

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	- 1 -
TABLE DES MATIERES	- 3 -
TABLE DES ILLUSTRATIONS	- 7 -
INTRODUCTION	- 9 -
I. PRESENTATION	- 9 -
II. HISTORIQUE.....	- 9 -
III. TAXONOMIE.....	- 10 -
A. Position taxonomique	- 10 -
B. Les différentes espèces du genre	- 10 -
C. Les nouveaux outils de la taxonomie	- 12 -
BIOLOGIE DU PARASITE	- 14 -
I. MORPHOLOGIE DU PARASITE	- 14 -
II. CYCLE DE DEVELOPPEMENT.....	- 15 -
A. Caractéristiques	- 15 -
B. Déroulement du cycle.....	- 16 -
1) Excystation	- 16 -
2) Mérogonie.....	- 16 -
3) Gamétogonie.....	- 16 -
4) Sporogonie ou sporulation	- 17 -
5) Survie dans le milieu extérieur	- 17 -
C. Particularités du cycle	- 18 -
III. POSITION DANS LA CELLULE.....	- 19 -
A. Formation de l'organe de nutrition	- 19 -
B. Rôle de l'organe de nutrition	- 20 -
CRYPTOSPORIDIOSE ANIMALE	- 22 -
I. POPULATION ATTEINTE	- 22 -
II. CLINIQUE	- 22 -
A. Clinique chez les ruminants.....	- 22 -
1) Etiologie.....	- 22 -
2) Symptômes	- 22 -
3) Modèle expérimental d'infection.....	- 23 -
4) Lésions.....	- 24 -
B. Clinique chez les autres mammifères	- 24 -
C. Clinique chez les Oiseaux	- 25 -

Table des Matières

D. Clinique chez les Reptiles	- 25 -
III. PREVALENCE.....	- 26 -
A. Variation en fonction de l'âge	- 26 -
B. Variation en fonction du type d'élevage.....	- 27 -
C. Variation en fonction du statut clinique	- 28 -
D. Variation en fonction du pays.....	- 28 -
E. Autres facteurs de variation.....	- 28 -
IV. IMPORTANCE.....	- 29 -
A. Evolution de l'importance de <i>Cryptosporidium parvum</i>	- 29 -
B. Importance en fonction du système d'élevage.....	- 30 -
V. EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE.....	- 31 -
A. Sources	- 31 -
1) Les jeunes animaux du troupeau.....	- 31 -
2) Les mères	- 31 -
3) Animaux sauvages, rongeurs.....	- 32 -
4) Eau	- 32 -
B. Facteurs de réceptivité et de sensibilité	- 33 -
1) Espèce	- 33 -
2) Race	- 33 -
3) Age.....	- 33 -
4) Etat immunitaire	- 33 -
C. Mode de transmission.....	- 33 -
D. Facteurs de risques	- 34 -
1) Saison.....	- 34 -
2) Densité animale	- 34 -
3) Conduite d'élevage	- 35 -
4) Rôle de l'épandage de fumier	- 35 -

DIVERSITE GENETIQUE DE L'ESPECE *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* - 37 -

I. MISE EN EVIDENCE DE LA VARIABILITE GENETIQUE	- 37 -
A. Deux génotypes différents	- 37 -
B. Deux cycles de transmission différents	- 39 -
II. EXPLICATIONS POSSIBLES	- 41 -
A. Variation en fonction du lieu géographique	- 41 -
B. Variation en fonction du choix du marqueur génétique	- 42 -
III. UNE SITUATION ENCORE PLUS COMPLEXE.....	- 43 -
A. <i>Cryptosporidium felis</i>	- 45 -
B. <i>Cryptosporidium</i> chez les reptiles : <i>C. serpentis</i> et <i>C. saurophilum</i>	- 46 -
C. <i>Cryptosporidium wrairi</i>	- 47 -
D. <i>Cryptosporidium parvum</i> : génotype canin	- 47 -
E. <i>Cryptosporidium parvum</i> : génotype porcin.....	- 47 -
F. <i>Cryptosporidium parvum</i> : génotype murin	- 48 -
G. <i>Cryptosporidium</i> chez les animaux sauvages	- 48 -
H. Conclusion.....	- 48 -
IV. CONSEQUENCES	- 49 -

CRYPTOSPORIDIOSE CHEZ L'HOMME - 50 -

I. POPULATION ATTEINTE	- 50 -
A. Les enfants.....	- 50 -

Table des Matières

B.	Les immunodéprimés	- 51 -
II.	CLINIQUE	- 52 -
A.	Forme asymptomatique	- 52 -
B.	Forme transitoire (ou aiguë)	- 52 -
C.	Forme chronique	- 52 -
D.	Forme fulminante	- 53 -
E.	Extension	- 53 -
F.	Infection expérimentale	- 53 -
III.	MODES DE TRANSMISSION.....	- 53 -
A.	Liste des comportements potentiellement à risque	- 53 -
B.	Transmission par l'eau	- 54 -
1)	Des exemples de cryptosporidiose d'origine hydrique	- 54 -
2)	Etat des lieux.....	- 56 -
3)	Caractéristiques biologiques de <i>Cryptosporidium parvum</i> facilitant une transmission par l'eau	- 57 -
C.	Transmission zoonotique	- 58 -
1)	Transmission par contact avec un animal de compagnie	- 58 -
2)	Transmission par contact avec le bétail	- 59 -
D.	Transmission entre personnes.....	- 59 -
E.	Transmission par la nourriture.....	- 59 -
IV.	GENOTYPES IMPLIQUES	- 60 -
V.	CONCLUSION	- 61 -

METHODES DE LUTTE - 63 -

I.	MISE EN EVIDENCE DU PARASITE.....	- 63 -
A.	Chez l'animal	- 63 -
1)	Mise en évidence des oocystes	- 63 -
2)	Diagnostic différentiel	- 64 -
B.	Chez l'homme	- 64 -
C.	Détection des oocystes dans l'eau	- 65 -
1)	Caractéristiques de <i>Cryptosporidium</i> sp. rendant sa détection dans l'eau difficile	- 65 -
2)	Collection et concentration des oocystes	- 65 -
3)	Séparation des débris	- 66 -
4)	Détection des oocystes.....	- 66 -
5)	Détermination de la concentration en oocystes dans l'eau	- 68 -
6)	Détermination de la viabilité des oocystes.....	- 68 -
7)	Détermination du génotype en cause	- 68 -
II.	TRAITEMENT	- 69 -
A.	Chez l'animal	- 69 -
1)	Thérapeutique spécifique	- 69 -
2)	Transfert d'immunité passive	- 71 -
3)	Immunité active contre <i>C. parvum</i>	- 71 -
B.	Chez l'homme	- 72 -
1)	Traitements symptomatique	- 72 -
2)	Traitements antirétroviraux.....	- 73 -
3)	Modificateurs du transit	- 73 -
4)	Thérapeutique spécifique	- 73 -
C.	Traitements des eaux (33).....	- 74 -
1)	Objectif	- 74 -
2)	Etapes.....	- 74 -
3)	Législation	- 76 -
D.	Désinfection des locaux.....	- 76 -

Table des Matières

III. PREVENTION.....	- 76 -
A. Mesures de prévention de la contamination animale.....	- 76 -
1) Gestion du troupeau	- 77 -
2) Alimentation	- 77 -
3) Hygiène des locaux	- 77 -
B. Pollution de l'eau imputable à l'élevage	- 77 -
1) Modalités	- 77 -
2) Exemples	- 78 -
3) Conclusion	- 79 -
C. Comment éviter la contamination de l'eau	- 79 -
1) Par l'animal.....	- 79 -
2) Par l'homme.....	- 80 -
D. Comment éviter la contamination de l'homme ?.....	- 80 -
1) Par l'animal.....	- 80 -
2) Par l'eau.....	- 80 -
3) Eviter les comportements à risque	- 81 -
CONCLUSION	- 82 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 83 -
ANNEXE	- 91 -

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Tableaux

Tableau 1 : Position taxonomique	- 10 -
Tableau 2 : Espèces du genre <i>Cryptosporidium</i> considérées comme valides ..	- 12 -
Tableau 3 : Comparaison de la prévalence de la cryptosporidiose en France en fonction du type d'élevage	- 27 -
Tableau 4 : Prévalence d'excrétion en fonction du statut clinique chez des veaux	- 28 -
Tableau 5 : Excrétion d'oocystes chez des bovins adultes	- 32 -
Tableau 6 : Répartition des génotypes.....	- 39 -
Tableau 7 : Distance génétique entre différents isolats et espèces de <i>Cryptosporidium</i> sp. (% de nucléotides différents)	- 44 -
Tableau 8 : Différences biologiques et morphométriques entre <i>C. parvum</i> et <i>C. felis</i>	- 46 -
Tableau 9 : Différences biologiques et morphométriques entre <i>C. saurophilum</i> et <i>C. serpentis</i>	- 46 -
Tableau 10 : Quelques exemples de la prévalence de la cryptosporidiose chez l'homme atteint par le VIH.....	- 51 -
Tableau 11 : Epidémies de cryptosporidiose d'origine hydrique	- 56 -
Tableau 12 : Epidémies de cryptosporidiose et génotype impliqué.....	- 61 -

Figures

Figure 1 : Représentation schématique du cycle évolutif	- 15 -
Figure 2 : Cycle biologique de <i>Cryptosporidium parvum</i> d'après Ward et Cevallos	- 18 -
Figure 3 : Invasion du parasite d'après	- 20 -
Figure 4 : Répartition de la prévalence en fonction de l'âge chez des veaux en Espagne.....	- 26 -
Figure 5 : Evolution de l'importance de <i>Cryptosporidium parvum</i> chez les veaux diarrhéiques entre 1982 et 1993	- 29 -
Figure 6 : Comparaison en fonction du système d'élevage.....	- 30 -
Figure 7 : Profil de migration	- 40 -

Table des illustrations

Figure 8 : Relations phylogénétiques entre les différentes espèces et génotypes de <i>Cryptosporidium</i>	- 45 -
Figure 9 : Représentation schématique de la transmission de la cryptosporidiose à l'homme	- 62 -

Photographies

Photographie 1 : Photographie au microscope électronique montrant plusieurs stades de <i>Cryptosporidium</i> dans l'épithélium intestinal d'un mouton	- 14 -
Photographie 2 : Méronte de type I, <i>C. baileyi</i> , photo de W.L. CURRENT	- 16 -
Photographie 3 : Organe de nutrition, <i>C. parvum</i> , photo à microscopie à balayage de S.J. UPTON	- 21 -
Photographie 4 : Portion basale de l'organe de nutrition, <i>C. baileyi</i> , photo de W.L. CURRENT	- 21 -
Photographie 5 : Infection par <i>C. baileyi</i> , photo de W.L. CURRENT	- 25 -

Partie 1**INTRODUCTION****I. PRESENTATION**

Protozoaires parasites du tube digestif, les espèces du genre *Cryptosporidium* se rencontrent chez une très large gamme de Vertébrés : Mammifères, Oiseaux, Reptiles et Poissons. L'espèce *Cryptosporidium parvum* a été recensée chez 79 à 152 espèces de Mammifères (29, 31) parmi lesquelles les ruminants sont les plus représentés. *Cryptosporidium parvum* est essentiellement un parasite du nouveau-né bien qu'il soit décrit chez des individus de tout âge. Le parasite se localise dans les microvillosités de l'épithélium intestinal. La cryptosporidiose se caractérise chez les mammifères par des signes cliniques intestinaux, essentiellement de la diarrhée. Il existe une grande différence dans l'intensité de la clinique en fonction du statut immunitaire de l'hôte, homme ou animal : aiguë mais auto résolutive chez les individus en bonne santé, la maladie devient chronique et mortelle chez les individus immunodéprimés.

