosporidium*. Parasitology research 89, 141–145.
 74. **Fayer, R., Trout, J. M., Lewis, E. J., Xiao, L., Lal, A. A., Jenkins, M. C., Graczyk, T. K.** 2002. Temporal variability of *Cryptosporidium* in the Chesapeake Bay. Parasitology research 88,998–1003
 75. **Fayer, R., Morgan, U., Upton, S.J.** 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. International Journal for Parasitology 30, 1305–1322.
 76. **Fayer, R., Santín, M., Macarisin, D.** 2010 *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. Veterinary parasitology, 172, 23–32
 77. **Fayer, R., Santin, M., Xiao, L.** 2005. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) in cattle (*Bos Taurus*). Journal of Parasitology 91, 624–629
 78. **Fayer, R., Graczyk, T. K., Lewis, E. J., Trout, J. M., Farley, C. A.** 1998. Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in sea water and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. Applied and environmental microbiology.64, 1070–1074.
 79. **Fayer, R., Trout, J.M., Xiao, L., Morgan, U.M., Lai, A.A., Dubey, J.P.** 2001. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. Journal of Parasitology 87, 1415– 1422.
 80. **Fayer, R., Ungar, B.L.,** 1986. *Cryptosporidium* spp and cryptosporidiosis. Microbiological reviews, 50, 458-483
 81. **Feng, Y., Alderisio, K.A., Yang, W., Blancero, L.A., Kuhne, W.G., Nadareski, C.A., Reid, M., Xiao, L.** 2007. *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. Applied and environmental microbiology 73, 6475-6483
 82. **Feng, Y., Ryan, UM., Xiao, L.** 2018. Genetic Diversity and Population Structure of *Cryptosporidium*. Trends of Parasitology 34, 997-1011
 83. **Freire-Santos, F., Oteiza-Lo´pez A. M., Vergara-Castiblanco, C. A., E.Ares-Maza,´S., Alvarez-Sua´rez, E., Garc´ıa-Mart´ın. O.** 2000. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve mollusc’s destined for human consumption. Journal of Parasitology 86, 853–854
 84. **Freire-Santos, F., Vergera-Castiblanco, C.A., Tojo-Rodriguez, J.L., Santamarina Fernandez, T., Ares-Mazas, E.** 1998. *Cryptosporidium parvum*: an attempt at experimental infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Parasitology. 84, 935-938

85. **García-Presedo, I., Pedraza-Díaz, S., González-Warleta, M., Mezo, M., Gómez-Bautista, M., Ortega-Mora, LM., Castro-Hermida, JA.** 2013. Presence of *Cryptosporidium scrofarum*, *C. suis* and *C. parvum* subtypes IIAA16G2R1 and IIAA13G1R1 in Eurasian wild boars (*Sus scrofa*). *Veterinary parasitology* 196, 497-502
86. **Garcia-R, JC., Cox, MP., Hayman, DTS.** 2020. Comparative genetic diversity of *Cryptosporidium* species causing human infections. *Parasitology* 147, 1532-1537
87. **Geurden, T., Berkvens, D., Martens, C., Casaert, S., Vercruyse, J., Claerebout, E.** 2007. Molecular epidemiology with subtype analysis of *Cryptosporidium* in calves in Belgium. *Parasitology* 134, 1981-7
88. **Golomazou, E., and Karanis, P.** 2020. *Cryptosporidium* Species in Fish: An Update. *Environmental Sciences Proceedings* 2, 13
89. **Golomazou, E., Malandrakis, E.E., Panagiotaki, P. and Karanis, P.** 2021. *Cryptosporidium* in fish: Implications for aquaculture and beyond. *Water Research*, 201, 117357
90. **Gomez-Couso, H., Freire-Santos, F., Amar, C. F. L., Grant, K. A., Williamson, K., Ares-Maza s. M. E., McLaughlin, J.** 2004. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multi-plexed nested-PCR. *International journal of food microbiology* 91, 279-288
91. **Gomez-Couso, H., Méndez-Hermida, F., Castro-Hermida, J. A., Ares-Maza s. E.** 2005. Occurrence of *Giardia* cysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) destined for human consumption. *Journal of food protection* 68, 1702-1705
92. **Gomez-Couso, H., Méndez-Hermida, F., Castro-Hermida, J. A., Ares-Maza s. E.** 2006. *Cryptosporidium* contamination in harvesting areas of bivalve molluscs. *Journal of food protection* 69, 185-190
93. **Graczyk, T. K., Fayer, R., Lewis, E. J., Trout, J. M., Farley C. A.** 1999. *Cryptosporidium* oocysts in Bent mussels (*Ischadium recurvum*) in the Chesapeake Bay. *Parasitology research*. 85, 518-521.43
94. **Graczyk, T. K., Lewis, E. J., Glass, G., Da Silva, A. J., Tamang, L., Girouard, A. S., Curriero, F. C.** 2007. Quantitative assessment of viable *Cryptosporidium parvum* load in commercial oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Parasitology research* 100:247-253.44
95. **Graczyk, T. K., Marcogliese, D. J., de Lafontaine, Y., Da Silva, A. J., Mhangami-Ruwende, B., Pieniazek, N. J.** 2001. *Cryptosporidium parvum* oocysts in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): evidence from the St Lawrence River. *Parasitology research* 87, 231-234
96. **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. *Journal of clinical microbiology* 46, 2396-8

97. **Guechtouli, S., Mimoune, N., Messai, CH. Salhi, O., Kaidi, R., Khelef, D.** 2022. *Cryptosporidium* sp. infection in the broiler chickens and turkeys on farms in north central Algeria. *Veterinarska stanica* 53
98. **Guyot, K., Ngouanesavanh, TM. Dei-Cas, E.** 2005. Strategies for detecting pathogenic protists in water: the point on *Cryptosporidium*. *European journal of water quality, Association scientifique européenne pour l'eau ET la santé*, 36, 51–70
99. **Hadfield, S.J., Robinson, G., Elwin, K., Chalmers, R.M.** 2011. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. *Journal of clinical microbiology* 49, 918-924
100. **Harp, J. A., Chen, W. & Harmsen, A. G.** 1992. Resistance of severe combined immunodeficient mice to infection with *Cryptosporidium parvum*: The importance of intestinal microflora. *Infection and Immunity* 60, 3509–3512
101. **Harp, J.A., Woodmansee, D.B., Moon, H.W.** 1990. Resistance of calves to *Cryptosporidium parvum*: effects of age and previous exposure. *Infection and Immunity* 58, 2237-2240
102. **Harp, J. A., Wannemuehler, J. W., Woodmansee, D. B. & Moon, H. W.** 1988. Susceptibility of germfree or antibiotic-treated adult mice to *Cryptosporidium parvum*. *Infection and Immunity* 56, 2006–2010
103. **Hijjawi, N.** 2010a. *Cryptosporidium*: new developments in cell culture. *Experimental parasitology*, 54, 655-60.
104. **Hijjawi, N., Estcourt, A., Yang, R., Monis, P., Ryan, U.** 2010b. Complete development and multiplication of *Cryptosporidium hominis* in cell-free culture. *Veterinary parasitology* 169, 29-36
105. **Hijjawi, N.S., Meloni, B.P., Ng'anzo, M., Ryan, U.M., Olson, M.E., Cox, P.T., Monis, P.T., Thompson, R.C.** 2004. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *International journal for parasitology* 34, 769-777
106. **Hijjawi, N.S., Meloni, B.P., Ryan, U.M., Olson, M.E., Thompson, R.C.** 2002. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *International journal for parasitology* 32, 1719-1726
107. **Hocine, A.R., Bouzid, R., Ladjama, M. Khalef, D.** 2016. Prevalence of *Cryptosporidium* Oocysts in Calves in Two Aereas from Aestern Algeria. *Global Veterinaria* 17, 335-342
108. **Hohweyer, J., Cazeaux, C., Travaillé, E., Languet, E., Dumètre, A., Aubert, D., Terryn, C., Dubey, JP., Azas, N., Houssin, M., Loïc, F., Villena, I., La Carbona, S.** 2016. Simultaneous detection of the protozoan parasites *Toxoplasma*,

- Cryptosporidium* and *Giardia* in food matrices and their persistence on basil leaves. *Food microbiology* 57, 36-44
109. **Holubová, N., Tůmová, L., Sak, B., Hejzlarová, A., Konečný, R., McEvoy, J., Kváč, M.** 2020. Description of *Cryptosporidium ornithophilus* n. sp. (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) in farmed ostriches. *Parasit and Vectors* 13, 340
110. **Holubová, N., Zikmundová, V., Limpouchová, Z., Sak, B., Konečný, R., Hlásková, L., Rajský, D., Kopacz, Z., McEvoy, J., Kváč, M.** 2019. *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) in Psittaciformes birds. *European journal of protistology* 69, 70-87
111. **Holzhausen, I., Lendner, M., Göhring, F., Steinhöfel, I., Dauschies, A.** 2019 Distribution of *Cryptosporidium parvum* gp60 subtypes in calf herds of Saxony, Germany. *Parasitology and Research* 118,1549-1558
112. **Hoover, D. M., Hoerr, F.J., Carlton, W.W., Hinsman, E.J., Ferguson, H.W.** 1981. Enteric cryptosporidiosis in a naso tang, *Naso lituratus* Bloch and Schneider. *Journal of Fish Diseases* 4, 425-428
113. **Imre, K., Dărăbus, G.** 2011. Distribution of *Cryptosporidium* species, genotypes and *C. parvum* subtypes in cattle in European countries. *Scientia Parasitologica* 12, 1-9
114. **Iqbal, A., Lim, Y.A., Surin, J., Sim, B.L.** 2012. High diversity of *Cryptosporidium* subgenotypes identified in Malaysian HIV/AIDS individuals targeting gp60 gene. *PLoS One* 7-31139
115. **Jex, A.R., Smith, H.V., Monis, P.T., Campbell, B.E., Gasser, R.B.** 2008. *Cryptosporidium* Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnology advances* 26, 304-317
116. **Jittapalpong, S., pinyopanuwat, N., chimnoi W., siripanth, C., stich, R.** 2006. Prevalence of *Cryptosporidium* among Dairy Cows in Thailand. *New York Academy of Sciences* 1081:328-35
117. **Jokipii, L., Jokipii, A.M.M.** 1986. Timing of Symptoms and Oocysts Excretion in Human Cryptosporidiosis. *The New England Journal of Medicine* 315, 1643-1547
118. **Judo, M. S., Wedel, A. B., Wilson, C.** 1998. Stimulation and suppression of PCR-mediated recombination. *Nucleic Acids Research* 26, 1819-1825
119. **Kaitana, Karolina.** 2019. Pengaruh Kegiatan Spbu Jalan Baru Terhadap Kinerja Ruas Jalan Jenderal Sudirman (Studi Kasus pada Ruas Jalan Depan SBPU Jalan Baru). Thèse de doctorat. Politeknik Saint Paul Sorong.
120. **Kanagawa, T.** 2003. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96, 317-323