C'est un parasite « émergeant » car bien qu'il soit répertorié depuis le début du 20^{ème} siècle, son importance en santé animale et humaine ne s'est révélée que depuis ces quinze dernières années.

II. HISTORIQUE

Le genre *Cryptosporidium* est décrit pour la première fois en 1907 par Tyzzer qui observe ce protozoaire parasite dans les glandes gastriques d'une souris de laboratoire (*Mus musculus*). Le parasite est considéré comme un nouveau genre de Sporozoaire et le genre *Cryptosporidium* qui signifie « sporocyste caché » est établi. L'espèce découverte est nommée *Cryptosporidium muris*. Cinq ans plus tard, Tyzzer découvre chez la souris également, une autre espèce du genre morphologiquement identique mais plus petite et localisée à l'intestin grêle : il s'agit de *Cryptosporidium parvum* (72).

En 1955, Slavin découvre l'importance pathogénique du genre : *Cryptosporidium meleagridis* est associé à une maladie clinique provoquant diarrhée et faible mortalité chez la dinde. Vingt ans plus tard, on retrouve le genre *Cryptosporidium* dans l'intestin de veaux diarrhéiques ce qui confirme le rôle pathogène potentiel du parasite. On considère aujourd'hui que l'espèce en cause était *Cryptosporidium parvum*.

En 1976, *Cryptosporidium* sp. est mis en évidence chez deux patients humains présentant une diarrhée sévère. Un an plus tard, une nouvelle espèce est établie chez un serpent (25) : *Cryptosporidium serpentis*. D'autres cas de cryptosporidiose humaine sont ensuite décrits essentiellement chez des patients

immunodéprimés (immunodépression congénitale ou thérapie immuno-suppressive). L'intérêt médical s'accroît quand la maladie touche des individus immunocompétents en contact étroit avec des veaux malades ainsi que des patients infectés par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) et ayant développé un SIDA (Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise) chez lesquels elle prend un caractère chronique et souvent mortel.

Depuis la cryptosporidiose est reconnue comme une **cause primaire, fréquente et grave de diarrhée chez de nombreux mammifères dont l'homme**. Elle entre dans le domaine de la santé publique dans les années 90 quand plusieurs foyers causés par la consommation d'eau contaminée sont recensés.

III. TAXONOMIE

A. POSITION TAXONOMIQUE

Règne	Protiste	Eucaryote unicellulaire
Phylum	Protozoaire	Protiste à affinité animale, hétérotrophe
Embranchement	Apicomplexa (Sporozoa)	Parasite obligatoire, intracellulaire, complexe apical à certains stades (organe de pénétration dans la cellule hôte)
Classe	Coccidea	Reproduction sexuée et asexuée, formation d'oocystes
Ordre	Eimeriida	Macro et micro-gamontes se développent indépendamment, zygote non mobile
Famille	Cryptosporidiidae	Oocystes à 4 sporozoïtes nus, cycle monoxène
Genre	Cryptosporidium	Le seul genre important

Tableau 1 : Position taxonomique (97, 71)

B. LES DIFFERENTES ESPECES DU GENRE

Au début du siècle, avec la découverte de *Cryptosporidium muris*, Tyzzer établi le genre *Cryptosporidium*. La 1^{ère} espèce décrite est *Cryptosporidium muris* qui infecte la souris et un nombre limité d'autres mammifères. C'est le même auteur qui décrit avec précision la morphologie, la localisation et les stades du cycle évolutif de l'espèce qui va devenir la plus importante et la plus préoccupante pour l'homme : ***Cryptosporidium parvum***. Cette espèce infecte un grand nombre de mammifères dont l'homme.

Depuis, une vingtaine d'espèces ont été découvertes mais certaines, incomplètement décrites, ne sont pas considérées comme valides aujourd'hui.

La taxonomie du genre n'est toujours ni complètement établie ni acceptée par l'ensemble des chercheurs.

La taxonomie des protozoaires en général est délicate car elle repose sur des critères parfois subjectifs : quand il n'y a pas de différences morphologiques visibles, ce sont les différences de distribution géographique, de spécificité d'hôte ou de comportement entre les parasites qui servent à définir ce qu'est une espèce (106).

Au départ, le nom des espèces du genre *Cryptosporidium* était donné en fonction de l'espèce hôte car on supposait que, comme pour les autres coccidies, il y avait une forte spécificité d'hôte pour le genre *Cryptosporidium*. Plusieurs fois, au cours du siècle, une nouvelle espèce a été décrite mais finalement se révélait appartenir au genre *Sarcocystis* ou à une espèce déjà établie de *Cryptosporidium*. C'est ainsi que l'on a découvert *C. agni* ou *C. bovis* qui, en fait, se sont révélées être identiques à *C. parvum*.

Lorsque des études expérimentales de transmission croisée furent entreprises dans les années 1980, on s'aperçut qu'une souche humaine était capable de provoquer la maladie chez l'animal comme n'importe quelle autre souche animale et que parmi tous les essais de transmission croisée, seuls ceux entre classes de vertébrés différentes (Mammifères à Oiseaux ou Mammifères à Reptiles...) se soldaient par un échec. La spécificité d'hôte est donc remise en cause ainsi que la base de la nomination des espèces. Cette très grande facilité de transmission pose en revanche une autre question : le genre *Cryptosporidium* se compose-t-il d'une espèce unique ? La réponse est unanime parmi les chercheurs qui répondent par la négative. En revanche, **le nombre exact d'espèces qui composent le genre n'est toujours pas clairement établi.**

Parmi les autres espèces considérées comme valides aujourd'hui, on compte *Cryptosporidium meleagridis*, une espèce qui parasite l'intestin des oiseaux ; *Cryptosporidium serpentis* qui parasite l'estomac des reptiles et *Cryptosporidium nasorum* chez les poissons. Current (25), en 1986, découvre une autre espèce chez les oiseaux localisée à la bourse de Fabricius, au cloaque et au tractus respiratoire : il s'agit de *Cryptosporidium baileyi*.

Cryptosporidium wrairi isolé chez des cochons d'Inde est considéré comme valide également de même que *Cryptosporidium felis* qui infecte le chat et a été très récemment retrouvée chez l'homme (92).

Au total, six espèces sont aujourd'hui considérées comme valides d'après O'Donoghue (72) : ***C. muris*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. baileyi*, *C. serpentis* et *C. nasorum*.**

Certains auteurs (106, 60, 31) incluent également les espèces suivantes : ***C. felis*, *C. saurophilum*, *C. wrairi* et *C. andersoni*** localisée à la caillette des bovins.

Espèce	Hôte	Taille oocyste (micromètres)
<i>C. andersoni</i>	Bovins	7,4 × 5,5
<i>C. baileyi</i>	Oiseaux	6,2 × 4,6
<i>C. felis</i>	Chat	4,6 × 4,0
<i>C. meleagridis</i>	Oiseaux	5,2 × 4,6
<i>C. muris</i>	Souris, Bétail	8,4 × 6,3
<i>C. nasorum</i>	Poissons	4,3 × 3,3
<i>C. parvum</i>	Souris, Bétail, Homme...	5,0 × 4,5
<i>C. saurophilum</i>	Lézards	5,0 × 4,7
<i>C. serpentis</i>	Reptiles	6,2 × 5,3
<i>C. wrairi</i>	Cochon d'Inde	5,4 × 4,6

Tableau 2 : Espèces du genre *Cryptosporidium* considérées comme valides

On suspecte l'existence d'autres espèces distinctes notamment chez la dinde et chez l'autruche et de nombreux isolats (ensemble d'oocystes provenant d'un hôte défini) morphologiquement différents sont rapportés chez les reptiles.

C. LES NOUVEAUX OUTILS DE LA TAXONOMIE

Les bases de la taxonomie reposent sur des critères morphologiques et biologiques : taille des oocystes, espèce hôte, lieu et stades du cycle évolutif... Ces critères ont permis d'établir un certain nombre d'espèces mais sont aujourd'hui insuffisants. Les résultats de transmission croisée soutiennent eux aussi l'existence de plusieurs espèces distinctes : bien que identique à *C. meleagridis* sur le plan morphologique et du développement, *C. parvum* est incapable d'infecter les oiseaux ce qui prouve que ces deux espèces sont bien différentes (106). Cependant, ces études de transmission croisée ont elles aussi leurs limites et ne permettent pas de distinguer les différences génétiques entre des espèces très proches.

La taxonomie se doit d'évoluer et de prendre en compte à la fois des critères classiques morphologiques et biologiques et des critères plus récents moléculaires et génétiques. Il faudra réussir à combiner des résultats venant de trois sources de données différentes :

- description morphologique et mesure des oocystes vivants
- description du cycle de développement, des stages endogènes, données sur les études de transmission...
- séquençage de certains loci et comparaison entre les différentes souches

Dans un souci de santé publique, il faudra aussi déterminer pour chaque espèce et chaque sous-espèce quelles sont celles qui sont transmissibles à l'homme et celles qui sont pathogènes pour l'homme.

La classification du genre *Cryptosporidium* est donc susceptible d'être modifiée au cours du temps. Les récentes applications des techniques de biologie moléculaire à la taxonomie laissent entendre que la classification du genre *Cryptosporidium* ainsi que celle de l'espèce *Cryptosporidium parvum* sont beaucoup plus complexes que l'on pourrait l'imaginer.

Après un rappel de la biologie du parasite, la cryptosporidiose est décrite chez l'animal en insistant sur les données épidémiologiques. La prévalence ainsi que les différentes sources de contamination et profils d'excrétion sont énoncés. Un chapitre s'attache à exposer la diversité génétique à l'intérieur du genre *Cryptosporidium* afin de comprendre quelles sont les espèces impliquées dans la contamination de l'homme et de l'animal. La cryptosporidiose chez l'homme et ses modalités de contamination sont étudiées en s'arrêtant sur le rôle des animaux de compagnie, domestiques et sauvages. Enfin, la dernière partie s'attache brièvement à la maîtrise de la cryptosporidiose à travers les moyens de diagnostic et de contrôle.

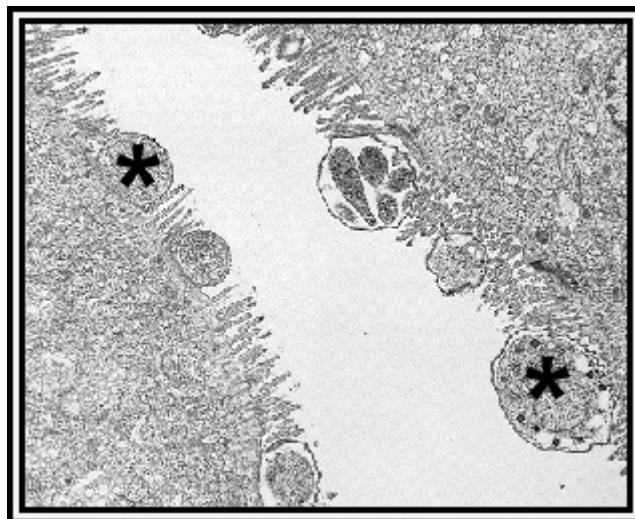
Partie 2

BIOLOGIE DU PARASITE

I. MORPHOLOGIE DU PARASITE

Le parasite a une forme sphérique à elliptique et sa taille varie de 2 à 6 µm de diamètre ce qui est relativement petit par rapport aux autres coccidies (72). Il occupe une position dans la cellule épithéliale très particulière, en zone apicale, jamais en profondeur.

Les stades du cycle intra-cellulaire apparaissent en coupe histologique sous forme de petits corps basophiles donnant à la bordure en brosse un aspect granuleux.



Photographie 1 : Photographie au microscope électronique montrant plusieurs stades - dont deux marqués par une croix - de *Cryptosporidium* dans l'épithélium intestinal d'un mouton (95)

Le stade exogène est représenté par les oocystes qui contiennent 4 sporozoïtes nus c'est à dire non contenus dans des sporocystes. Leur forme est ovoïde à elliptique. Pour *Cryptosporidium parvum*, la taille des oocystes varie de 4.5 à 5.4 µm en longueur à 4.2 à 5.0 µm en largeur avec un indice de taille (rapport longueur/largeur) variant de 1.0 à 1.3. Pour exemple, *Cryptosporidium muris* est plus grand avec une taille variant de 8.0 à 9.2 µm en longueur à 5.8 à 6.4 µm en largeur (106). Ces différences de taille sont un critère majeur dans la taxonomie pour la nomenclature des espèces.

II. CYCLE DE DEVELOPPEMENT

A. CARACTÉRISTIQUES

Les espèces du genre *Cryptosporidium* possèdent un cycle monoxène où tous les stades de développement se déroulent chez un même hôte.

Lieu : épithélium de l'intestin grêle, gastro-intestinal en général mais d'autres localisations sont possibles.

Période prépatente (durée du cycle parasitaire chez l'hôte soit durée qui s'écoule entre l'ingestion et l'excrétion des premiers oocystes) : 2 à 14 jours chez la plupart des espèces domestiques avec une moyenne de 3 à 6 jours.

Période patente (durée totale d'excrétion) : variation inter et intra espèces de quelques jours à quelques mois en fonction de l'immunocompétence de l'hôte, de l'espèce de *Cryptosporidium* en cause... Expérimentalement, lorsqu'on infecte des veaux nouveaux-nés avec *Cryptosporidium parvum*, **la durée d'excrétion s'étend de 4 à 13 jours.**

Espèces hôtes : un très grand nombre d'espèces de mammifères dont l'homme peuvent être infectées par *Cryptosporidium parvum*. Ce manque de spécificité d'hôte permet au parasite de se reproduire aisément et d'avoir une large gamme d'hôtes excréteurs potentiels à disposition.

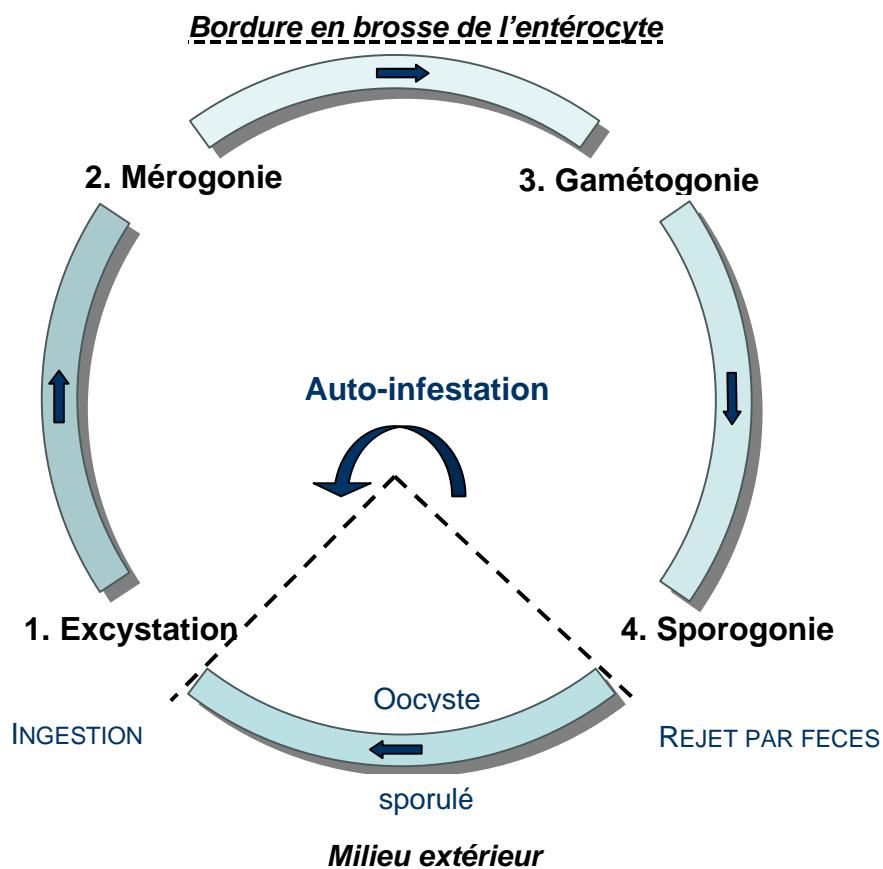


Figure 1 : Représentation schématique du cycle évolutif

B. DÉROULEMENT DU CYCLE

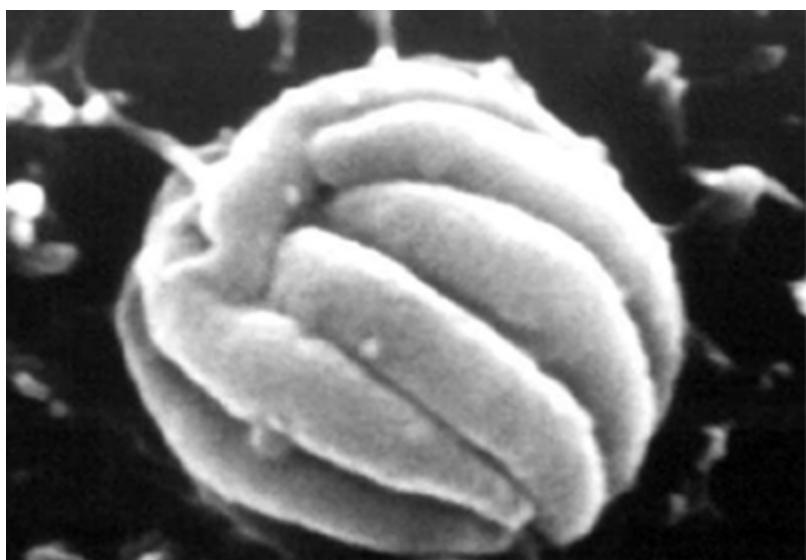
1) Excystation

Après l'ingestion, les oocystes libèrent dans le tractus digestif les sporozoïtes ; les conditions du milieu intestinal (température, enzymes, sels biliaires, milieu réducteur...) altèrent la paroi de l'oocyste qui se fend. Chaque oocyste libère 4 sporozoïtes nus. Cette excystation se fait très facilement ce qui permet au parasite d'envahir rapidement le tractus intestinal.

Les sporozoïtes s'attachent à l'épithélium de la bordure en brosse, de préférence dans la région de l'iléon où ils se transforment en trophozoïtes et s'enferment dans une vacuole parasitophore. Ils n'envahissent pas les couches profondes de la muqueuse et occupent à partir de ce moment là une position intracellulaire mais extra-cytoplasmique (*cf. plus loin*).

2) Mérogonie

La 1^{ère} génération de la reproduction asexuée ou mérogonie donne des mérontes de type I qui contiennent 8 merozoïtes. Ces merozoïtes sont libérés de la vacuole parasitophore et envahissent les cellules épithéliales voisines. Ils y évoluent alors en mérontes de type II qui contiennent 4 merozoïtes (2^{ème} génération de la reproduction asexuée) mais ils peuvent également reformer des mérontes de type I (recyclage des mérontes de type I). Ce recyclage permet d'allonger la période d'excréition.



Photographie 2 : Méronte de type I, *C. baileyi*, photo de W.L. CURRENT (25)

Ce sont les merozoïtes de 2^{ème} génération qui vont produire les gamontes.

3) Gamétogonie

Les merozoïtes de 2^{ème} génération produisent des micro-gamontes mâles et des macro-gamontes femelles qui évolueront en micro et macro gamètes. Un

micro-gamonte produit jusqu'à 16 micro-gamètes qui, une fois matures, féconderont le macro-gamète pour donner un zygote.

4) Sporogonie ou sporulation

La sporogonie se fait chez l'hôte : le zygote évolue en oocyste sporulé directement dans le tractus intestinal. Il existe deux sortes d'oocystes en fonction de l'épaisseur de leur paroi. Les oocystes à paroi épaisse sont directement éliminés avec les fèces ; ceux à paroi plus fine (environ 20 %) libèrent leurs sporozoïtes directement dans le tractus digestif et donnent lieu à une **auto-infestation** et à un nouveau cycle de développement chez le même hôte.

5) Survie dans le milieu extérieur

Dans le milieu extérieur, les oocystes excrétés déjà sporulés sont directement infectants. Ils bénéficient d'une grande résistance et survivent facilement sur de nombreux supports pendant plusieurs mois.

Les oocystes de *Cryptosporidium parvum* résistent pendant 6 mois à une température de 20°C et conservent leur potentiel infectant. Une augmentation de la température altère leur viabilité : à 30°C, ils ne résistent que pendant 3 mois. Portés à une température de 71,7°C pendant 5 secondes, ils sont tués (31).

A -20°C, quelques oocystes sont encore infectants au-delà de 8 heures mais aucun ne survit au delà de 24 heures.

Des oocystes gelés et conservés à -10°C pendant une semaine sont toujours infectants. Ils peuvent donc survivre dans l'eau même à basse température mais pas dans les chauffe-eaux des habitations.

La dessiccation permet de tuer les oocystes : 100 % des oocystes sont inactivés au bout de 4 heures.

La figure 2 représente le déroulement du cycle biologique de *Cryptosporidium parvum*.