121. **Kaupke, A., Rzeżutka, A.** 2015. Emergence of novel subtypes of *Cryptosporidium parvum* in calves in Poland. *Parasitology research* 114, 4709-16
122. **Khan, A., Shaik, J. S., Grigg, M. E.** 2018. Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. *Acta Tropica* 184, 1-14.
123. **Kim, K., Gooze, L., Petersen, C., Gut, J., Nelson, R.G.** 1992. Isolation, sequence and molecular karyotype analysis of the actin gene of *Cryptosporidium parvum*. *Molecular and biochemical parasitology* 50, 105-113
124. **Kissinger, J.C.** 2019. Evolution of *Cryptosporidium*. *Nature microbiology* 4, 730-731
125. **Klein, P., Kleinova, T., Volek, Z., Simunek, J.** 2008. Effect of *Cryptosporidium parvum* infection on the absorptive capacity and paracellular permeability of the small intestine in neonatal calves. *Veterinary Parasitology* 152, 53- 59
126. **Koinari, M., Karl, S., Ng-Hublin, J., Lymbery, A.J., Ryan, U.** 2013. Identification of novel and zoonotic *Cryptosporidium* species in fish from Papua New Guinea. *Veterinary Parasitology* 198, 1-9
127. **Kotloff, K.L., Nataro, J.P., Blackwelder, W.C., Nasrin, D., Farag, T.H., Panchalingam, S., Wu, Y., Sow, S.O., Sur, D., Breiman, R.F., Faruque, A.S., Zaidi, A.K., Saha, D., Alonso, P.L., Tamboura, B., Sanogo, D., Onwuchekwa, U., Manna, B., Ramamurthy, T., Kanungo, S., Ochieng, J.B., Omere, R., Oundo, J.O., Hossain, A., Das, S.K., Ahmed, S., Qureshi, S., Quadri, F., Adegbola, R.A., Antonio, M., Hossain, M.J., Akinsola, A., Mandomando, I., Nhampossa, T., Acacio, S., Biswas, K., O'Reilly, C.E., Mintz, E.D., Berkeley, L.Y., Muhsen, K., Sommerfelt, H., Robins-Browne, R.M., Levine, M.M.** 2013. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet* 382, 209 – 222
128. **Koompapong, K., Sukthana, Y.** 2012. Seasonal variation and potential sources of *Cryptosporidium* contamination in surface waters of Chao Phraya River and Bang Pu nature reserve pier, Thailand. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 43, 832-840
129. **Kuczynska, E., and Shelton, D. R.** 1999. Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts from feces, manure, and soils. *Appl. Environmental microbiology* 65, 2820-2826
130. **Kuo, C-H., Wares, J.P., Kissinger, J.C.** 2008. The Apicomplexan whole-genome phylogeny: an analysis of incongruence among gene trees. *Molecular biology and evolution* 2, 2689-98
131. **Kvac, M., Nemejc, K., Kestranova, M., Kvetonova, D., Wagnerova, P., Kotkova, M., Rost, M., Samkova, E., McEvoy, J., Sak,**

- B.** 2014. Age related susceptibility of pigs to *Cryptosporidium scrofarum* infection. *Veterinary and Parasitology* 202, 330-334
132. **Laathamna A.E.** 2013. Caractérisation moléculaire de *Cryptosporidium* spp. Et *Microsporidia* chez les équidés en Algérie. Sciences vétérinaires. Ecole nationale supérieure vétérinaire, Alger. These de doctorat.
133. **Laatamna. A.E.** 2018. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in farmed animals from steppe and high plateau regions in Algeria. *Tropical Biomedicine* 35, 724–735
134. **Laatamna, A.K., Holubova, N., Sak, B. Kvac, M.** 2017. *Cryptosporidium meleagridis* and *C. baileyi* (Apicomplexa) in domestic and wild birds in Algeria. *Folia Parasitologica* 64
135. **Laatamna, A.E., Wagnerová, P., Sak, B., Květoňová, D., Aissi, M., Rost, M. Kváč, M.** 2013. Equine cryptosporidial infection associated with *Cryptosporidium hedgehog* genotype in Algeria. *Veterinary Parasitology* 197, 350–3
136. **Laatamna, A.E., Wagnerová, P., Sak, B., Květoňová, D., Xiao, L., Rost, M. McEvoy, J., Saadi, AR., Aissi, M., Kváč, M.** 2015. *Microsporidia* and *Cryptosporidium* in horses and donkeys in Algeria: Detection of a novel *Cryptosporidium hominis* subtype family (Ik) in a horse. *Veterinary Parasitology*, 208
137. **Landsberg, J.H., Paperna, I.** 1986. Ultrastructural study of the coccidian *Cryptosporidium* sp. from stomachs of juvenile cichlid fish. *Diseases of Aquatic Organisms* 2, 13-20
138. **Le Blancq, S.M., Khrantsov, N.V., Zamani, F., Upton, S.J., Wu, T.W.,** 1997. Ribosomal RNA gene organization in *Cryptosporidium parvum*. *Molecular and biochemical parasitology* 90, 463-478
139. **Leconte, M.,** 2013. Le point sur la cryptosporidiose des Ruminants et les risques zoonotiques. Thèse Médecine Vétérinaire, Alfort.
140. **Leitch, G.J., He, Q.** 2012. Cryptosporidiosis-an overview. *Journal of biomedical research*, 25, 1–16
141. **Levine, N.D.** 1980. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *Journal of Parasitology*, 66, 830-834
142. **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*. *The Journal of eukaryotic microbiology* 47, 91-5

143. **Liu, J., Enomoto, S., Lancto, C.A., Abrahamsen, M.S., Rutherford, M.S.** 2008. Inhibition of Apoptosis in *Cryptosporidium parvum* Infected Intestinal Epithelial Cells is Dependent on Survivin. *Infect Immun. Infection and immunity* 76(8):3784-92
144. **Liu, L., Johnson, H. L., Cousens, S., Perin, J., Scott, S., Lawn, J. E., Rudan, I., Campbell, H., Cibulskis, R., Li, M., Mathers, C. and Black, R. E.** 2012. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet* 379, 2151–2161
145. **Lucio-Forster, A., Griffiths, J.K., Cama, V.A., Xiao, L., Bowman, D.D.** 2010. Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. *Trends of Parasitology* 26,174-9
146. **Macarisin, D., Bauchan, G., Fayer, R.** 2010. Spinacia oleracea L. leaf stomata harboring *Cryptosporidium parvum* oocysts: a potential threat to food safety. *Applied and environmental microbiology* 76, 555-9
147. **Mac-Kenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B., Jeffrey P.D.** 1994. A Massive Outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* Infection Transmitted through the Public Water Supply. *New England Journal of Medicine* 331, 161–167
148. **Mallon, M., MacLeod, A., Wastling, J., Smith, H., Reilly, B., Tait, A.** 2003a. Population structures and the role of genetic exchange in the zoonotic pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Journal of molecular evolution* 56, 407-417
149. **Mallon, M.E., MacLeod, A., Wastling, J.M., Smith, H., Tait, A.** 2003b. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium parvum* Type 2: population genetics and substructuring. *Infection, genetics and evolution* 3, 207-218
150. **Manent-Manent, M.** 2014. Moyens de lutte thérapeutique contre la cryptosporidiose: actualités et perspectives. Thèse de doctorat.
151. **McCole, D.F., Eckmann, L., Laurent, F.** 2000. Intestinal epithelial cell apoptosis following *Cryptosporidium parvum* infection. *Infection and immunity, American Society for Microbiology* 68, 1710–1713.
152. **McOliver, C.C., Lemerman, H.B., Silbergeld, E.K., Moore, R.D., Graczyk, T.K.** 2009. Risks of recreational exposure to waterborne pathogens among persons with HIV/AIDS in Baltimore, Maryland. *American journal of public health* 99, 1116–1122.
153. **Medema, G., Teunis, P., Blokker, M., Deere, D., Davison, A., Charles, P., Loret, J.F.,** 2006. WHO Guidelines for Drinking Water: Quality EHC *Cryptosporidium* draft 2, p15.
154. **Melo, P. C., Teodosio, J., Reis, J., Duarte, A., Costa, J. C., Fonseca, I. P.** 2006. *Cryptosporidium* spp. in freshwater bivalves in Portugal.

- The Journal of eukaryotic microbiology 53(Suppl. 1), S28–S29
155. **Mi, R., Wang X., Huang, Y., Zhou, P., Liu, Y., Chen, Y., Chen, J., Zhu, W., Chen, Z.** 2014. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in goats across four provincial level areas in China. PLoS One 9, e111164
 156. **Mi, R., Wang, X., Huang, Y., Mu, G., Zhang, Y., Jia, H., Zhang, X., Yang, H., Wang, X., Han, X., Chen, Z.** 2018. Sheep as a Potential Source of Zoonotic Cryptosporidiosis in China. Applied and environmental microbiology 84, e00868-18
 157. **Mi, R., Wang, X., Huang, Y., Zhou, P., Liu, Y., Chen, Y., Chen, J., Zhu, W., Chen, Z.** 2014. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in goats across four provincial level areas in China. PLoS One 9, e111164
 158. **Mi, R., Wang, X., Li, C., Huang, Y., Zhou, P., Li, Z., Lei, M., Cai, J., Chen, Z.** 2013. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* in yaks in Qinghai Province of China PLoS One 8, e74985
 159. **Modrich, P.** 1987. DNA mismatch correction. Annual Review of Biochemistry 56, 435–466
 160. **Moratal, S., Dea-Ayuela, M.A., Cardells, J., Marco-Hirs, N.M., Puigcercós, S., Lizana, V., López-Ramon, J.** 2020. Potential risk of three zoonotic protozoa (*Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Toxoplasma gondii*) transmission from fish consumption. Foods 9, 1913
 161. **Moratal, S., Dea-Ayuela, M.A., Martí-Marco, A., Puigcercós, S., Marco-Hir., N.M., Doménech, C., Corcuera, E., Cardells, J., Lizana, V., López-Ramon, J.** 2022. Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. in Cultivated and Wild Marine Fishes from Western Mediterranean with the First Detection of Zoonotic *Cryptosporidium ubiquitum*. Animals 12, 1052
 162. **Morgan, J.** 2015. Morphological and Molecular Characterisation of *Cryptosporidium* in Ornamental Fish. Veterinary and Life Sciences, Murdoch University. Honours Thesis. In Print
 163. **Morgan, U.M., Thompson, R.C.** 1999. The importance of genotyping isolates before assigning species. Parasitology today 15, 80-81
 164. **Morine, M., Yang, R., Ng, J., Kueh, S., Lymbery, A.J., Ryan, U.** 2012. Additional novel *Cryptosporidium* genotypes in ornamental fishes. Veterinary parasitology 190, 578–582.
 165. **MPRH.** Ministère de l'agriculture, du développement rural et de la pêche. 2003. Plan national de développement des activités de pêche et d'aquaculture, Plan national de développement de la pêche et de l'aquaculture (2003-2007). Algérie. https://www.fao.org/fishery/count rysector/naso_algeria/fr (consulté le 21/11/2021).
 166. **Murphy, B.G., Bradway, D., Walsh, T., Sanders, G.E., Snekvik K.** 2009. Gastric cryptosporidiosis in fresh water angel fish (*Pterophyllum*

- scalare*). Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 21, 722–727
167. **N**ader, J.L., Mathers, T.C., Ward, B.J., Pachebat, J.A., Swain, M.T., Robinson, G., Chalmers, R.M., Hunter, P.R., van Oosterhout, C., Tyler, K.M. 2019. Evolutionary genomics of anthroponosis in *Cryptosporidium*. Nature microbiology 4, 826–836
168. **N**avin, T.R., Weber, R., Vugia, D.J., Rimland, D., Roberts, J.M., Addiss, D.G., Visvesvara, G.S., Wahlquist, S.P., Hogan, S.E., Gallagher, L.E., Juranek, D.D., Schwartz, D.A., Wilcox, C.M., Stewart, J.M., Thompson, S.E., 3rd, Bryan, R.T. 1999. Declining CD4+ T-lymphocyte counts are associated with increased risk of enteric parasitosis and chronic diarrhea: results of a 3-year longitudinal study. Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology 20, 154-159
169. **N**CBBI, 2008. The NCBI entrez taxonomy homepage: *Cryptosporidium*.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>
170. **N**esterenko, M.V., Woods, K., Upton, S.J. 1999. Receptor/ligand interactions between *Cryptosporidium parvum* and the surface of the host cell. Biochimica et biophysica acta 1454, 165-173
171. **N**oordeen, F., Horadagoda, N.U., Faizal, A.C., Rajapakse, R.P., Razak, M.A., Arulkanthan, A. 2002. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* isolated from asymptomatic adult goats to mice and goat kids. Veterinary parasitology 103, 217-225
172. **O**'Connor, R.M., Wanyiri, J.W., Cevallos, A.M., Priest, J.W., Ward, H.D., 2007. *Cryptosporidium parvum* glycoprotein gp40 localizes to the sporozoite surface by association with gp15. Molecular and biochemical parasitology 156, 80-83
173. **O**'donoghue, P.J. 1995. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in Man and Animals. International Journal of Parasitology 25, 139-195
174. **O**khuyesen, P.C., Chappell, C.L. 2002. *Cryptosporidium* virulence determinants--are we there yet? International Journal of parasitology 32, 517-525
175. **O**khuyesen, P.C., Chappell, C.L., Sterling, C.R., Jakubowski, W., DuPont, H.L., 1998. Susceptibility and serologic response of healthy adults to reinfection with *Cryptosporidium parvum*. Infection and immunity 66, 441-443
176. **O**rtega-Mora, L.M., Wright, S.E. 1994. Age-related resistance in ovine cryptosporidiosis: patterns of infection and humoral immune response. Infection and Immunity 62, 5003-5009
177. **O**uakli, N., Belkhiri, A., de Lucio, A., Köster, P.C., Djoudi, M., Dadda, A. Khelef, D., Kaidi, R., Carmena, D. 2018. *Cryptosporidium*-associated diarrhoea in neonatal calves in Algeria. Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports 12, 78–84