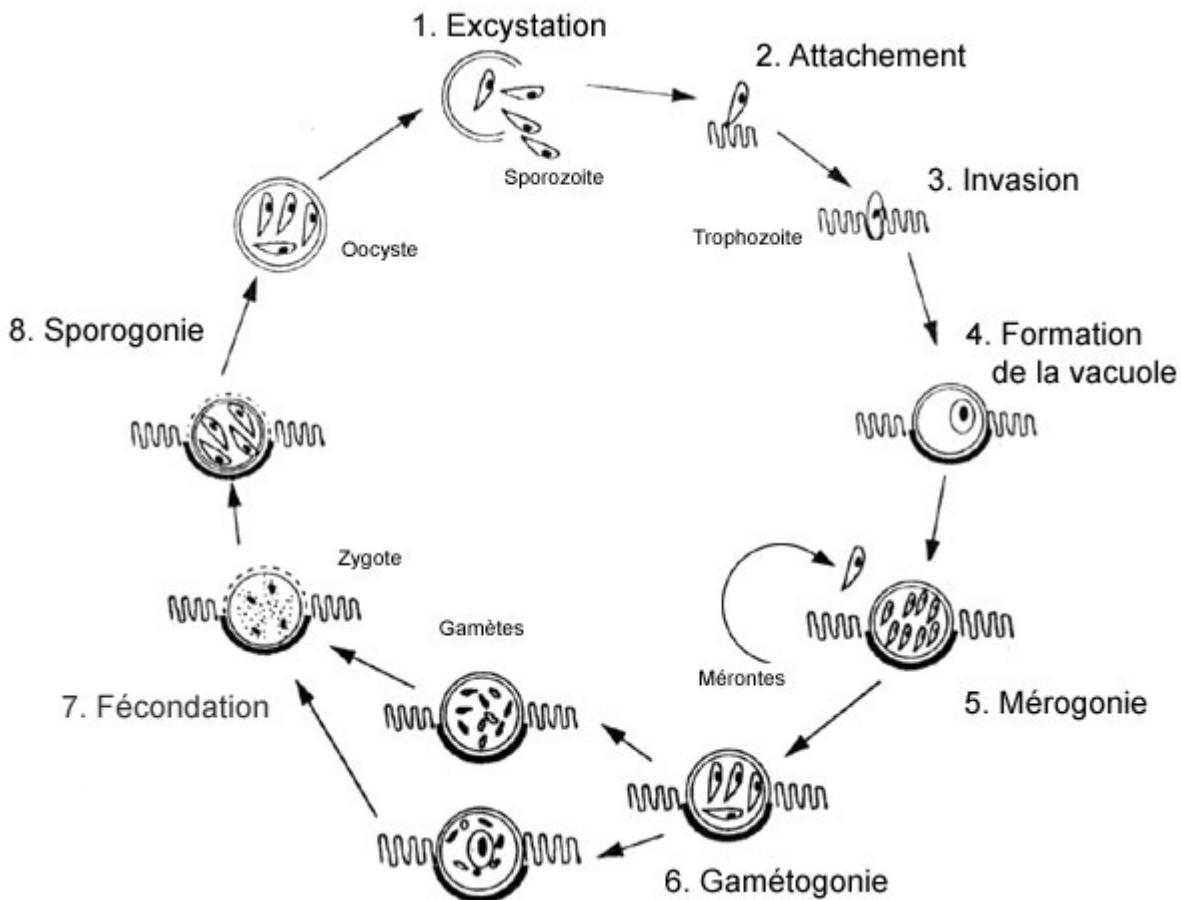


Figure 2 : Cycle biologique de *Cryptosporidium parvum* d'après Ward et Cevallos (98)

Capable d'infester un grand nombre d'espèces différentes et de se reproduire rapidement, *Cryptosporidium* possède donc une forte aptitude à se disséminer.

C. PARTICULARITES DU CYCLE

Semblable par certains points aux autres entérococcidies des mammifères, *Cryptosporidium* possède des particularités qui font de lui un genre unique.

La présence d'**auto-infestation** à partir du recyclage des mérontes de type I et des oocystes à paroi fine peut conduire à des maladies chroniques avec réinfection continue en dehors de tout contact avec des oocystes exogènes. Cette particularité a des conséquences graves car elle allonge considérablement la période d'excrétion et l'intensité des symptômes qui peuvent durer plusieurs mois et conduire à la mort.

La faible période prépatente et les modalités d'auto-infestation permettent une colonisation très rapide de tout le tractus digestif. L'infestation s'étend ainsi très souvent depuis l'iléon au duodénum et au gros intestin. Chez les individus immunodéprimés, l'estomac, les canaux biliaires et pancréatiques et le tractus respiratoire peuvent également être infestés.

III. POSITION DANS LA CELLULE

La position qu'occupe le genre *Cryptosporidium* dans la cellule est absolument unique (97) : le parasite est en **position intracellulaire mais extra cytoplasmique**. Aucun autre organisme ne se crée une telle place à l'abri du milieu intestinal hostile, de la réponse immunitaire et du cytoplasme de l'hôte. Comme les autres coccidies, le genre *Cryptosporidium* est situé dans une vacuole parasitophore, entourée d'une membrane parasitophore. Cette membrane, bien qu'ayant une perméabilité sélective, est un obstacle à la prise directe des nutriments dans le cytoplasme. Mais différemment des autres coccidies, *Cryptosporidium* n'est qu'en partie entouré par cette membrane parasitophore et prélève la quasi-totalité de ses nutriments par une structure unique : **l'organe de nutrition**.

A. FORMATION DE L'ORGANE DE NUTRITION

Les étapes de l'invasion de la cellule hôte et de la formation de l'organe de nutrition méritent d'être précisées : dès que le zoïte entre en contact avec la cellule épithéliale du tube digestif, il se forme dans le cytoplasme de la cellule hôte une couche de trois bandes, d'aspect dense en microscopie électronique, qui s'étend d'un bord à l'autre de la cellule. Ainsi, le cytoplasme de la cellule est précocement divisé en deux parties nettement distinctes.

Ensuite, vraisemblablement suite à la libération du contenu des rhoptries et micronèmes, le parasite est englobé par des prolongements de la membrane apicale de l'hôte. Ces sortes de microvillosités s'élèvent autour du zoïte et forment la membrane de la vacuole parasitophore. Cette membrane a donc pour origine la cellule épithéliale de l'hôte.

Après cette décharge du contenu des organites, une vacuole apparaît dans la partie antérieure du parasite. La membrane de l'apex du parasite fusionne avec la membrane de l'hôte puis la membrane de la vacuole fusionne avec cette membrane commune à l'hôte et au zoïte.

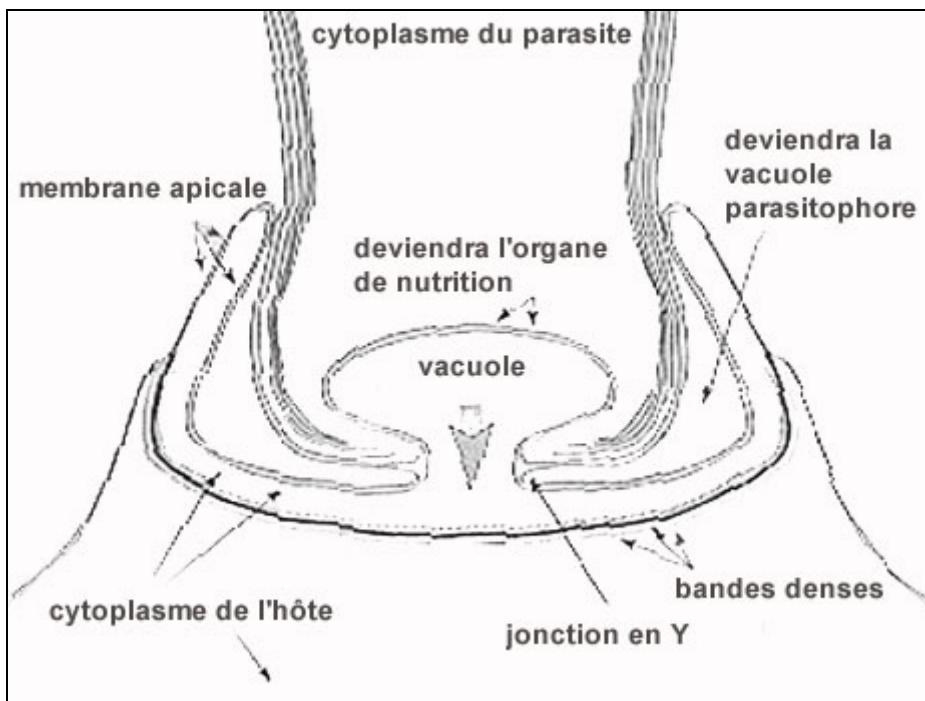


Figure 3 : Invasion du parasite d'après (97)

L'organe de nutrition est formé et son origine est double : il dérive à la fois du parasite et de l'hôte. Ainsi le cytoplasme de l'hôte n'est séparé de celui du parasite que par cet organe de nutrition. La jonction des membranes de l'organe de nutrition, de la vacuole parasitophore et de la membrane externe du zoïte forme une jonction en Y au niveau de laquelle se trouve une structure en anneau très électron-dense. Elle représente le lieu de fusion entre la membrane de la vacuole parasitophore qui vient de l'hôte et la membrane du parasite et apparaît donc comme la limite de l'organe de nutrition.

B. ROLE DE L'ORGANE DE NUTRITION

Certains éléments structuraux suggèrent que l'organe de nutrition remplit la quasi-totalité des fonctions de nutrition aux dépens de la membrane de la vacuole parasitophore. En effet, le cytoplasme du parasite est au contact direct avec celui de l'hôte à travers l'organe de nutrition. L'accès aux nutriments est donc direct. De plus, lors de sa formation, l'organe de nutrition augmente considérablement sa surface en se plissant ce qui est en faveur d'un rôle de transport de l'organe. Enfin, l'analyse de la densité en particules intra-membranaires montre que l'organe de nutrition est riche en ces particules contrairement à la membrane de la vacuole parasitophore. Ces particules pourraient servir de transporteurs intra-membranaires entre les deux cytoplasmes. La présence de vésicules, semblables à des vésicules de Golgi, au dessus de l'organe de nutrition est un élément de plus en faveur du rôle de transport de cet organe.



Photographie 3 : Organe de nutrition, *C. parvum*, photo à microscopie à balayage de S.J. UPTON (25)



Photographie 4 : Portion basale de l'organe de nutrition, *C. baileyi*, photo de W.L. CURRENT (25)

***Cryptosporidium* sp. possède donc une localisation cellulaire tout à fait unique.**

Du côté apical, une fine couche de cytoplasme sépare la membrane de l'hôte de la membrane de la vacuole parasitophore. La membrane de la vacuole parasitophore ne semble jouer qu'un très petit rôle dans le transport des nutriments.

Du côté basal, le parasite est séparé du cytoplasme de l'hôte par l'organe de nutrition qui semble assurer toutes les fonctions de transport. Sous l'organe de nutrition, le cytoplasme de l'hôte est séparé en deux zones par la couche de bandes denses.

Cette localisation très protégée est peut être une explication à la large résistance au traitement de *Cryptosporidium* sp. L'organe de nutrition pourrait bloquer l'entrée dans le parasite de molécules intracellulaires à visée thérapeutique. A l'abri dans sa loge extra-cytoplasmique, le parasite pourrait ainsi résister à l'action de molécules à activité intracellulaire (35, 97).



Partie 3

CRYPTOSPORIDIOSE ANIMALE

I. POPULATION ATTEINTE

L'infection par des parasites du genre *Cryptosporidium* a été décrite chez 79 espèces de mammifères, 30 espèces d'oiseaux, 57 espèces de reptiles et 9 espèces de poissons (72). Ce très grand nombre d'espèces différentes montre la très faible spécificité d'hôte du genre *Cryptosporidium*.

Chez les mammifères, l'infection a été décrite chez des espèces domestiques et sauvages (dans leur milieu naturel ou en captivité). Les jeunes animaux sont plus fréquemment atteints chez les Mammifères et les Oiseaux. Chez les serpents, l'infection concerne davantage les animaux adultes.

II. CLINIQUE

A. CLINIQUE CHEZ LES RUMINANTS

1) Etiologie

La présence du genre *Cryptosporidium* est pour la première fois décrite chez les ruminants dans les années 1970 et son rôle pathogène confirmé dans les années 1980. C'est le groupe d'espèces parmi les Mammifères le plus concerné par la cryptosporidiose avec l'espèce humaine.

Certains auteurs (31, 47), considèrent que le parasite du genre *Cryptosporidium* présent dans la caillette des ruminants est une espèce différente et proposent le nom de *Cryptosporidium andersoni*. Cette espèce est peu fréquente et n'est pas responsable de signes cliniques. Chez les bovins chroniquement parasités, *C. muris* est responsable d'une diminution de la production laitière.

La plupart des cas cliniques de cryptosporidiose chez les ruminants sont dus à *Cryptosporidium parvum*.

2) Symptômes

La maladie s'exprime cliniquement essentiellement chez les animaux nouveaux-nés. Les veaux peuvent être contaminés juste après la naissance. S'ils demeurent artificiellement en dehors de tout contact avec le parasite (23), ils seront, avec l'âge, toujours sensibles à l'infection mais les signes cliniques seront

moins sévères. Chez l'adulte, le développement du parasite ne s'accompagne généralement pas de symptômes.

La principale manifestation clinique est une **diarrhée aqueuse profuse**, de couleur jaune pâle et ayant une odeur désagréable (72). Elle est précédée d'une phase d'abattement et d'anorexie. Cette diarrhée s'accompagne de l'excrétion d'oocystes. Elle débute 3 à 5 jours après l'infection (23). Chez les petits ruminants, elle dure en moyenne 3 à 5 jours. Chez les veaux, on observe une grande variabilité dans la durée et l'intensité de cette diarrhée. Ainsi, en réduisant expérimentalement l'influence des facteurs extérieurs, en utilisant une souche unique de *Cryptosporidium parvum*, un même nombre d'oocystes inoculés, avec des veaux du même âge, provenant du même élevage... la diarrhée dure selon les individus de 4 à 17 jours. La sévérité de la diarrhée varie aussi grandement allant de bouses peu formées à une diarrhée aqueuse pratiquement translucide. Cette grande variabilité dans l'expression clinique, même dans des conditions identiques, s'explique par une variabilité de la réponse individuelle de l'hôte face à la cryptosporidiose. Ceci suggère l'importance du statut immunitaire de l'hôte dans la résistance à cette maladie.

D'autres signes cliniques non spécifiques s'observent comme de l'anorexie, de la déshydratation consécutive à la diarrhée, une perte de poids et une baisse de l'état général avec abattement, poil piqué, hyperthermie. Cela se traduit par un retard de croissance pendant les premiers jours de vie de l'animal. Un agneau naturellement infecté par *Cryptosporidium parvum* pèsera, à l'âge d'un mois, 2 kilogrammes de moins qu'un agneau sain du même âge.

Pratiquement tous les animaux souffrent de diarrhée mais la plupart se rétablissent en une à deux semaines. En général, ils n'ont pas besoin de traitement et les pertes ne dépassent pas 2 % du troupeau (4). Ces pertes peuvent être plus lourdes (jusqu'à 30 % de mortalité) surtout lors d'hivers rigoureux et lorsque la maladie coïncide avec une infection à rotavirus ou coronavirus (66).

3) Modèle expérimental d'infection

Expérimentalement, lorsqu'on fait ingérer à des veaux âgés de 1 à 3 jours une suspension contenant 1,5 million d'oocystes (29), la période prépatente est courte et varie de 3 à 6 jours. La période patente ou durée totale d'excrétion s'étend de 6 à 9 jours mais certains animaux peuvent doubler la durée de leur période d'excrétion. Plus cette infection est précoce dans la vie de l'animal, plus la période prépatente sera courte et plus la durée totale de l'excrétion sera longue (66). L'excrétion atteint son pic d'intensité entre le 6^{ème} et le 8^{ème} jours après l'infection.

Les signes cliniques commencent par une perte d'appétit puis une diarrhée aqueuse qui débute au 4^{ème} jour après infection. Elle peut durer de 4 à 17 jours et généralement, lors d'infection expérimentale, 10 à 20 % des individus ne sont pas atteints.

Le nombre d'oocystes excrétés varie selon les auteurs et la méthode de diagnostic utilisée. Dans les conditions expérimentales, l'excrétion d'oocystes varie de 2×10^5 à 4×10^7 oocystes/gramme de fèces selon les quantités d'oocystes inoculées au départ et la période d'excrétion (3, 29). Dans les conditions

naturelles, l'excrétion totale sur toute la période de la maladie peut atteindre 2.5×10^{10} oocystes (7).

4) Lésions

Les lésions macroscopiques sont peu spécifiques : le contenu de l'intestin est liquide, parfois des signes d'entérite, de distension gazeuse ou de congestion de la muqueuse sont présents. La lumière intestinale est envahie par une grande quantité de liquide et le colon est incapable de réabsorber tout ce liquide. La destruction des micro-villosités entraîne une réduction de la surface intestinale et donc une malabsorption et l'altération des enzymes de l'épithélium intestinal entraîne une maldigestion.

Microscopiquement, on observe une légère atrophie des villosités, une hyperplasie des cryptes et des points de nécrose de la muqueuse intestinale. On note une augmentation significative, lors de la première infection, du nombre de lymphocytes T CD4+ et CD8+ dans la population lymphocytaire intraépithéliale, dans la *lamina propria* et dans les plaques de Peyer de l'iléon (1).

B. CLINIQUE CHEZ LES AUTRES MAMMIFERES

Chez les chats et chiens adultes, la maladie est en général asymptomatique. Les signes cliniques apparaissent uniquement chez les animaux immunodéprimés (co-infection avec le virus leucémogène félin...) ou lorsqu'il y a une infection concomitante avec un autre agent intestinal. Ces signes comprennent une diarrhée persistante, une perte de poids, et une anorexie chronique. Chez des nouveaux-nés en bonne santé, l'infection expérimentale provoque l'excrétion d'oocystes mais pas de signes cliniques (10).

Chez le cheval, la cryptosporidiose est décrite pour la 1^{ère} fois en 1978 chez un poulain Arabe souffrant d'une immunodépression sévère. Plus tard, des cas de cryptosporidiose sont reportés chez des poulains avec un système immunitaire apparemment normal. *Cryptosporidium parvum* constitue un agent important de diarrhée non bactérienne chez le poulain. La prévalence de l'excrétion d'oocystes dans les matières fécales est tout de même assez faible et les taux les plus élevés se retrouvent chez les poulains (4,3 à 22,9 %). Le rôle exact des chevaux dans la contamination du milieu extérieur est inconnu (20).

Chez le porc, l'infection cryptosporidique survient entre l'âge de 6 à 12 semaines et est, en général, asymptomatique. Lorsqu'ils surviennent, les signes cliniques entraînent des pertes économiques mais sont fréquemment à relier à la co-infection par d'autres pathogènes comme *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Isospora suis* ou des adénovirus.

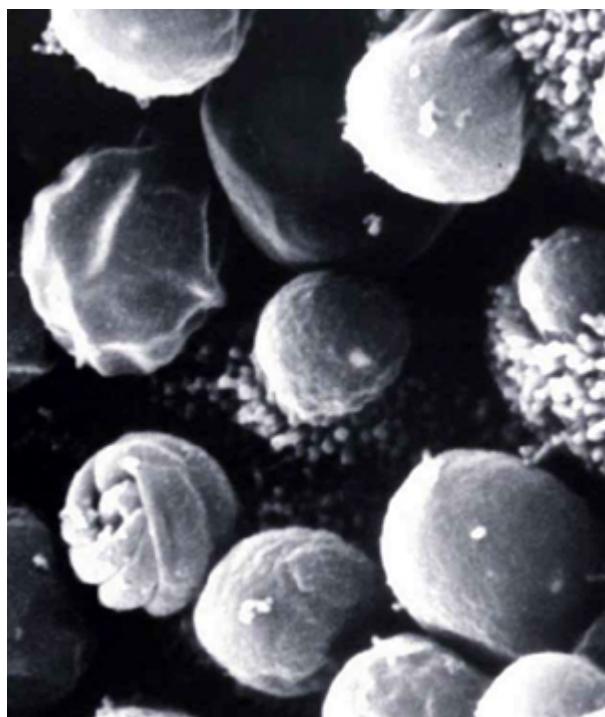
Cryptosporidium parvum est présent naturellement chez un grand nombre de mammifères et la majorité de ces espèces sont des espèces sauvages. La cryptosporidiose est répertoriée chez de nombreuses espèces de cerfs, antilopes, gazelles, chameaux, souris, rats, castors, écureuils... Les animaux sauvages contribuent à la pérennité de l'infection chez les autres mammifères et à la propagation du parasite dans l'environnement. Cependant on sait peu de chose sur la prévalence de la cryptosporidiose chez ces espèces. Des cerfs seraient

apparemment excréteurs asymptomatiques tout au long de l'année avec un pic d'excrétion au moment du part (89). Chez toutes ces espèces, les symptômes comprennent diarrhée, déshydratation et peuvent conduire à la mort.

C. CLINIQUE CHEZ LES OISEAUX

La cryptosporidiose est répertoriée chez plus de 30 espèces d'oiseaux différentes. Elle n'est pas due à *Cryptosporidium parvum* mais à *Cryptosporidium meleagridis* et à *Cryptosporidium baileyi*. On suspecte l'existence de deux autres espèces chez la caille et chez l'autruche mais la validité de ces espèces n'est pas encore établie. Le plus souvent, la cryptosporidiose aviaire est causée par *Cryptosporidium baileyi* qui infecte le tractus intestinal et respiratoire des dindes, poulets et canards et qui provoque des signes cliniques essentiellement respiratoires. La clinique est plus sévère chez les jeunes et lors de co-infection avec d'autres agents pathogènes respiratoires. La cryptosporidiose aviaire est aujourd'hui reconnue comme une maladie de premier ordre entraînant d'importantes pertes économiques dans les élevages.

La photographie 5 illustre une infection massive par *Cryptosporidium baileyi*.



Photographie 5 : Infection par *C. baileyi*, photo de W.L. CURRENT (25)

D. CLINIQUE CHEZ LES REPTILES

La cryptosporidiose a été répertoriée chez plus de 57 espèces différentes de reptiles : 40 espèces de serpents, 15 espèces de lézards et 2 espèces de tortues (60). *Cryptosporidium serpentis* est la principale espèce ; elle se localise à l'estomac et provoque des gastrites chroniques chez les adultes. Chez les serpents, l'infection persiste longtemps et une excrétion intermittente peut

s'observer pendant plusieurs mois (72). On suppose l'existence d'autres espèces notamment *C. saurophilum* chez les lézards mais la situation taxonomique exacte de cette espèce n'est pas claire. Les reptiles peuvent également héberger l'espèce de *Cryptosporidium* présente chez la proie qu'ils ont ingérée.