178. **Ouchene N., Benakhla, A., khelifi, A., Righi, S., Paraud, C., Chartier, CH.** 2012. Prevalence of *Cryptosporidium* sp in dairy calves in north-eastern Algeria. *Revue de Médecine Vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse*, 163, 163-166
179. **Ouchene N., Ouchene-khelifi, A., Khelifi, M., Zeroual F., Benakhla, A., Adjou, K.** 2014. Study of *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Eimeria* spp. infections in dairy cattle in Algeria. *Journal of parasitology and vector biology* 6, 61-65
180. **Ouchene N., Ouchene-khelifi, A., Khelifi, M., Zeroual F., Bitam I., Benakhla, A., Kaidi, R., Median, A.** 2016. Prevalence and Molecular Characterization of *Cryptosporidium* in Dairy Cattle from Farms in Algeria. *KafKas Universitesi veteriner faKUltesi Dergisi* 22, 703-707
181. **Painter, J.E., Hlvasa. M.C., Collier, S.A., Xiao, L., Yoder, J.S.** 2015. Cryptosporidiosis Surveillance – United States, 2011-2012. *Surveillance Summaries* 64, 1-14
182. **Palenzuela, O., Alvarez-Pellitero, P., Sitja-Bobadilla, A.** 2010. Molecular characterisation of *Cryptosporidium molnari* reveals a distinct piscine clade. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 7646-7649
183. **Pancieri, R.J., Thomassen, R.W., Garner, F.M.** 1971. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Parasitol.* 8, 479–484.
184. **Paoletti, A.** 2002. Données récentes sur la transmission des cryptosporidioses animales à l'Homme. Thèse Médecine Vétérinaire, Toulouse.
185. **Paparini, A., Yang, R., Chen, L., Tong, K., Gibson-Kueh, S., Lymbery, A., Ryan, U.** 2017. *Cryptosporidium* in fish: Alternative sequencing approaches and analyses at multiple loci to resolve mixed infections. *Parasitology* 144, 1811–1820
186. **Paperna, I., Vilenkin, M.** 1996. Cryptosporidiosis in the gourami *Trichogaster leeri*: description of a new species and a proposal for a new genus, *Piscicryptosporidium*, for species infecting fish. *Diseases of Aquatic Organisms* 27, 95–101
187. **Paraud, C., Chartier, C.** 2012. Cryptosporidiosis in small ruminants. *Small ruminant research* 103, 93-97
188. **Park, J.W., Crowley, D. E.** 2010. Nested PCR bias: a case study of *Pseudomonas* spp. in soil microcosms. *Journal of Environmental Monitoring* 12, 985–988
189. **Pepin, K. M., Lass, S., Pulliam, J. R. C., Read, A. F. Lloyd-Smith, J. O.** 2010. Identifying genetic markers of adaptation for surveillance of viral host jumps. *Nature Reviews Microbiology* 8, 802
190. **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, 227-31
191. **Pohlenz, J., Bemrick, W.J., Moon, H.W., Cheville, N.F.**, 1978. Bovine cryptosporidiosis: a transmission and scanning electron microscopic study of some stages in the life cycle and of the host-parasite relationship. *Veterinary pathology* 15, 417-427
192. **Prediger, J., Ježková, J., Holubová, N., Sak, B., Konečný, R., Rost, M., McEvoy, J., Rajský, D., Kváč, M.** 2021. *Cryptosporidium sciurinum* n. sp. (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) in Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*). *Microorganisms* 9:2050
193. **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
194. **Quílez, J., Torres, E., Chalmers, R.M., Hadfield, S.J., Del Cacho, E., Sánchez-Acedo, C.** 2008. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in lambs and goat kids in Spain. *Applied and environmental microbiology* 74, 6026-31
195. **Rahmouni I., Essid R., Aoun, K., Bouratbine, A.** 2014. Glycoprotein 60 diversity in *Cryptosporidium parvum* causing human and cattle cryptosporidiosis in the rural region of Northern Tunisia. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 90, 346-50
196. **Ramirez N.E., Ward L.A., Sreevatsan S.** 2004. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and infection* 6, 773–785
197. **Rasková, V., Kvetonová, D., Sak, B., McEvoy, J., Edwinson, A., Stenger, B., Kvác, M.** 2013. Human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* isolates presumably transmitted from wild mice. *Journal of clinical microbiology* 51, 360-2
198. **Reboredo-Fernández, A., Prado-Merini, O., García-Bernadal, T., Gómez-Couso, H., Ares-Mazás, E.** 2014. Benthic macroinvertebrate communities as aquatic bioindicators of contamination by *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Parasitology Research* 113, 1625–1628
199. **Riggs, M.W., Stone, A.L., Yount, P.A., Langer, R.C., Arrowood, M.J., Bentley, D.L.** 1997. Protective monoclonal antibody defines a circumsporozoite-like glycoprotein exoantigen of *Cryptosporidium parvum* sporozoites and merozoites. *Journal of Immunology* 158, 1787-1795
200. **Riggs, M.W., McNeil, M.R., Perryman, L.E., Stone, A.L., Scherman, M.S., O'Connor, R.M.**, 1999. *Cryptosporidium parvum* sporozoite pellicle antigen recognized by a neutralizing monoclonal antibody is a beta-mannosylated glycolipid. *Infection and immunity* 67, 1317-1322

201. **Rieux, A., Chartier, C., Pors I., Paraud, C.** 2013c, Dynamics of excretion and molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates in pre-weaned French beef calves. *Veterinary Parasitology* 195, 169-72
202. **Roberts, J.D., Silbergeld, E.K., Graczyk, T.** 2007. A probabilistic risk assessment of *Cryptosporidium* exposure among Baltimore urban anglers. *Journal of toxicology and environmental health. Part A.* 70, 1568–1576
203. **Robertson, L.J., Chalmers, R.** 2013. Foodborne cryptosporidiosis: is there really more in Nordic countries. *Trends in parasitology* 29, 3-9
204. **Robertson, L.J., Sprong, H., Ortega, Y.R., van der Giessen, J.W.B., Fayer, R.** 2014. Impacts of globalisation on foodborne parasites. *Trends in Parasitology* 30, 37–52
205. **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. *International journal for parasitology* 40, 1539–48
206. **Rosales, M.J., Cifuentes, J., Mascaro, C.** 1993. *Cryptosporidium parvum*: culture in MDCK cells. *Experimental parasitology* 76, 209-212
207. **Ruecker, NJ., Hoffman, RM., Chalmers, RM., Neumann, NF.** 2011. Detection and resolution of *Cryptosporidium* species and species mixtures by genus-specific nested PCR-restriction fragment length polymorphism analysis, direct sequencing, and cloning. *Applied and environmental microbiology* 77, 3998-4007
208. **Ryan, U.,** 2010. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. *Experimental Parasitology* 124, 113–120.
209. **Ryan, U., 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. *The Journal of eukaryotic microbiology* 49, 433- 440
210. **Ryan, U., Fayer, R., Xiao, L.** 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology* 141, 1667–1685
211. **Ryan, U.M., Feng, Y., Fayer, R., Xiao, L.** 2021. Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* – a 50 year perspective (1971–2021). *International journal for parasitology* 51, 13-14
212. **Ryan, U., Hijjawi, N.** 2015. New developments in *Cryptosporidium*: *International Journal of Parasitology* 45, 367-73
213. **Ryan U., Hijjawi, N., Xiao, L.** 2018. Foodborne Cryptosporidiosis:

- International Journal of Parasitology; 48, 1-12
214. **Ryan, U., Monis, P., Enemark, H.L., Sulaiman, I., Samarasinghe, B., Read, C., Buddle, R., Roberstson, I., Zhou, L., Thompson, R.C.A., Xiao, L.** 2004a. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) in pigs (*Sus scrofa*). The Journal of Parasitology 90, 769–773
215. **Ryan, U., O’Hara, A., Xiao, L.** 2004b. Molecular and biological characterization of a *Cryptosporidium molnari-like* isolate from a guppy (*Poecilia reticulata*). Applied and Environmental Microbiology 70, 3761–3765
216. **Ryan, U., Papparini, A., Tong, K., Yang, R., Gibson-Keuh, S., O’Hara, A., Lymbery, A., Xiao, L.** 2015. *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: *Eimeriidae*) from the guppy (*Poecilia reticulata*). Experimental Parasitology 150, 31-5
217. **Ryan, U.M., Xiao, L.** 2014. Taxonomy and molecular taxonomy. In: Cacciò SM, Widmer G (eds) *Cryptosporidium*. Parasite and disease, 1st edn. Springer-Verlag, Vienna, pp 1–22.
218. **Ryan, U., Zahedi, A., Papparini, A.** 2016. *Cryptosporidium* in humans and animals—a one health approach to prophylaxis. Parasite immunology 38, 535–547
219. **Sahraoui, L., Thomas, M., Chevillot, A., Mammeri, M., Polack, B., Vallée, I., Follet, J., Ain-Baaziz, H., Adjou, K.T.** 2019. Molecular characterization of zoonotic *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* pathogens in Algerian sheep. Veterinary Parasitology: Regional Study Reports 16, 100280
220. **Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V. and Hoekstra, R. M.** 2011. Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. Emerging Infectious Diseases 17, 7–15
221. **Shaapan, R.M., Abdel-Ghaffar, F.A., Varjabedian, K.G. and Saad-Alla, G.I.** 2021. Prevalence and Molecular Epidemiology of *Cryptosporidium* Infection in *Clarias gariepinus* Fish in Egypt. Acta Parasitologica.
222. **Shimelis, T., Tadesse, E.** 2014. Performance evaluation of point-of-care test for detection of *Cryptosporidium* stool antigen in children and HIV infected adults. Parasit and Vectors 16,7:227
223. **Shrivastava, A. K., Kumar, S., Smith, W. A., Soumyaranjan, P. S.** 2017. Revisiting the global problem of cryptosporidiosis and recommendations. Tropical parasitology 7, 8-17
224. **Shuldiner, A. R., Nirula, A., Roth, J.** 1989. Hybrid DNA artifact from PCR of closely related target sequences. Nucleic Acids Research 17, 4409
225. **Slavin, D.** 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). Journal of Comparative Pathology 65, 262–266