III. PREVALENCE

On s'intéressera essentiellement aux ruminants à cause de la très large diffusion de ce parasite dans ce groupe d'espèces et de leur proximité avec l'homme.

La prévalence représente le pourcentage d'animaux infectés par *Cryptosporidium parvum* dans une population donnée à un instant donné.

Cette estimation peut varier en fonction de la population de départ, de son âge, de ses conditions de vie, des techniques de détection des individus atteints ou bien encore du lieu de l'étude. Il est donc difficile de donner un chiffre brut pour évaluer la prévalence de la maladie chez les ruminants. Plutôt que de prévalence de la maladie, il vaut mieux parler de prévalence d'excrétion car la plupart des études se basent sur la mesure du nombre d'animaux excréteurs indépendamment de leur statut clinique et non pas sur le nombre d'animaux malades. Cette prévalence d'excrétion varie de 10 à 90 %.

A. VARIATION EN FONCTION DE L'AGE

Il s'agit du facteur le plus important : la cryptosporidiose est une maladie du jeune.

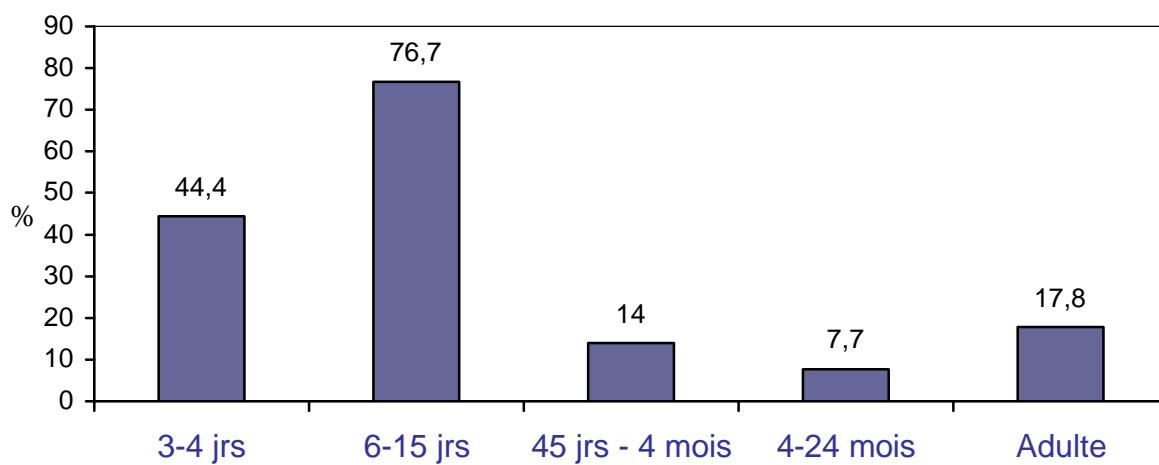


Figure 4 : Répartition de la prévalence en fonction de l'âge chez des veaux en Espagne (23)

C'est entre 6 et 15 jours d'âge que l'on a le plus grand nombre d'animaux excréteurs d'oocystes (76,7 %). Seuls les animaux avant le sevrage ont des signes cliniques de diarrhée.

Dans une étude (5) ayant pour objectif de mesurer l'excrétion d'oocystes dans un troupeau californien, il a été montré que l'âge était le facteur de risque d'excrétion le plus significatif : ainsi, la probabilité d'excréter est 41 fois plus grande dans une population de veaux de 2 mois que dans une population de veaux de plus de 4 mois.

B. VARIATION EN FONCTION DU TYPE D'ELEVAGE

Chez les bovins, on observe des différences de prévalence en fonction des conditions d'élevage des veaux.

Dans l'étude suivante, les veaux proviennent d'élevages de races à viande ou d'élevages de races laitières. L'âge indiqué est l'âge au jour d'inclusion dans l'étude soit J0. Le nombre de veaux contaminés par *Cryptosporidium parvum* est indiqué en pourcentage au 1^{er} jour de l'étude, au 7^{ème} et au 14^{ème} jour.

	AGE	CONDITIONS	PREVALENCE
Elevage allaitant	4 à 10 jours	En contact avec leurs mères, nourris par la mère, pas de diarrhée ou diarrhée depuis moins de 24 heures, bon état général au jour de l'inclusion.	50 % à J0 86 % à J7 28 % à J14
Elevage laitier	8 à 15 jours	En box individuels, permettant un contact nez à nez, nourris au lait artificiel, pas de diarrhée ou diarrhée depuis moins de 24 heures, bon état général au jour de l'inclusion.	16,8 % à J0 52 % à J7 32 % à J14

Tableau 3 : Comparaison de la prévalence de la cryptosporidiose en France en fonction du type d'élevage (67)

Dans les deux groupes, c'est au 7^{ème} jour de l'étude que le pic d'excrétion est atteint. C'est dans les ateliers d'engraissement et les élevages allaitants que la prévalence de la cryptosporidiose est la plus élevée. Les veaux sont élevés sous la mère et la transmission est facilitée par les nombreux contacts entre animaux : d'un veau à l'autre directement quand les animaux sont en stabulation libre ou d'une mère à son veau par des pis souillés, par des fèces contaminées par exemple. L'infection peut se faire par la mamelle (66). Dans les élevages laitiers, les veaux sont très peu en contact avec leurs mères et avec les autres veaux ; ainsi, le risque de contamination est réduit. Dans les unités d'engraissement, le mélange d'animaux qui transitent entre élevages et marchés fait grimper le taux de prévalence qui atteint quasiment les 100 % (23). Plus que le type d'élevage ou la race bovine, c'est le fait d'élever des animaux d'âge et de statut immunitaire différents au contact direct les uns des autres qui fait augmenter la prévalence de la maladie. De plus, les veaux restants sous la mère ne bénéficient d'aucune protection supplémentaire car le colostrum n'apporte aucune protection contre le parasite.

Aux Etats-Unis (5), on note une différence entre les veaux de race laitière chez qui l'excrétion est précoce et groupée et les veaux de race à viande chez qui l'excrétion s'étale dans le temps et sur des individus d'âge différents. Ceci est en faveur d'une exposition dès la naissance à un réservoir suffisamment conséquent

pour contaminer tous les veaux simultanément dans le 1^{er} groupe et d'une contamination d'un veau à l'autre dans le 2^{ème} groupe.

C. VARIATION EN FONCTION DU STATUT CLINIQUE

Le nombre d'individus infectés par *Cryptosporidium parvum* est plus élevé au sein d'une population diarrhéique. Comme le montre le tableau suivant, la prévalence d'excrétion est plus élevée chez des animaux ayant des symptômes cliniques de diarrhée.

ORIGINE	CLINIQUE	PREVALENCE
Veaux laitiers	5,2 % ont des signes de diarrhée.	17,9 %
Mélange de veaux d'origine laitière et bouchère	90,5 % présentent de la diarrhée (la moitié depuis plus de 24 heures et avec signes de déshydratation)	43,4 %

Tableau 4 : Prévalence d'excrétion en fonction du statut clinique chez des veaux (46)

D. VARIATION EN FONCTION DU PAYS

Selon les pays l'estimation de la prévalence est variable ; ainsi, 39 % des veaux sont contaminés en Hollande, 44 % en Allemagne, 82,7 % en Espagne (29). En France, on trouve des veaux excrétant le parasite dans toutes les régions d'élevages (46). Aux Etats-Unis, une grande proportion des troupeaux laitiers est infectée (7) et 10 à 60 % des veaux excrètent *Cryptosporidium parvum*. En Californie (5), on note des prévalences beaucoup plus basses que celles rencontrées en Europe ou au Canada : une faible densité animale, la sensibilité des oocystes à la dessiccation et la faible pluviosité de la région permettent d'expliquer ces résultats.

E. AUTRES FACTEURS DE VARIATION

De nombreux facteurs font varier l'estimation de la prévalence de la cryptosporidiose. Ainsi, dans la catégorie d'animaux les plus atteints que sont les veaux avant le sevrage, lorsque l'on réalise deux analyses par semaine, dès 3 jours d'âge, pendant un mois, on a une prévalence de 93 %. Quand on ne réalise que une ou deux analyses pendant toute la période de présevrage, la prévalence n'est plus que de 22 % (29). L'excrétion des oocystes étant intermittente, un faible nombre de mesures pendant la période de présevrage conduit forcément à une sous estimation de la prévalence (46). Il en va de même pour la sensibilité de la technique de détection des oocystes utilisée. Lors d'une étude en Ecosse visant à mesurer le niveau d'excrétion chez les adultes, le nombre d'animaux excréteurs passe de 61% pour un examen direct des fèces au microscope à 92 % après une technique de concentration par flottaison. La limite de détection des méthodes de diagnostic doit être très basse si on ne veut pas sous-évaluer le rôle joué par certains acteurs de la transmission de la maladie.

IV. IMPORTANCE

Le syndrome de diarrhée néonatale est une des causes les plus fréquentes de mortalité et de pertes économiques aussi bien chez les agneaux et chevreaux que chez les veaux. Il s'agit d'un ensemble de maladies non distinguables les unes des autres cliniquement et qui sont dues à des virus, des bactéries ou des parasites. L'impossibilité de réaliser un diagnostic étiologique rapide pose un réel problème pour la mise en place du traitement qui se réduit souvent à un traitement symptomatique. Généralement (23), on considère qu'avant l'âge de 3 jours, les symptômes sont à relier à des bactéries dont les plus courantes sont les ETEC (*Escherichia coli* entérotoxinogènes) ; entre l'âge de 4 jours et celui de 6 semaines, virus et *Cryptosporidium parvum* sont les plus fréquents ; ensuite, on retrouve d'autres pathovars d'*Escherichia coli* provoquant des lésions d'attachement et d'effacement des microvillosités intestinales.

Une synergie pourrait avoir lieu entre ces agents et *C. parvum* aboutissant à une intensification et une prolongation des symptômes (72).

La persistance de ce syndrome malgré l'utilisation de vaccins contre certains virus et bactéries impose de mieux définir la place qu'occupent les autres agents de ce syndrome et notamment *Cryptosporidium parvum*.

A. EVOLUTION DE L'IMPORTANCE DE *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*

La figure 5 représente l'évolution de l'importance des principaux agents pathogènes chez des veaux diarrhéiques. Entre juillet 1982 et juin 1983, *Cryptosporidium parvum* représentait seulement 6,7 % des agents responsables de diarrhée alors que dix ans plus tard, il est présent dans presque 40 % des cas : seul dans 30,7 % des cas et en association avec une infection virale dans 8,9 % des cas. Cette différence très significative est sans doute à nuancer par le fait qu'il y a une vingtaine d'années, *Cryptosporidium parvum* était peu recherché comme agent pathogène responsable de diarrhée chez les veaux.

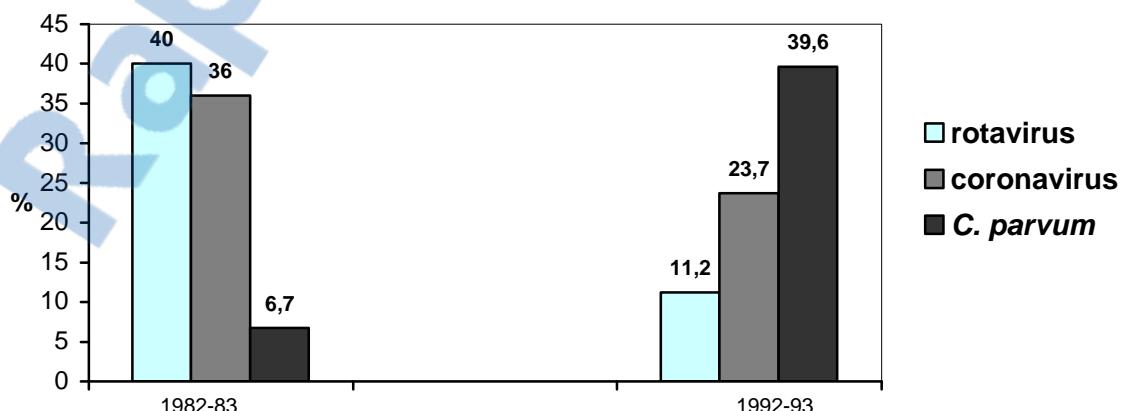


Figure 5 : Evolution de l'importance de *Cryptosporidium parvum* chez les veaux diarrhéiques entre 1982 et 1993 (23)

Cryptosporidium parvum n'est donc pas seulement un agent secondaire de diarrhée néonatale. **Il est fréquemment isolé seul et possède un véritable pouvoir pathogène.** Dans une étude sur des veaux porteurs de *Cryptosporidium parvum*, cet agent a été isolé seul dans 68,2 % des cas (21).

B. IMPORTANCE EN FONCTION DU SYSTEME D'ELEVAGE

La figure 6 reprend les données du tableau 3 : les veaux proviennent d'élevages de races à viande ou d'élevages de races laitières ; J0 est le jour du début de l'étude ; les veaux ont entre 4 et 15 jours à J0.

Lorsqu'on compare deux systèmes d'élevages, quelque soit le statut clinique de l'animal, *Cryptosporidium parvum* occupe la 1ère place parmi les agents pathogènes suivants (67) :

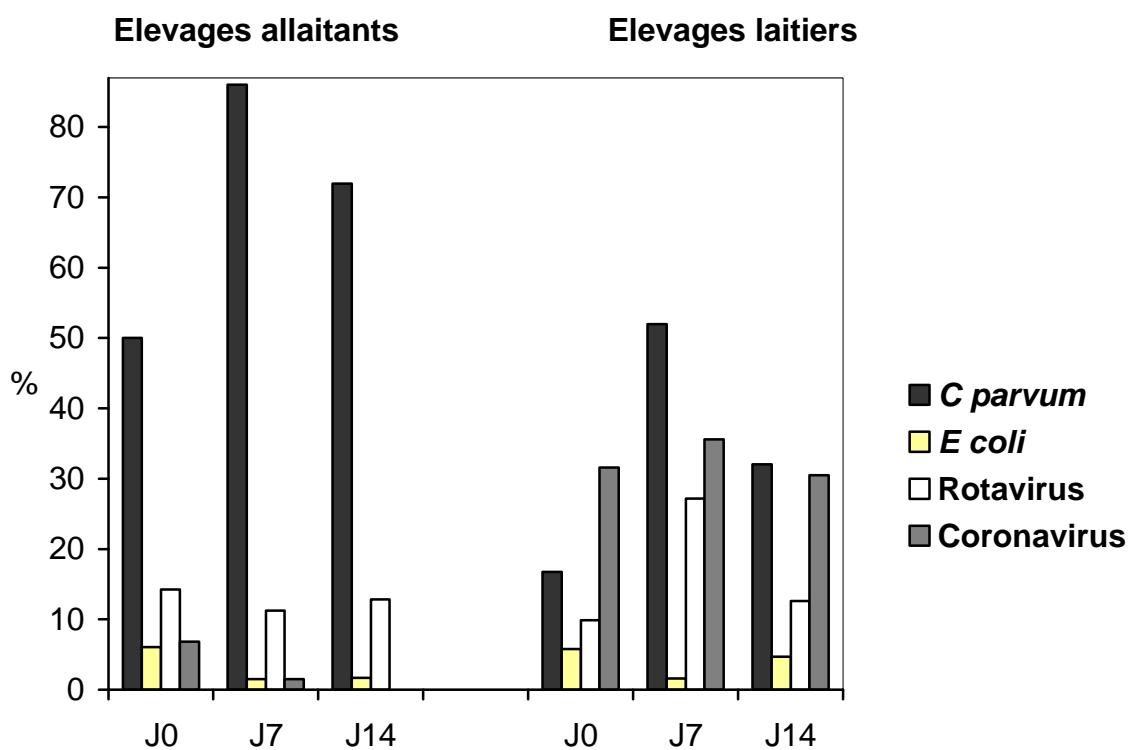


Figure 6 : Comparaison en fonction du système d'élevage

Dans les deux systèmes d'élevages, *Cryptosporidium parvum* est le plus représenté des agents pathogènes étudiés. La prévalence des autres agents entéropathogènes est stable au cours de la période analysée qui représente globalement le 1^{er} mois de vie. Son rôle est majeur principalement chez les veaux élevés sous la mère où le rôle des autres agents est minime : la présence du parasite est associée à une forte probabilité de diarrhée puisque à J0, 71 % des veaux diarrhéiques excrètent *Cryptosporidium parvum*. De plus, la détérioration de l'état clinique de ces veaux (déshydratation, perte d'appétit) à J3 et J7 est à imputer principalement à *Cryptosporidium parvum* puisque les autres entéropathogènes restent stables.

V. EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE

A. SOURCES

Les sources potentielles sont multiples et pas toutes connues d'où la difficulté de lutter contre le parasite mais **la principale source est constituée par les matières fécales disséminées dans le milieu extérieur.**

1) Les jeunes animaux du troupeau

La principale source est bien sûr représentée par les fèces des autres animaux de l'élevage : en premier lieu, les nouveau-nés. Que ce soit veaux, chevreaux ou agneaux, l'excrétion d'oocystes dans les premières semaines de vie est considérable et le milieu est très vite fortement contaminé. La contamination est très aisée pour un animal nouveau-né à partir des fèces de ses voisins du même âge. Cette contamination se fait encore plus facilement dans les troupeaux où la densité animale est élevée et où les contacts entre animaux sont nombreux. A la fin de la saison de vêlage, la contamination du milieu est très importante.

2) Les mères

Les mères jouent aussi un rôle dans la contamination du milieu mais leur importance est sujette à controverse. Elles représentent une source insidieuse : elles sont excrétrices d'oocystes en l'absence de symptômes.

Cette excrétion a été quantifiée : en Europe (7), 60 à 70 % des adultes sont excréteurs et bien que le niveau d'excrétion soit faible, il est suffisant pour contaminer un nouveau-né : une vache rejette 900 oocystes par gramme de fèces et 30 à 40 kg de fèces par jour (66) soit un nombre d'oocystes excrétés par jour de l'ordre de $2 \text{ à } 3 \times 10^7$ par adulte. Or, une centaine d'oocystes suffisent pour infecter un veau donc les adultes peuvent être à l'origine de la contamination des jeunes.

Atwill et ses collaborateurs (7) ont cherché à savoir si les vaches représentaient une source d'infection importante pour leurs veaux dans un élevage laitier de race Holstein aux Etats-Unis. Ses résultats sont en contradiction avec ceux obtenus en Europe : bien que 92 % des veaux âgés de 7 à 21 jours soient infectés, aucune des mères n'excrète d'oocystes de *Cryptosporidium parvum* autour du vêlage (± 21 jours autour de la mise-bas). Cependant, la méthode de détection utilisée par l'auteur (immunofluorescence directe) n'est probablement pas assez sensible pour mettre en évidence l'excrétion des mères.

En Ecosse, une étude épidémiologique donne des résultats assez différents (86). L'excrétion d'oocystes est étudiée sur plus de 500 adultes bovins en bonne santé, âgés de plus de 1 an et appartenant à deux troupeaux différents. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 5. L'excrétion des jeunes n'est pas prise en compte.

	Conditions	Prévalence d'excrétion
Troupeau 1	Diarrhée cryptosporidique diagnostiquée chez plus de 80 % des veaux durant les 5 dernières années	61.3 %
Troupeau 2	Pas d'antécédents récents de cryptosporidiose	66.4 %

Tableau 5 : Excrétion d'oocystes chez des bovins adultes d'après (86)

Cet exemple montre un très haut niveau d'excrétion chez les adultes puisque la prévalence moyenne d'excrétion est de **62,4 %**. Cette prévalence est encore plus élevée si on augmente la sensibilité de la technique par concentration. Des études sérologiques de recherche d'anticorps spécifiques sur ces animaux montrent un très fort taux de contact avec l'antigène *Cryptosporidium parvum* puisque plus de 90 % des animaux sont séropositifs et ce quelque soit le type d'immunoglobulines recherchées (Ig G, Ig G₁, Ig G₂, Ig M).

Le rôle des mères en tant que réservoir du parasite est évident lorsque les techniques de détection utilisées sont assez sensibles.

Il n'y a pas de différence notable de prévalence chez les ruminants adultes entre le troupeau où les veaux sont malades et celui où ils ne le sont pas. Ceci prouve que **la présence des adultes n'est pas indispensable au développement de la maladie clinique chez les jeunes**.

L'excrétion quasi-systématique et asymptomatique des adultes doit contribuer à la pérennisation de l'infection d'une année sur l'autre en permettant la contamination des jeunes en début de saison de mise-bas quand le milieu est encore peu contaminé. Ce portage contribue également à la contamination de l'environnement et particulièrement des eaux de manière insidieuse et continue.

3) Animaux sauvages, rongeurs...

On ne connaît pas très bien le rôle joué par la faune sauvage (rongeurs, cervidés...) dans la contamination des autres animaux. Elle est sans doute minime face à l'importante source que représentent les fèces des ruminants, jeunes ou adultes, dans la contamination d'un élevage par exemple.

Etant donné que l'espèce *C. parvum* qui infecte le bétail est très largement répandue et ne présente pas une grande spécificité d'hôte, tous les animaux porteurs de ce parasite peuvent théoriquement être à l'origine d'une contamination d'un élevage. De tels cas ne sont pas décrits car il est impossible de connaître la source exacte d'une contamination : le parasite impliqué chez les deux espèces est en général identique.

4) Eau

De très nombreux cas sont décrits chez l'homme de cryptosporidiose d'origine hydrique. Ces cas concernent un grand nombre de personnes et la contamination de l'eau est due à une erreur dans le traitement de l'eau du robinet ou à un déversement accidentel de déchets animaux ou d'eaux d'égouts dans le

circuit d'eau potable. On peut très bien imaginer qu'une telle eau alimentant un élevage puisse conduire à la contamination d'animaux mais on ne connaît pas l'importance de cette voie de contamination.

Un élevage laitier aux Etats-Unis (7) montre un exemple original de contamination par l'eau : les oocystes contenus dans l'eau sont déposés sur les murs et le sol des bâtiments de l'élevage lors du lavage sous pression de ces bâtiments. C'est un aérosol d'eau contaminée qui a servi au nettoyage ; l'eau a été contaminée en passant sous les bâtiments des veaux âgés, avant de servir à la désinfection des boxes des plus jeunes.