226. **Squire, S.A., Ryan, U.** 2017. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and future challenges. *Parasites & Vectors* 10, 1-195
227. **Sitjà-Bobadilla, A., Padrós, F., Aguilera, C., Álvarez-Pellitero, P.** 2005. Epidemiology of *Cryptosporidium molnari* in Spanish gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) cultures: from hatchery to market size. *Applied and environmental microbiology* 71, 131–139
228. **Šlapeta, J.**, 2013. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty-colour rainbow? *International Journal of Parasitology* 43: 957-970
229. **Smith, B.P.** 2008. Large Animals Internal Medicine. 4 th edition. Saint-Louis: Mosby Elsevier, MO, 340-357
230. **Smith, R.P., Chalmers, R.M., Mueller-Doblies, D., Clifton-Hadley, F.A., Elwin, K., Watkins, J., Paiba, G.A., Hadfield, S.J., Giles, M.** 2010. Investigation of farms linked to human patients with cryptosporidiosis in England and Wales. *Preventive veterinary medicine* 94, 9–17
231. **Spano, F., Putignani, L., Guida, S., Crisanti, A.** 1998. *Cryptosporidium parvum*: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C1 (thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium-1*) gene discriminates between two alleles differentially associated with parasite isolates of animal and human origin. *Experimental Parasitology* 90, 195-198
232. **Spano, F., Putignani, L., McLauchlin, J., Casemore, D.P., Crisanti, A.**, 1997. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS microbiology letters*. 150, 209-217
233. **Sponseller, J.K., Griffiths, J.K., Tzipor, S.** 2014. The Evolution of Respiratory Cryptosporidiosis: Evidence for Transmission by Inhalation. *Clinical microbiology reviews* 27, 575–586.
234. **Stehr-Green, J.K., McCaig, L., Remsen, H.M., Rains, C.S., Fox, M., Juraneck, D.D.** 1987. Shedding of Oocysts in immunocompetent individuals infected with *Cryptosporidium*. *American Journal of Tropical Hygiene*. 36, 338-342
235. **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. *Journal of clinical microbiology*. 43, 2805-2809
236. **Sulaiman, I.M., Xiao, L., Lal, A.A.** 1999. Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. *Applied and environmental microbiology* 65, 4431-4435.
237. **Sulaiman, I.M., Morgan, U.M., Thompson, R.C., Lal, A.A., Xiao, L.**, 2000. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium*

- parasites based on the 70- kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Appl. Environ. Microbiol* 66, 2385-2391.
238. **Steele, M.I., Kuhls, T.L., Nida, K., Meka, C.S., Halabi, I.M., Mosier, D.A., Elliott, W., Crawford, D.L., Greenfield, R.A.** 1995. A *Cryptosporidium parvum* genomic region encoding hemolytic activity. *Infection and immunity* 63, 3840-3845.
239. **Striepen, B.** 2013. Time to tackle cryptosporidiosis. *Nature* 503, 189–191
240. **Strong, W.B., Gut, J., Nelson, R.G.** 2000. Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. *Infection and immunity* 68, 4117-4134
241. **Strong, W.B., Nelson, R.G.** 2000. Preliminary profile of the *Cryptosporidium parvum* genome: an expressed sequence tag and genome survey sequence analysis. *Molecular & biochemical parasitology* 107, 1-32
242. **T**axonomicon, 2008. www.taxonomy.nl/taxonomicon
243. **Taylan-Ozkan, A., Yasa-Duru, S., Usluca, S., Lysen, C., Ye, J., Roellig, D.M., Feng, Y., Xiao, L.** *Cryptosporidium* species and *Cryptosporidium parvum* subtypes in dairy calves and goat kids reared under traditional farming systems in Turkey. *Experimental Parasitology* 170, 16-20
244. **Templeton, T.J., Iyer, L.M., Anantharaman, V., Enomoto, S., Abrahante, J.E., Subramanian, G.M., Hoffman, S.L., Abrahamsen, M.S., Aravind, L.** 2004. Comparative analysis of apicomplexa and genomic diversity in eukaryotes. *Genome research* 14, 1686-1695
245. **Thompson, R.C., Armson, A., Ryan, U.** 2003. *Cryptosporidium*: From Molecules to Disease. *Trends in parasitology* 18, 98-100
246. **Thompson, R.C., Palmer, C.S., O'handley, R.** 2008. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Veterinary journal* 177, 18-25
247. **Thomson, S.** 2016. Cryptosporidiosis in farm livestock. PhD thesis. Institute of Biodiversity Animal Health and Comparative Medicine University of Glasgow UK
248. **Trotz-Williams, L.A., Martin, S.W., Leslie, K.E., Duffield, T., Nydam, D.V., Peregrine, A.S.** 2007. Calf-level risk factors for neonatal diarrhea and shedding of *Cryptosporidium parvum* in Ontario dairy calves *Preventive veterinary medicine* 82, 12-28
249. **Tibayrenc, M.** 1995. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Advanced Parasitology* 36, 47-115
250. **Tibayrenc, M.** 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *International Journal of Parasitology* 28, 85-104

251. **Tyzzler, E.E.** 1907. A sporozoa found in the peptic glands of the common mouse. *Proceeding of the Society of Experimental Biology and Medicine* 5, 12–13
252. **Tyzzler, E.E.** 1910. An extracellular *coccidium*, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. *The Journal of medical research* 23, 487–509
253. **Tyzzler, E.E.** 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov) a *coccidium* found in the small intestine of the common mouse. *Archiv für Protistenkunde* 26, 394–412
254. **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
255. **Tzipori, S., Smith, M., Halpin, C., Angus, K.W., Sherwood, D., Campbell, I.** 1983. Experimental cryptosporidiosis in calves: clinical manifestations and pathological findings. *The Veterinary record* 112, 116–120
256. **Tzipori, S., Ward, H.** 2002. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection* 4, 1047–1058
257. **Valéria Inácio, SV., Widmer, G., de Brito, RL., Zucatto, AS., de Aquino, MC., Oliveira, BC., Nakamura, AA., Neto, LD., Carvalho, JG., Gomes, JF., Meireles, MV., Bresciani, KD.** 2107. First description of *Cryptosporidium hominis* GP60 genotype IkaA20G1 and *Cryptosporidium parvum* GP60 genotypes IlaA18G3R1 and IlaA15G2R1 in foals in Brazil. *Veterinary Parasitology* 233, 48–51
258. **Valigurova, A., Jirků, M., Koudela, B.**, 2008. Cryptosporidia: epicellular parasites embraced by the host cell membrane. *International journal for parasitology* 38, 913–22
259. **Wagnerová, P., Sak, B., McEvoy, J., Rost, M., Sherwood D., Holcomb, K., Kváč, M.** 2016. *Cryptosporidium parvum* and *Enterocytozoon bienersi* in American Mustangs and Chincoteague ponies. *Experimental parasitology* 162, 24–7
260. **Waldron, L.S., Power, M.L.** 2011. Fluorescence analysis detects gp60 subtype diversity in *Cryptosporidium* infections. *Infection, genetics and evolution* 11, 1388–95
261. **Wang, G. C., Wang, Y.** 1996. The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. *Microbiology* 142, 1107–1114
262. **Widmer, G., Sullivan, S.** 2012. Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. *Parasite immunology* 34, 61–71
263. **Wielinga, PR., de Vries, A., van der Goot, TH., Mank, T., Mars, MH., Kortbeek, LM., van der Giessen, JW.** 2008. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands.

- International Journal of Parasitology
38, 809-17
264. **Winter, G., Gooley, A.A., Williams, K.L., Slade, M.B.** 2000. Characterization of a major sporozoite surface glycoprotein of *Cryptosporidium parvum*. Functional and integrative genomics 1, 207-217
265. **Wyatt, C.R, Riggs, M.W, Fayer, R.** 2010. Cryptosporidiosis in neonatal calves. Veterinary Clinics: Food Animal Practice 26, 89-103
266. **Xiao, L.** 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. Experimental Parasitology 124, 80-89
267. **Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A.A., Montali, R.J., Fayer, R., Lal, A.A.** 1999. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. Applied and environmental microbiology 65, 1578-1583
268. **Xiao, L., Fayer, R., Ryan, Upton S.J.** 2004. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. Clinical Microbiology Reviews 17, 72-97
269. **Xiao, L., Feng, Y.** 2008. Zoonotic cryptosporidiosis. FEMS Medical Microbiology and Immunology 52, 309-323
270. **Xiao, L., Limor, J., Morgan, U.M., Sulaiman, I.M., Thompson, R.C., Lal, A.A.** 2000. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. Applied and environmental microbiology 66, 5499-5502
271. **Xiao, L., Zhou, L., Santin, M., Yang, W., Fayer, R.** 2007. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States. Parasitology Research 100, 701-6
272. **Yildirim, A., Adanir, R., Inci, A., Yukari, B.A., Duzlu, O., Onder, Z., Ciloglu, A., Simsek, E.** 2020. Prevalence and genotyping of bovine *Cryptosporidium* species in the Mediterranean and Central Anatolia Region of Turkey. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases 69-101425
273. **Yang, R., Dorrestein, G.M., Ryan, U.** 2016. Molecular characterisation of adisseminated *Cryptosporidium* infection in a koicarp (*Cyprinus carpio*). Veterinary Parasitology 226, 53-56
274. **Yang, R., Elankumaran, Y., Hijjawi, N., Ryan, U.** 2015. Validation of cell-free culture using scanning electron microscopy (SEM) and gene expression studies. Experimental parasitology 55-62
275. **Zahedi, A., Bolland, S.J., Oskam, C.L. and Ryan, U.** 2021. *Cryptosporidium abrahamseni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae) from red-eye tetra (*Moenkhausia sanctaefilomenae*). Experimental Parasitology 223, 108089

276. **Zahedi, A., Gofton, AW., Greay, T., Monis, P., Oskam, C., Ball, A., Bath, A., Watkinson, A., Robertson, I., Ryan, U.** 2018. Profiling the diversity of *Cryptosporidium* species and genotypes in wastewater treatment plants in Australia using next generation sequencing. *The Science of the total environment* 644, 635-648
277. **Zahedi, A., Ryan, U.** 2020. *Cryptosporidium* – An update with an emphasis on foodborne and waterborne transmission. *Research in Veterinary Science* 132, 500–512
278. **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
279. **Zhou, L., Kassa, H., Tischler, M.L., Xiao, L.** 2004. Host-adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada geese (*Branta canadensis*). *Applied and environmental microbiology* 70, 4211-5
280. **Zintl, A., Neville D., Maguire, D., Fanning, S., Mulcahy, G., Smith, H.V., De Waal, T.** 2007. Prevalence of *Cryptosporidium* species in intensively farmed pigs in Ireland. *Parasitology* 134, 1575-82

Annexes

Annexe 01 : cages flottantes en Algérie (quelle région), au niveau la mer mediterrannée.



Annexe 02

1. Programme du transfert des poissons établi par la DPRH Guelma entre l'année 2001-2014.

Barrage	Date d'ensemencement	Quantité	Especes ensemencées
Bouhamdan (Guelma)	(2001)	750.000	Carpe (argentée, royal, à grande bouche, herbivore)
		450.000	
	(2004)	500.000	
	(2006)	300.000	
	(2011)	200.000	
	(2013)	300.000	
	(2015)	150.000	
Medjez lebgar (Guelma)	(2001)	1.000	Carpe royal
	(2014)	150.000	
Ain Delia (Souk Ahras)	(2001)	1050.000	Carpe (argentée, royal, à grande bouche, herbivore)
	(2001)	450.000	
	(2005)	200.000	
	(2006)	200.000	
	(2012)	400.000	
	(2014)	250.000	
Oued cherf (Souk Ahras)	(2012)	300.000	Sendre (Ouefs fécondés)
	(2015)	150.000	
Babar (Khenechla)	(2001)	50.000	Carpe royal
	(2006)	150.000	
	(2014)	250.000	

2. Programme de transfert des poissons ensemencés établi par la DPRH Guelma entre l'année 2001-2014.

Type d'ensemencement	Espèce	Quantité	Date	lieu origine	Lieu d'ensemencement
Geniteurs	Sandre	20	Juin 2019	Oued cherf	Bouhamdane
	Gardon et Ablette	300			
	Black-bass	8	Ocobre 2020	EL-Mouane	Bouhamdane
	Gardon et Ablette	30	Mai 2019	Bouhamdane	Ain dalia
	Carpe royale	30	Avril, 2019	Chefia	Bouhamdane
	Carpe royal	10	Mai, 2018	Bababr (closerie)	Bouhamdane
	Sndre	16	Mai, 2016	Closerie d'orssia (setif)	Ain delia
Juvéniles	Carpe royal	20000	Mai, 2016	Closerie Babar	Bouhamdane
		20000	Mai, 2018		
	Carpe argentée	300.000	Oaout, 2016	Closerie d'orissia	Oued cherf
		200.000			Sefsaf
œufs	Sandre	3 nids	Mars, 2020		Bouhamdane

Annexe 03 : différents caractères des poissons prélevés dans la présente étude

Fish ID	Species	Habitat	Breeding system	Region	District	Gender	Weight (g)	Length (cm)	Size class	Season	PCR results	Isolate (<i>C.parvum</i>)
1.1	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	170	17	Small	Summer	N	
1.2	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	250	20	large	Summer	N	
1.3	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	250	20	large	Summer	N	
1.4	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	250	21	large	Summer	N	
1.5	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	150	17	Small	Summer	N	
1.6	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	150	17	Small	Summer	N	
1.7	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	250	20	large	Summer	N	
1.8	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	200	18	large	Summer	N	
1.9	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	200	18	large	Summer	N	
1.10	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	100	16	Small	Summer	N	
2.1	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	270	20	large	full	N	
2.2	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	277	20	large	full	N	
2.3	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	445	24	Medium	full	N	
2.4	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	365	22	large	full	N	
2.5	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	350	22	large	full	N	
2.6	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	250	19	large	full	N	
2.7	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	460	23,5	Medium	full	N	
2.8	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	450	23,5	Medium	full	N	
2.9	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	349	22	large	full	N	
2.10	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	345	22	large	full	N	
2.11	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	500	25	Medium	full	N	
2.12	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	700	30	Medium	full	N	
3.1	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	129	18	Small	full	P	
3.2	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	120	18	Small	full	N	
3.3	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	445	24	Medium	full	N	
3.4	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	350	22	large	full	N	
3.5	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	271	20	large	full	N	
3.6	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	250	19	large	full	P	
3.7	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	125	18	Small	full	P	
3.8	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	350	22	large	full	N	
3.9	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	300	21	large	full	N	
3.10	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	129	18	Small	full	N	
3.11	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	119	17,5	Small	full	N	
3.12	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	220	19	large	full	N	
3.13	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	300	21	large	full	N	
3.14	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	310	19	large	full	N	
3.15	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	269	20	large	full	N	
3.16	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	300	21	large	full	N	
3.17	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	498	25	Medium	full	N	
3.18	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	500	25	Medium	full	N	

3.19	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	450	24	Medium	full	N	
3.20	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	450	24	Medium	full	N	
3.21	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	500	25	Medium	full	N	
3.22	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	395	23	large	full	N	
4.1	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	950	36	Medium	full	N	
4.2	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	270	20	large	full	N	
4.3	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	650	28	Medium	full	N	
4.4	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	274	20	large	full	N	
4.5	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	250	21	large	full	N	
4.6	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	267	20	large	full	N	
4.7	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	530	25	Medium	full	N	
4.8	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	520	25	Medium	full	N	
4.9	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	270	20	large	full	N	
4.10	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	600	27	Medium	full	N	
4.11	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	465	24	Medium	full	N	
4.12	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	540	25,5	Medium	full	N	
4.13	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	400	23	large	full	N	
4.14	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	265	20	large	full	N	
4.15	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	400	23	large	full	N	
4.16	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	495	25	Medium	full	N	
4.17	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	200	19	large	full	N	
4.18	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	80	15	Small	full	N	
4.19	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	145	18,5	Small	full	N	
4.20	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	120	17,5	Small	full	N	
4.21	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	275	20	large	full	N	
4.22	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	124	18	Small	full	N	
4.23	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	320	21	large	full	N	
4.24	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	275	20,5	large	full	N	
4.25	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	122	18	Small	full	N	
4.26	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	270	20	large	full	N	
4.27	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	277	20,5	large	full	N	
4.28	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	271	20	large	full	N	
4.29	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	110	17	Small	full	N	
4.30	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	272	20	large	full	N	
4.39	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	122	17,5	Small	full	N	
4.32	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	123	18	Small	full	N	
4.33	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	369	22	large	full	N	
4.34	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	100	16	Small	full	N	
4.35	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	95	15	Small	full	N	
4.36	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	100	16	Small	full	N	
4.37	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	200	19	large	full	N	
4.38	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	201	19	large	full	N	
4.39	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	205	19	large	full	N	

5.1	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	135	18	Small	full	N	
5.d	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	270	20	large	full	N	
5.3	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	410	23	large	full	P	
5.4	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	550	26	Medium	full	N	
5.5	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	415	23	large	full	N	
5.6	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	545	26	Medium	full	N	
5.7	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	550	26	Medium	full	N	
5.8	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	325	21	large	full	N	
5.9	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	500	25	Medium	full	N	
5.10	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	500	25	Medium	full	N	
5.11	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	600	27	Medium	full	N	
5.12	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	510	25	Medium	full	N	
5.13	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	455	24	Medium	full	N	
5.14	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	259	20	large	full	N	
5.15	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	515	25	Medium	full	N	
5.16	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	355	22	large	full	N	
5.17	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	500	25	Medium	full	N	
5.18	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	133	18	Small	full	N	
5.19	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	510	25	Medium	full	N	
5.20	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	265	20	large	full	N	
5.21	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	266	20	large	full	N	
5.22	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	420	23	large	full	N	
5.23	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	500	25	Medium	full	N	
5.24	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	345	22	large	full	N	
5.25	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	450	24	Medium	full	N	
5.26	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	270	20	large	full	N	
5.27	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	520	25	Medium	full	P	
5.28	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	500	25	Medium	full	N	
5.29	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	271	20	large	full	N	
5.30	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	199	19	large	full	N	
5.31	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	320	21	large	full	N	
5.32	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	131	18	Small	full	N	
5.33	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	445	24	Medium	full	N	
5.34	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	420	23	large	full	N	
5.35	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	420	23	large	full	N	
5.36	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	450	24	Medium	full	N	
6.1	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	220	19	large	Winter	N	
6.2	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	271	20	large	Winter	N	
6.3	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	425	23	large	Winter	P	
6.4	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	430	23,5	large	Winter	N	
6.5	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	240	19,5	large	Winter	N	
6.6	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	235	19,5	large	Winter	N	
6.7	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	280	20,5	large	Winter	N	

6.8	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	350	21	large	Winter	N	
6.9	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	365	22	large	Winter	N	
6.10	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	450	24	Medium	Winter	N	
6.11	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	480	24,7	Medium	Winter	P	
6.12	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	500	25	Medium	Winter	N	
6.13	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	555	26	Medium	Winter	N	
6.14	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	400	23	large	Winter	N	
6.15	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	350	22	large	Winter	N	
6.16	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	429	23	large	Winter	N	
6.17	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	470	24	Medium	Winter	N	
6.18	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	300	21	large	Winter	N	
6.19	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	450	23	Medium	Winter	N	
6.20	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	265	20	large	Winter	N	
6.21	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	375	21,8	large	Winter	N	
6.22	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	400	23	large	Winter	N	
7.1	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	450	23	Medium	full	N	
7.2	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	489	25	Medium	full	N	
7.3	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	355	22	large	full	N	
7.4	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	490	25	Medium	full	N	
7.5	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	555	26	Medium	full	N	
7.6	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	560	26	Medium	full	N	
7.7	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	495	25	Medium	full	N	
7.8	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	510	25	Medium	full	N	
7.9	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	450	23	Medium	full	N	
7.10	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	273	20	large	full	N	
7.11	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	500	25,5	Medium	full	N	
7.12	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	500	25	Medium	full	N	
7.13	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	450	23	Medium	full	N	
7.14	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	400	23	large	full	N	
13.20	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	349	22	large	full	N	
13.21	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	300	21	large	full	N	
17.11	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	276	20	large	full	N	
17.12	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	345	22	large	full	N	
9.10	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	366	22	large	full	N	
8.1	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	320	21	large	Winter	N	
8.2	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	360	21,9	large	Winter	N	
8.3	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	200	19	large	Winter	N	
8.4	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	930	35	Medium	Winter	N	
8.5	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	359	22	large	Winter	N	
8.6	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	275	20	large	Winter	N	
8.7	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	420	23	large	Winter	N	
8.8	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	398	23	large	Winter	N	
8.9	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	400	23	large	Winter	N	

8.10	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	265	20	large	Winter	N	
8.11	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	400	23	large	Winter	N	
8.12	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	320	21	large	Winter	N	
8.13	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	275	20	large	Winter	N	
8.14	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	355	22	large	Winter	N	
8.15	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	83	15	Small	Winter	N	
8.16	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	350	21	large	Winter	N	
8.17	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	450	24	Medium	Winter	N	
8.18	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	415	23	large	Winter	N	
8.19	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	275	20	large	Winter	N	
8.20	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	460	24	Medium	Winter	N	
8.21	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	400	23	large	Winter	N	
8.22	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	400	23	large	Winter	N	
8.23	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	497	25	Medium	Winter	N	
8.24	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	655	28	Medium	Winter	N	
8.25	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	398	23	large	Winter	N	
8.26	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	350	22	large	Winter	N	
8.27	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	350	22	large	Winter	N	
8.28	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	500	25	Medium	Winter	N	
13.19	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	500	25	Medium	Winter	N	
8.30	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	950	35	Medium	Winter	N	
8.31	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	350	22	large	Winter	N	
8.32	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	375	22	large	Winter	N	
8.33	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	271	20	large	Winter	N	
8.34	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	360	22	large	Winter	N	
8.35	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	450	24	Medium	Winter	N	
8.36	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	400	23	large	Winter	N	
9.1	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	200	19	large	full	N	
9.2	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	129	18	Small	full	N	
9.3	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	270	20	large	full	N	
9.4	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	130	18	Small	full	N	
9.5	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	320	21	large	full	N	
9.6	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	270	20	large	full	N	
9.7	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	276	20	large	full	N	
9.8	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	510	25	Medium	full	N	
9.9	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	268	20	large	full	N	
9.10	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	650	28	Medium	full	N	
9.11	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	620	27	Medium	full	N	
9.12	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	610	27	Medium	full	N	
9.13	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	350	22	large	Winter	N	
9.14	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	410	23	large	Winter	N	
9.15	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	415	23	large	Winter	P	
10.1	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	330	21	large	Winter	N	

10.2	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	200	19	large	Winter	N	
10.3	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	260	20	large	Winter	N	
10.4	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	266	20	large	Winter	N	
10.5	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	240	19,2	large	Winter	P	
10.6	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	460	24	Medium	Winter	N	
10.7	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	335	21	large	Winter	N	
10.8	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	120	17,5	Small	Winter	N	
10.9	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	114	17	Small	Winter	N	
10.10	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	95	16	Small	Winter	N	
10.11	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	400	23,5	large	Winter	N	
10.12	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	345	21,5	large	Winter	N	
10.13	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	285	20,8	large	Winter	N	
10.14	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	130	18	Small	Winter	N	
10.15	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	110	16,5	Small	Winter	N	
10.16	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	95	16	Small	Winter	N	
10.17	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	90	16,3	Small	Winter	N	
10.27	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	400	23,5	large	Winter	N	
10.19	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	320	17	large	Winter	N	
10.20	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	400	23	large	Winter	N	
10.21	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	410	23	large	Winter	N	
10.22	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	348	22	large	Winter	N	
10.28	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	356	22	large	Winter	N	
10.24	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	395	22,9	large	Winter	N	
10.29	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	450	23,5	Medium	Winter	N	
10.30	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	335	21	large	Winter	N	
11.1	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	425	23	large	Winter	N	
11.2	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	440	24	Medium	Winter	N	
11.3	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	320	22	large	Winter	N	
11.4	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	340	22	large	Winter	N	
11.5	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	267	20	large	Winter	N	
11.6	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	400	23	large	Winter	N	
11.7	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	310	21	large	Winter	N	
11.8	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	520	25	Medium	Winter	N	
11.9	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	500	25	Medium	Winter	N	
11.10	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	131	18	Small	Winter	N	
11.11	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	410	23	large	Winter	N	
11.12	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	270	20	large	Winter	N	
11.13	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	275	20	large	Winter	N	
11.14	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	315	21	large	Winter	N	
11.15	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	300	21	large	Winter	N	
11.16	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	325	21,5	large	Winter	N	
11.17	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	329	22	large	Winter	N	
11.18	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	400	23	large	Winter	P	

11.19	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	271	20	large	Winter	N	
11.20	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	350	22	large	Winter	N	
12.1	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	82	15	Small	Winter	N	
12.2	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	100	16	Small	Winter	N	
12.3	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	110	16,5	Small	Winter	N	
12.4	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	100	16	Small	Winter	N	
12.5	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	96	16	Small	Winter	N	
12.6	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	90	16	Small	Winter	N	
12.7	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	100	16	Small	Winter	N	
12.8	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	115	16	Small	Winter	N	
12.9	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	80	16	Small	Winter	P	
12.10	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	122	17,5	Small	Winter	N	
12.11	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	100	16,5	Small	Winter	N	
12.12	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	95	16,5	Small	Winter	N	
12.13	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	115	17	Small	Winter	N	
12.14	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	127	18	Small	Winter	N	
12.15	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	127	18	Small	Winter	N	
12.16	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	197	19	large	Winter	N	
12.17	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	197	19	large	Winter	N	
12.18	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	270	20	large	Winter	N	
12.19	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	277	20	large	Winter	N	
12.20	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	295	21	large	Winter	N	
12.21	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	345	22	large	Winter	N	
12.22	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	350	22	large	Winter	N	
12.23	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	410	23	large	Winter	N	
12.24	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	446	24	Medium	Winter	N	
12.25	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	495	24,5	Medium	Winter	N	
12.26	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	480	24,6	Medium	Winter	N	
12.27	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	500	24,9	Medium	Winter	N	
12.28	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	497	25	Medium	Winter	N	
12.29	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	525	25,1	Medium	Winter	N	
12.30	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	535	25,4	Medium	Winter	N	
12.31	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	535	25,5	Medium	Winter	P	
12.32	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	545	25,7	Medium	Winter	N	
12.33	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	550	25,9	Medium	Winter	N	
12.34	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	540	26	Medium	Winter	N	
12.35	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	595	27	Medium	Winter	N	
12.36	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	610	27,1	Medium	Winter	N	
12.37	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	590	27	Medium	Winter	N	
12.38	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	660	27,9	Medium	Winter	N	
13.1	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	270	20	large	Winter	P	
13.2	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	299	21	large	Winter	N	
13.3	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	400	23	large	Winter	N	

13.4	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	450	24	Medium	Winter	N	
13.5	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	440	24	Medium	Winter	N	
13.6	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	500	25	Medium	Winter	N	
13.7	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	420	23	large	Winter	N	
13.8	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	265	20	large	Winter	N	
13.9	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	400	23	large	Winter	N	
13.10	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	117	17	Small	Winter	N	
13.11	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	375	22	large	Winter	N	
13.12	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	395	23	large	Winter	N	
13.13	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	80	15	Small	Winter	N	
14.1	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	730	30	Medium	full	N	
14.2	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	265	20	large	full	N	
14.3	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	1050	43	Medium	full	N	
14.4	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	650	29	Medium	full	P	
14.5	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	880	34	Medium	full	N	
14.6	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	600	27	Medium	full	N	
14.7	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	670	28,5	Medium	full	N	
14.8	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	640	29	Medium	full	N	
14.9	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	660	29	Medium	full	N	
14.10	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	300	21	large	full	N	
14.11	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	605	27	Medium	full	P	01
14.12	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	430	23	large	full	P	
14.13	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	670	29,5	Medium	full	N	
14.14	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	620	29	Medium	full	P	
14.15	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	580	26,5	Medium	full	N	
14.16	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	800	32	Medium	full	N	
14.17	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	645	28	Medium	full	P	01
14.18	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	615	27	Medium	full	N	
14.19	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	1050	40	Medium	full	N	
14.20	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	300	21	large	full	N	
14.21	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	260	20	large	full	N	
14.22	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	675	28,5	Medium	full	N	
14.23	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	610	29	Medium	full	N	
15.1	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	75	14	Small	Winter	N	
15.2	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	198	19	large	Winter	N	
15.3	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	129	18	Small	Winter	N	
15.4	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	128	18	Small	Winter	N	
13.14	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	110	17	Small	Winter	N	
15.6	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	199	19	large	Winter	N	
15.7	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	203	19	large	Winter	N	
15.8	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	346	22	large	Winter	N	
15.9	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	400	23	large	Winter	N	
15.10	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	470	24	Medium	Winter	N	

15.11	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	468	24	Medium	Winter	N	
13.15	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	450	24	Medium	Winter	N	
15.13	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	570	26	Medium	Winter	N	
15.14	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	470	24	Medium	Winter	N	
15.15	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	465	23,5	Medium	Winter	N	
15.16	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	435	23	Medium	Winter	N	
15.17	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	400	23	large	Winter	N	
15.18	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	261	20	large	Winter	N	
15.19	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	560	26	Medium	Winter	N	
15.20	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	500	25	Medium	Winter	N	
15.21	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	600	27	Medium	Winter	N	
15.22	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	204	19	large	Winter	N	
13.16	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	138	18	Small	Winter	N	
15.24	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	118	17	Small	Winter	N	
15.25	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	137	18	Small	Winter	N	
15.26	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	110	17	Small	Winter	N	
15.27	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	420	23,5	large	Winter	N	
15.28	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	460	24	Medium	Winter	N	
15.29	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	450	24	Medium	Winter	N	
15.30	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	450	23,7	Medium	Winter	N	
15.31	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	400	23,5	large	Winter	N	
15.32	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	425	23,5	large	Winter	N	
15.33	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	450	23,5	Medium	Winter	N	
15.34	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	460	23,9	Medium	Winter	N	
15.35	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	450	24	Medium	Winter	N	
15.36	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	470	24	Medium	Winter	N	
15.37	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	450	24,5	Medium	Winter	N	
15.38	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	460	24,5	Medium	Winter	N	
15.39	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	455	24,3	Medium	Winter	N	
15.40	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	320	21	large	Winter	N	
15.41	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	329	21,2	large	Winter	N	
15.42	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	320	21	large	Winter	N	
15.43	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	60	15	Small	Winter	N	
15.44	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	80	15	Small	Winter	N	
15.45	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	80	14,3	Small	Winter	N	
15.46	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	80	14,7	Small	Winter	N	
15.47	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	85	14,5	Small	Winter	N	
15.48	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	85	14,5	Small	Winter	N	
15.49	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	90	15,5	Small	Winter	N	
15.50	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	95	15,5	Small	Winter	N	
15.51	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	95	15,5	Small	Winter	N	
15.52	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	80	15	Small	Winter	N	
15.53	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	85	15,3	Small	Winter	N	

15.54	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	80	14,9	Small	Winter	N	
15.55	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	75	14	Small	Winter	N	
15.56	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	60	14	Small	Winter	P	
7.1	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	690	30	Medium	full	N	
7.2	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	266	20	large	full	P	
7.3	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	1010	43	Medium	full	N	
7.4	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	600	29	Medium	full	N	
7.5	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	900	34	Medium	full	N	
7.6	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	590	27	Medium	full	N	
7.7	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	668	28,5	Medium	full	N	
7.8	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	630	29	Medium	full	N	
7.9	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	650	29	Medium	full	N	
7.10	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	300	21	large	full	N	
7.11	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	595	27	Medium	full	N	
7.12	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	400	23	large	full	N	
9.16	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	630	29,5	Medium	full	P	
9.17	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	609	29	Medium	full	N	
9.18	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	565	26,5	Medium	full	N	
9.19	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	780	32	Medium	full	N	
9.20	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	600	28	Medium	full	N	
12.39	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	609	27	Medium	full	N	
12.40	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	1000	40	Medium	full	N	
12.41	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	300	21	large	full	N	
12.42	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	260	20	large	full	N	
13.17	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	650	28,5	Medium	full	N	
13.18	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	590	29	Medium	full	N	
16.1	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	510	25	Medium	spring	N	
16.2	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	630	27	Medium	spring	P	
16.3	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	460	24	Medium	spring	N	
16.4	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	509	25	Medium	spring	N	
16.5	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	400	23	large	spring	P	
16.6	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	500	25	Medium	spring	N	
16.7	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	399	23	large	spring	N	
16.8	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	470	24	Medium	spring	N	
16.9	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	630	27	Medium	spring	P	
16.10	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	450	24	Medium	spring	N	
16.11	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	490	25	Medium	spring	N	
16.12	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	498	25	Medium	spring	N	
16.13	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	146	18,5	Small	spring	N	
16.14	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	137	18	Small	spring	N	
16.15	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	149	18,5	Small	spring	N	
16.16	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	150	18,5	Small	spring	P	
16.17	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	200	19	large	spring	P	

16.18	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	240	19,5	large	spring	N	
16.19	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	195	19	large	spring	N	
16.20	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	197	19	large	spring	N	
16.21	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	197	19	large	spring	N	
16.22	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	199	19	large	spring	N	
16.23	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	201	19	large	spring	P	
16.24	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	205	19	large	spring	P	
16.25	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	200	19	large	spring	N	
16.26	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	500	25	Medium	spring	P	
16.27	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	450	24	Medium	spring	P	
16.28	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	450	23	Medium	spring	N	
16.29	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	270	20	large	spring	P	
16.30	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	321	21	large	spring	N	
16.31	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	300	21	large	spring	P	
16.32	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	350	22	large	spring	P	
16.33	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	400	23	large	spring	P	
16.34	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	500	25	Medium	spring	N	
16.35	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	455	24	Medium	spring	N	
16.36	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	500	25	Medium	spring	P	
16.37	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	266	20	large	spring	P	
16.38	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	275	20	large	spring	N	
16.39	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	270	20	large	spring	N	
16.40	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	266	20	large	spring	P	
16.41	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	269	20	large	spring	N	
16.42	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	268	20	large	spring	N	
16.43	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	266	20	large	spring	P	
16.44	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	266	20	large	spring	P	
17.1	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	510	25	Medium	Winter	N	
17.2	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	459	24	Medium	Winter	N	
17.3	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	100	16	Small	Winter	N	
17.4	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	420	23	large	Winter	N	
26spa	SA	SW	S.Int	central	Algiers	M	400	23	large	Winter	P	01
17.6	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	600	28	Medium	Winter	N	
17.7	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	600	27	Medium	Winter	N	
17.8	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	385	22,5	large	Winter	N	
17.9	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	410	23	large	full	N	
17.10	SA	SW	S.Int	central	Algiers	F	550	26	Medium	full	N	
1W	DL	SW	S.Int	central	Algiers	M	250	25	large	full	N	
2W	DL	SW	S.Int	central	Algiers	M	150	20	Small	full	P	
3W	DL	SW	S.Int	central	Algiers	F	220	25	large	full	N	
4W	DL	SW	S.Int	central	Algiers	F	200	30	large	full	P	
5W	DL	SW	S.Int	central	Algiers	M	205	31	large	full	N	
6W	DL	SW	S.Int	central	Algiers	F	200	31	large	full	P	

29	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	294	27	large	summer	N	
30	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	285	30	large	summer	N	
38	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	368,5	29,5	large	summer	N	
39	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	241	25	large	Winter	N	
40	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	174	22	Small	Winter	N	
41	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	195	23	large	Winter	N	
42	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	174	22	Small	Winter	N	
43	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	217,5	24	large	Winter	P	
44	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	154	21	Small	Winter	N	
45	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	200	22	large	full	N	
71	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	119,0	22	Small	full	N	
72	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	174	22	Small	full	P	
74	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	175	22	Small	full	N	
78	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	136,1	20	Small	full	N	
81	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	132,4	23	Small	full	N	
90	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	217,2	24	large	full	N	
101	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	241,1	25	large	full	N	
114	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	217,2	24	large	full	N	
132	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	139,6	23,5	Small	summer	N	
140	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	352,7	29	large	summer	N	
141	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	233,1	29	large	summer	P	
142	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	418,5	31	large	summer	N	
143	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	454	32	Medium	summer	P	
144	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	472,4	32,5	Medium	summer	N	
145	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	454	32	Medium	spring	P	
146	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	571,2	35	Medium	spring	P	
147	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	571	35	Medium	spring	P	
148	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	195	23	large	spring	N	
149	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	184,1	22,5	Small	full	N	
150	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	194,7	23	large	spring	P	
151	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	229	24,5	large	spring	N	
152	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	241	25	large	spring	P	
153	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	178,6	26	Small	spring	N	
154	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	195,8	27	large	spring	P	
155	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	337,8	28,5	large	spring	N	
156	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	296,4	32	large	spring	N	
157	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	214,0	28	large	spring	N	
158	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	217,1	24	large	spring	N	
159	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	118,8	22	Small	spring	P	
160	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	173,8	22	Small	spring	N	
161	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	154,2	21	Small	spring	N	
162	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	194,7	23	large	spring	N	
163	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	162,3	25	Small	spring	P	

164	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	217,2	24	large	spring	N	
165	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	217	24	large	spring	N	
166	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	205,8	23,5	large	spring	N	
167	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	178,6	26	Small	spring	N	
168	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	266,6	26	large	spring	P	
169	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	384,8	30	large	spring	N	
170	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	542,7	41	Medium	spring	N	
171	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	491,2	33	Medium	spring	P	
172	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	571,2	35	Medium	spring	N	
173	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	530,3	34	Medium	spring	N	
174	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	418,5	31	large	spring	N	
175	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	419	31	large	spring	N	
176	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	542,7	41	Medium	spring	N	
177	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	645,0	44	Medium	spring	N	
178	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	136	20	Small	spring	N	
179	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	705,5	38	Medium	spring	N	
180	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	454	32	Medium	spring	N	
181	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	571	35	Medium	spring	N	
182	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	659	37	Medium	spring	N	
183	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	345,0	34	large	summer	N	
184	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	274,0	31	large	summer	P	
185	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	492	33	Medium	summer	N	
186	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	418,5	31	large	summer	N	
187	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	531	34	Medium	summer	N	
188	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	385	30	large	summer	N	
189	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	321	28	large	summer	N	
190	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	233,0	29	large	summer	N	
191	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	350	29	large	summer	N	
192	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	266,5	26	large	summer	P	
193	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	233,5	29	large	summer	N	
194	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	241	25	large	summer	N	
195	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	266,6	26	large	summer	P	
196	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	266	26	large	summer	P	
197	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	352	29	large	summer	P	
198	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	195,0	27	large	summer	N	
199	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	417	31	large	summer	N	
200	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	418	31	large	summer	P	
201	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	383	30	large	summer	N	
202	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	274,0	31	large	summer	N	
203	AB	Fw	Ex	eastern	Setif	F	384	30	large	summer	P	
204	AB	Fw	Ex	eastern	Setif	F	384,8	30	large	summer	N	
205	AB	Fw	Ex	eastern	Setif	F	418	31	large	summer	N	
206	AB	Fw	Ex	eastern	Setif	M	274,0	31	large	summer	N	

207	AB	Fw	Ex	eastern	Setif	F	417	31	large	summer	N	
208	AB	Fw	Ex	eastern	Setif	F	320	28	large	summer	P	
209	AB	Fw	Ex	eastern	Setif	F	382	30	large	summer	N	
210	AB	Fw	Ex	eastern	Setif	F	381,5	30	large	summer	N	
211	AB	Fw	Ex	eastern	Setif	M	231,7	29	large	summer	N	
212	AB	Fw	Ex	eastern	Setif	M	175,0	26	Small	summer	N	
213	AB	Fw	Ex	eastern	Setif	F	239	25	large	summer	N	
214	AB	Fw	Ex	eastern	Setif	F	381,2	30	large	summer	N	
215	AB	Fw	Ex	eastern	Setif	F	382,2	30	large	summer	N	
216	AB	Fw	Ex	eastern	Setif	F	418	31	large	summer	N	
217	AB	Fw	Ex	eastern	Setif	M	318,0	33	large	summer	N	
218	AB	Fw	Ex	eastern	Setif	F	570,9	35	Medium	summer	N	
219	AB	Fw	Ex	eastern	Setif	F	612	36	Medium	summer	N	
220	AB	Fw	Ex	eastern	Setif	F	291,8	27	large	summer	N	
221	AB	Fw	Ex	eastern	Setif	F	490,3	33	Medium	summer	N	
222	AB	Fw	Ex	eastern	Setif	M	273,0	31	large	summer	N	
223	AB	Fw	Ex	eastern	Setif	F	702,9	38	Medium	summer	P	
224	AB	Fw	Ex	eastern	Setif	F	193	23	large	summer	P	
225	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	192,5	23	large	summer	N	
226	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	195,0	27	large	summer	P	
227	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	294	27	large	summer	P	
228	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	294	27	large	summer	N	
229	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	308	27,5	large	summer	P	
230	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	274,9	31	large	summer	N	
231	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	274,6	31	large	summer	N	
233	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	173,8	22	Small	summer	P	
234	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	185	22,5	Small	summer	P	
235	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	242	25	large	summer	P	
236	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	267	26	large	summer	N	
237	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	268	26	large	summer	N	
238	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	266,6	26	large	summer	N	
239	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	265	26	large	summer	N	
240	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	350,9	29	large	summer	N	
241	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	265,8	26	large	summer	N	
242	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	352,6	29	large	summer	P	
243	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	241,5	25	large	summer	P	
244	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	233,9	29	large	summer	N	
245	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	572	35	Medium	summer	P	
246	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	572,5	35	Medium	summer	P	
247	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	616,2	36	Medium	summer	N	
248	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	685,9	37	Medium	summer	N	
249	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	575,0	42	Medium	summer	N	
250	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	274,3	31	large	summer	N	

251	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	420	40	large	summer	N	
252	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	132,4	23	Small	summer	N	
253	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	17,51	22	Small	Winter	N	
254	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	266	26	large	Winter	N	
255	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	293,7	27	large	spring	N	
257	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	291	33	large	spring	N	
258	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	M	215,0	28	large	spring	N	
259	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	804,9	40	Medium	spring	N	
260	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	454,2	32	Medium	spring	P	
261	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	492,3	33	Medium	spring	P	
262	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	M	296,8	32	large	spring	N	
263	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	353,6	29	large	spring	N	
264	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	492,3	33	Medium	spring	N	
265	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	571	35	Medium	spring	N	
266	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	805,1	40	Medium	spring	N	
267	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	206,3	23,5	large	spring	N	
268	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	242,1	25	large	spring	N	
269	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	229	24,5	large	spring	N	
270	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	492,1	33	Medium	spring	N	
271	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	571,5	35	Medium	spring	N	
272	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	530,3	34	Medium	spring	N	
273	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	513	33,5	Medium	summer	N	
274	AB	Fw	Ex	eastern	Khanchela	F	616,8	36	Medium	summer	N	
275	AB	Fw	Ex	eastern	Khanchela	F	245,3	25	large	summer	N	
276	AB	Fw	Ex	eastern	Khanchela	F	385,2	30	large	summer	N	
277	AB	Fw	Ex	eastern	Khanchela	F	706,3	38	Medium	summer	N	
278	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	709,6	38	Medium	summer	N	
279	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	858	41	Medium	summer	P	
280	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	619	36	Medium	summer	P	
281	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	451,0	38	Medium	summer	P	
282	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	298,3	32	large	summer	P	
283	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	233,0	29	large	summer	N	
284	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	294,3	27	large	summer	N	
285	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	198,1	27	large	summer	P	
286	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	490	33	Medium	summer	P	
287	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	320,0	33	large	summer	N	
288	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	618	36	Medium	summer	N	
289	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	195,3	23	large	summer	P	
290	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	198,2	23	large	summer	N	
291	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	194	23	large	summer	P	
292	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	194,7	23	large	summer	N	
293	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	194,3	23	large	summer	P	
294	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	266,6	26	large	summer	P	

295	AB	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	326	28	large	summer	N	
296	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	F	174	22	Small	spring	N	
296	AB	Fw	Ex	eastern	Mila	M	619	35	Medium	summer	N	
17brm	AB	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	241	25	large	summer	N	
100 car	CC	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	230	25	large	spring	N	
101 car	CC	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	233,2	25	large	spring	P	
102 car	CC	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	233,9	25	large	spring	P	
103 car	CC	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	356	29	large	spring	N	
104 car	CC	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	162,9	22	Small	spring	N	
105 car	CC	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	234	25	large	spring	N	
106 car	CC	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	230,1	25	large	spring	N	
107 car	CC	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	261,6	26	large	spring	N	
108 car	CC	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	291,5	27	large	spring	P	
109 car	CC	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	316	28	large	spring	N	
110 car	CC	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	45,5	14	Small	spring	N	
111 car	CC	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	45	14	Small	spring	P	
112 car	CC	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	45	14	Small	spring	P	
113 car	CC	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	46	14	Small	spring	P	
114 car	CC	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	45	14	Small	spring	P	
115 car	CC	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	45,3	14	Small	spring	P	
116 car	CC	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	54,8	15	Small	spring	P	
117 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	65,5	16	Small	spring	P	
118 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	72,5	16,5	Small	spring	P	
119 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	92,3	18	Small	spring	N	
120 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	79	17	Small	spring	N	
121 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	91,9	18	Small	spring	P	
122 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	91	18	Small	spring	N	
123 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	91,5	18	Small	spring	N	
124 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	78,6	17	Small	spring	N	
125 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	91,5	18	Small	spring	P	
126 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	107,1	19	Small	spring	N	
127 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	142,9	21	Small	spring	N	
128 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	257	26	large	spring	N	
129 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	392	30	large	spring	P	
130 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	383	30	large	spring	N	
131 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	383	30	large	spring	N	
132 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	79	17	Small	spring	N	
133 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	79,2	17	Small	spring	N	
134 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	78,9	17	Small	spring	P	
135 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	65,9	16	Small	spring	P	
136 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	78	17	Small	spring	P	
137 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	78,2	17	Small	spring	P	
138 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	123,9	20	Small	spring	P	

139 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	123,8	20	Small	spring	P	
140 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	260,8	26	large	spring	P	
141 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	349,3	29	large	spring	P	
142 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	430,5	31	large	spring	P	
143 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	85	17,5	Small	spring	N	
144 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	86	17,5	Small	spring	N	
145 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	86,5	17,5	Small	spring	N	
146 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	85,3	17,5	Small	summer	P	
147 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	107	19	Small	summer	N	
148 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	107,5	19	Small	summer	N	
149 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	107	19	Small	summer	N	
150 car	CC	Fw	Ex	eastern	Setif	F	233,5	25	large	summer	P	
151 car	CC	Fw	Ex	eastern	Setif	F	233,3	25	large	summer	N	
152 car	CC	Fw	Ex	eastern	Setif	F	1162,9	44	Medium	summer	N	
153 car	CC	Fw	Ex	eastern	Mila	F	78,1	17	Small	summer	P	
154 car	CC	Fw	Ex	eastern	Mila	F	78	17	Small	summer	N	
155 car	CC	Fw	Ex	eastern	Mila	F	79	17	Small	summer	P	
156 car	CC	Fw	Ex	eastern	Mila	F	78,6	17	Small	summer	N	
157 car	CC	Fw	Ex	eastern	Mila	F	162,8	22	Small	summer	N	
158 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	162,3	22	Small	summer	P	
159 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	160,9	22	Small	summer	N	
160 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	80	17	Small	summer	N	
161 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	162	22	Small	summer	N	
162 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	78,9	17	Small	summer	N	
163 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	208	24	large	summer	N	
164 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	162,5	22	Small	summer	P	
165 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	260,9	26	large	summer	N	
166 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	78	17	Small	summer	N	
167 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	78,5	17	Small	summer	P	
168 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	92	18	Small	summer	P	
169 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	123,9	20	Small	summer	N	
170 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	124	20	Small	summer	P	
171 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	323	28	large	summer	N	
172 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	220	28	large	summer	N	
173 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	25	20	Small	summer	N	
174 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	200	25	large	summer	N	
175 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	21	22	Small	summer	P	
78 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	514,5	33	Medium	summer	N	
79 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	355,9	29	large	summer	P	
80 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	392,9	30	large	summer	N	
81 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	382,9	30	large	summer	P	
82 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	185	23	Small	summer	P	
83 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	123,9	20	Small	summer	P	

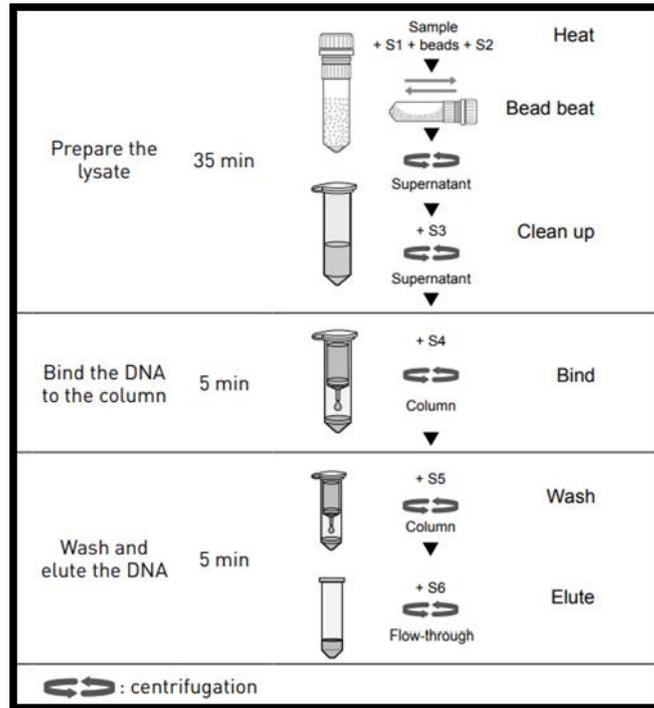
84 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	184,9	23	Small	summer	P	
85 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	233,9	25	large	summer	N	
86 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	108	19	Small	summer	P	
87 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	107,1	19	Small	summer	P	
88 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	123,6	20	Small	summer	N	
89 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	123,9	20	Small	summer	P	
90 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	79	17	Small	summer	P	
91 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	108	19	Small	summer	P	
92 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	107,6	19	Small	summer	P	
93 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	123,1	20	Small	summer	P	
94 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	79,2	17	Small	summer	N	
95 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	142,6	21	Small	summer	N	
96 car	CC	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	142,9	21	Small	summer	P	
97 car	CC	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	142	21	Small	summer	N	
98 car	CC	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	142	21	Small	summer	P	
99 car	CC	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	234	25	large	summer	N	
100 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Eltaref	F	20,9	21	Small	spring	P	
101 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	25,3	22	Small	spring	N	
102 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	25,1	22	Small	spring	N	
103 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	22	22	Small	spring	N	
104 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	22,9	23	Small	spring	N	
105 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Setif	F	22,3	23	Small	spring	N	
106 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Setif	F	22,5	23	Small	spring	N	
107 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Setif	F	22,5	22	Small	spring	N	
108 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Setif	F	22,7	22	Small	spring	N	
109 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Mila	M	24	21	Small	spring	N	
110 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Mila	F	27	27	Small	spring	N	
111 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Mila	F	23	23	Small	spring	N	
112 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Mila	F	25	25	Small	spring	N	
113 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Mila	F	24	23,5	Small	spring	P	
114 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Mila	F	24	24	Small	spring	N	
115 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Mila	F	22	22	Small	spring	N	
116 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Mila	F	23,5	24	Small	spring	P	
118 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	22	22,5	Small	spring	N	
119 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	21	21	Small	spring	P	
120 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	21,5	22	Small	spring	N	
121 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	21,3	22	Small	spring	P	
122 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Setif	F	23	23	Small	spring	N	
123 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Setif	M	26,5	23	Small	spring	N	
124 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Setif	F	23,5	23	Small	spring	N	
125 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Setif	M	26,1	22	Small	spring	N	
126 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Setif	F	22	22	Small	spring	N	
127 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Setif	F	22,3	22	Small	spring	N	

68 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	22,1	22	Small	spring	N	
69 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	24,5	24	Small	spring	P	
70 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	29,1	25	Small	spring	N	
71 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	27	28	Small	spring	N	
72 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	28,9	29	Small	spring	N	
73 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	32	32	Small	spring	N	
74 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	41,3	35	Small	summer	N	
75 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	38,6	39	Small	summer	P	
76 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	26,3	23	Small	summer	P	
77 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	21,6	22	Small	summer	N	
78 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	22,7	22,5	Small	summer	N	
79 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	22,5	23	Small	summer	N	
80 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	26,5	23	Small	summer	N	
81 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	21	21	Small	summer	P	
82 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	23	23	Small	summer	N	
83 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	22	22	Small	summer	N	
84 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	21,8	22	Small	summer	N	
85 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	19,9	20	Small	summer	N	
86 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	23,6	21	Small	summer	N	
87 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	20	20	Small	summer	N	
88 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	23	23	Small	summer	P	
89 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	22,9	23	Small	summer	P	
90 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	22,5	23	Small	summer	N	
91 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Eltaref	F	23	23	Small	summer	N	
92 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Eltaref	F	24	24	Small	summer	N	
93 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Eltaref	M	24,3	21	Small	summer	N	
94 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Eltaref	F	22	22	Small	summer	N	
95 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Eltaref	M	26	22	Small	summer	N	
96 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Eltaref	F	20,9	21	Small	summer	N	
97 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Eltaref	M	26	22	Small	summer	N	
98 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Eltaref	M	22	19	Small	summer	N	
99 gar	RR	Fw	Ex	eastern	Eltaref	F	23,2	23	Small	summer	N	
9 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	24,9	25	Small	spring	P	
8 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	25	26	Small	spring	N	
7 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	24,5	25	Small	spring	N	
6 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	24,9	26	Small	spring	P	
57 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	25,5	24	Small	spring	P	
56 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Guelma	M	25,3	25	Small	spring	P	
55 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	25	25,5	Small	spring	P	
54 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	25,5	26	Small	spring	P	
53 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	26	26,5	Small	spring	N	
52 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	28	30	Small	spring	P	
51 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	24	24	Small	spring	P	

50 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	21,9	23	Small	spring	N	
5 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	24	24	Small	spring	N	
49 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Eltaref	F	22	23	Small	spring	N	
48 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Eltaref	F	21,6	23	Small	spring	P	
47 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Eltaref	F	22	22	Small	spring	N	
46 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Eltaref	F	25	25	Small	spring	N	
45 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Eltaref	F	23,3	23	Small	spring	P	
44 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Eltaref	F	22,9	22	Small	spring	P	
43 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Eltaref	F	25	25	Small	spring	P	
42 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Eltaref	F	24,3	24	Small	spring	N	
41 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Eltaref	F	23,3	23	Small	spring	N	
40 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Eltaref	F	22,3	21	Small	spring	P	
4 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	23,9	24	Small	spring	N	
39 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Eltaref	F	25,3	25	Small	spring	N	
38 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Eltaref	F	25,3	25	Small	spring	P	
37 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	25	25	Small	spring	P	
36 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	25,6	25	Small	spring	N	
35 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	25,3	26	Small	spring	P	
34 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	24,9	25	Small	spring	P	
33 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	24,2	24	Small	summer	N	
32 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	22,9	22	Small	summer	N	
31 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	22	22	Small	summer	P	
30 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	25	26	Small	summer	N	
3 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	22,5	23	Small	summer	N	
29 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	25	26	Small	summer	N	
28 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	25	26	Small	summer	P	
27 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	25	26	Small	summer	P	
26 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	23,6	23	Small	summer	N	
25 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	23,2	22	Small	summer	N	
24 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	25,3	25	Small	summer	N	
23 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	25	26	Small	summer	P	
22 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	24	24,5	Small	summer	N	
21 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	25	25	Small	summer	P	
20 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	24,3	25	Small	summer	N	
2 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	23	24	Small	summer	P	
19 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	23,4	23	Small	summer	N	
18 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	23,3	23	Small	summer	N	
17 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	24	24	Small	summer	P	
16 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	F	25	25	Small	summer	P	
15 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Soukahras	M	22,9	22	Small	summer	N	
14 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	25	25	Small	summer	N	
13 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	23,4	23	Small	summer	N	
12 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	23,5	23	Small	summer	P	

11 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	23	23	Small	summer	P	
10 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	22	21	Small	summer	N	
1 sar	AA	Fw	Ex	eastern	Guelma	F	20	19	Small	summer	P	

SA : *Sparus aurata* ; **DL** : *Dicentrarcus labrax* ; **AB** : *Abramis brama* ; **CC** : *carassius carassius* ; **RR** : *Rutilus rutilus* ; **AA** : *Ablette alburnus*. **SW**: seawater; **FW**: freshwater; **S.Int**: semi intensify; **E**: extensive. **M**: male, female. **N**: negative; **P**: positive.

Annexe 04 : Etapes d'extraction d'ADN (thermofisher.com/support).

Annexe 05 : Conditions PCR (18S) optimisées : selon(Certad *et al.*, 2015)

A. Préparation de la 1ère réaction PCR

Amorces pour la 1 ère réaction :

JerExtF = 5'- GACATATCWTTYAAGTTTCTGACC -3'

JerExtR = 5' – CTGAAGGAGTAAGGAACAACC -3'

Chaque réaction doit contenir :

- 12.5uL 2x PCRBIO Taq MixRed
- 1uL 10uM JerExtF
- 1uL 10uM JerExtR
- 9.5uL d'eau miliQ
- 1uL d'ADN

REMARQUE : Préparez 10 % de Master Mix supplémentaires en raison des inexactitudes de la pipette

Exécutez les réactions PCR sur le thermocycleur avec le programme suivant :

- 94⁰C pendant 3 minutes (x1)
- 94⁰C pendant 45 secondes
- 53,5⁰C pendant 45 secondes (x40)
- 72⁰C pendant 45 secondes
- 72⁰C pendant 5 minutes (x1)
- Tenir à 12⁰C

B. Préparation de la 2 e réaction PCR

Amorces pour la 2 e réaction PCR

JerIntF = 5'- CCTATCAGCTTTMGACGGTAGG -3'

JerIntR = 5' – TCTAAGAATTTACCTCTGACTG -3'

Chaque réaction doit contenir :

- 12.5uL 2x PCRBIO Taq MixRed
- 1uL 10uM JerExtF
- 1uL 10uM JerExtR
- 9.5uL d'eau miliQ
- 1 uL de 1 ère réaction PCR

Exécutez les réactions PCR sur le thermocycleur avec le programme suivant :

- 94⁰C pendant 3 minutes (x1)
- 94⁰C pendant 45 secondes
- 57,3⁰C pendant 45 secondes (x40)
- 72⁰C pendant 35 secondes
- 72⁰C pendant 5 minutes (x1)
- Tenir à 12⁰C

Annexe 06 : Amorces utilisés pour amplifier le gène (gp60)**a- Amorce primaire**

Forward AL3531: ATA GTC TCC GCT GTA TTC

Reverse AL3535: GGA AGG AAC GAT GTA TCT

Taille du fragment (bp): ~ 1000

b- Amorce secondaire

Forward AL3532: TCC GCT GTA TTC TCA GCC

Reverse AL3534:GCA GAG GAA CCA GCA TC

Taille du fragment (bp):~ 850.