B. FACTEURS DE RECEPΤIVITE ET DE SENSIBILITE

1) Espèce

La cryptosporidiose se rencontre chez de nombreux animaux domestiques et sauvages (rongeurs, cervidés...). Tous les ruminants peuvent héberger et excréter des oocystes. Parmi les ruminants qui représentent le plus grand groupe d'espèces concernées par la cryptosporidiose, le **chevreau est le plus sensible à l'infection par *C. parvum*.**

2) Race

La race ne semble pas être un facteur de prédisposition à l'infection. En revanche, le mode de stabulation, de maternité ou la densité de l'élevage qui varient en fonction des races sont des facteurs de risque.

3) Age

La cryptosporidiose est essentiellement une maladie du **nouveau-né**. La plupart des cas cliniques se produisent entre l'âge de 5 et 15 jours chez les veaux. Chez les adultes, la maladie est généralement asymptomatique.

4) Etat immunitaire

Comme chez l'homme, le parasite s'installe plus facilement chez l'animal sur un terrain immunodéprimé. Chez le cheval, le premier cas de cryptosporidiose a été décrit chez un poulain immunodéprimé. Chez le chat, les symptômes apparaissent lors de co-infection avec le FeLV (virus leucémogène félin) qui induit des immunodépressions. Au moment de l'agnelage, le niveau d'excrétion d'oocystes augmente chez les brebis (23). La pression d'infection augmente dans le milieu ambiant au moment où les agneaux sont les plus vulnérables. Chez les bovins, il n'y a pas d'augmentation de l'excrétion autour de la mise-bas (86).

C. MODE DE TRANSMISSION

Le mode de transmission principal est le mode **fécal-oral** : l'hôte ingère les oocystes résistants qui ont été excrétés directement sporulés dans les fèces de

l'hôte précédent. Parfois, la transmission de la maladie se fait par inhalation mais cette voie est surtout fréquente chez les Oiseaux.

La transmission entre animaux peut se faire directement c'est à dire d'animal à animal ou indirectement via l'eau utilisée pour la désinfection, le personnel qui s'occupe des animaux, les locaux ou le matériel utilisé... Les oocystes étant très résistants, tout ce qui n'est pas drastiquement désinfecté peut véhiculer des oocystes.

La voie d'infection la plus commune est un **contact étroit avec les fèces diarrhéiques des animaux malades.**

D. FACTEURS DE RISQUES

1) Saison

La période à risque pour la contamination des veaux est l'hiver car c'est à cette période qu'il y a le plus grand nombre d'animaux dans la classe d'âge la plus à risque (54). C'est au pic d'incidence des naissances qu'a lieu le pic d'incidence de la maladie. De plus, les animaux sont gardés à l'étable et la transmission de la maladie se fait plus aisément lorsque la densité et les contacts entre animaux augmentent. Cependant, ce résultat est à moduler en fonction du pays, du mode d'élevage (animaux en stabulation, au pré...) ou encore de la répartition des mises bas sur l'année. Ainsi, lors d'une étude conduite de Février à Août sur l'excrétion des bovins en Californie (5), la probabilité d'excréter des oocystes de *Cryptosporidium parvum* au mois de Mai est supérieure à celle des autres mois et ce de manière inexpliquée. La saison à laquelle se produisent les vêlages n'a pas non plus d'influence sur l'excrétion des oocystes (6).

On pourrait penser que, les oocystes étant sensibles à la chaleur et à la dessiccation, il y aurait une diminution du nombre de cas pendant la saison chaude. Même si certains auteurs notent cette baisse en été (46), la tendance générale est à une absence d'influence de la saison. Ceci est en faveur d'une contamination **directe** d'animal à animal sans laisser aux oocystes le temps de résider au sol et de subir les aléas de température et d'humidité du milieu extérieur.

2) Densité animale

Une trop forte densité animale dans un troupeau est responsable d'une augmentation du risque de transmission par voie fécale-orale car elle augmente les chances de contacts entre individus contaminés et individus récepteurs. Ainsi, lorsqu'on multiplie par 10 la densité de bovins dans un troupeau, on multiplie par 2 ou 3 la probabilité d'excréter *C. parvum* dans ce troupeau (6). De même, les plus sévères épizooties se produisent lorsque la densité animale est la plus élevée (4). La conception des bâtiments a donc un rôle à jouer dans la contamination en favorisant le contact avec les agents pathogènes lorsque la densité animale est trop élevée, le renouvellement de l'air insuffisant et l'hygiène des litières douteuse .

3) Conduite d'élevage

Certains comportements dans la gestion d'un élevage peuvent conduire à une augmentation du risque de contamination des animaux.

Chez les veaux, les maternités collectives, la surpopulation, le stress d'un sevrage trop précoce, les transports vers des marchés... contribuent à une augmentation du risque de cryptosporidiose clinique surtout lorsque les animaux sont maintenus dans de mauvaises conditions d'hygiène. Chez les agneaux, le refroidissement en période néonatale dû aux mauvaises conditions climatiques, les infections intercurrentes ou encore les déficits nutritionnels augmentent la probabilité d'apparition de la maladie.

Une étude (54) a cherché à quantifier le poids de différents facteurs de risque sur la probabilité d'infection par *Cryptosporidium parvum*. Ces facteurs de risque sont associés de façon significative à la probabilité d'infection et concernent essentiellement la conduite d'élevage en présevrage, période critique pour l'infection. Dans cette étude, le fait de nourrir des veaux à la main avec du lait reconditionné est associé à une diminution du risque infectieux. La ventilation du bâtiment d'élevage et le paillage quotidien des litières avec de la paille propre sont également associés à une diminution du risque. En revanche, la présence d'autres espèces animales, capables d'héberger le parasite, au contact du troupeau est un facteur de risque d'apparition de la maladie.

La multiplication des manipulations d'animaux et de matériels favorise le contact entre l'agent infectieux et la population à risque et donc augmente le risque de contamination.

4) Rôle de l'épandage de fumier

L'application de fumier sur les champs dans un but de fertiliser et d'enrichir le sol permet indirectement un recyclage des micro-organismes. L'épandage de fumier contenant des oocystes de *Cryptosporidium parvum* peut être responsable de la dissémination et de la pérennisation de la maladie dans une exploitation. Etant donnée la très grande résistance des oocystes, ces derniers peuvent persister dans les herbages ou sur le sol et ainsi être transmis aux animaux lors de la mise à l'herbe. La contamination est également possible indirectement par l'ensilage d'herbe contaminée. En effet, si le sol est contaminé et que les oocystes survivent pendant toute la période de croissance de la plante, il est possible de retrouver des oocystes viables dans un ensilage au bout de 3 mois (53). Ainsi pour un ensilage de ray-grass contenant des oocystes de *C. parvum* (concentration initiale dans l'herbe : 5.9×10^4 /gramme de matière fraîche) et conservé de trois façons différentes (aucun traitement, inoculation de ferment lactiques ou ajout d'acide formique) il est possible, au bout de trois mois de conservation, de retrouver des oocystes viables. Quelque soit le mode d'ensilage, 30 à 40 % des oocystes sont viables et donc le potentiel infectieux de l'ensilage est réel.

Cherchant à savoir quel est le rôle réel joué par le bétail sur la contamination des eaux, Sischo et ses collaborateurs (88) ont montré qu'épandre fréquemment du fumier revient à multiplier par 8 la chance de détecter des oocystes dans les ruisseaux recueillant les eaux de ruissellement. Par ailleurs,

l'auteur révèle que la plupart des fermes américaines incluses dans son étude a une quantité d'eau importante qui s'écoule dans les cours d'eaux alentour. La majorité des fermes a une gestion des eaux de surface et de leur écoulement qui contribue à dégrader la qualité de ces eaux et nécessite donc des améliorations.

Partie 4

DIVERSITE GENETIQUE DE L'ESPECE *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*

La seule espèce du genre *Cryptosporidium* qui infecte l'homme immunocompétent est *C. parvum*. Il s'agit également de la principale espèce retrouvée chez les ruminants et les oocystes isolés sont morphologiquement identiques entre l'homme et l'animal. Donc, le seul moyen de savoir si l'animal est à l'origine de la contamination de l'homme et de mieux comprendre l'épidémiologie chez l'homme est de faire appel à des techniques moléculaires.

Depuis quelques années, plusieurs équipes de chercheurs se concentrent sur la variabilité génétique à l'intérieur de l'espèce *Cryptosporidium parvum*. Différents isolats de zones géographiques et d'espèces hôtes différentes ont été analysés : analyse des profils enzymatiques, analyse de fragments de gènes par PCR (Polymerase Chain Reaction), séquençage de l'ADN... La région du génome analysée est différente pour chaque étude.

I. MISE EN EVIDENCE DE LA VARIABILITE GENETIQUE

A. DEUX GENOTYPES DIFFERENTS

Widmer a regroupé différentes études montrant l'existence de variations génotypiques et phénotypiques à l'intérieur de l'espèce *Cryptosporidium parvum* (101).

Dix isolats de *Cryptosporidium parvum* dont 4 d'origine humaine et 6 d'origine bovine sont étudiés en utilisant l'analyse des isoenzymes : les isolats humains et les isolats bovins ont des profils enzymatiques différents pour la phosphoglucomutase et l'hexokinase (101, 8). Cependant l'analyse d'isoenzymes sur des oocystes est délicate car il s'agit de formes de résistance quasiment inactives métaboliquement. Il faut donc un nombre considérable d'oocystes pour ces analyses. De plus, toutes les enzymes ne sont pas utilisables et certaines isoenzymes (comme la glucose phosphate isomérase) ne montrent aucun polymorphisme entre les isolats humain et animal.

Les techniques moléculaires demandent beaucoup moins d'oocystes ce qui est particulièrement intéressant pour *Cryptosporidium parvum*. De plus, les séquences non codantes du génome peuvent être analysées (le génome de

Cryptosporidium parvum est constitué de 8 chromosomes représentant environ 9.6 Mpb). Oocystes et sporozoïtes sont les seuls stades de développement dont disposent les chercheurs car on ne possède pas de système de culture permettant la multiplication *in vitro* du parasite. Les oocystes sont obtenus à partir des matières fécales des animaux malades mais il est très difficile d'isoler les stades intracellulaires du développement (92). Les techniques capables de traiter de volumineux échantillons d'origine environnementale ou fécale sont particulièrement intéressantes et la PCR occupe parmi ces techniques une place clef. Ces techniques basées sur l'amplification de l'ADN sont très sensibles à une éventuelle contamination de l'échantillon et la résistance des oocystes aux agents chimiques de désinfection permet ici de purifier les échantillons de tout ADN exogène sans altérer l'intégrité des oocystes.

Peng et Xiao (77) ont réussi à mettre en évidence un polymorphisme génétique sur le gène d'une protéine d'adhésion (TRAP-C2) de *Cryptosporidium parvum*.

Trente-neuf échantillons d'ADN ont été analysés d'origine humaine ou animale ; le fragment du gène TRAP-C2 a été amplifié par PCR et les produits de la PCR ont été purifiés et séquencés. Les séquences d'ADN ont été comparées pour les 39 échantillons et en 5 positions un polymorphisme dans la succession des nucléotides est repéré (substitution d'une base par une autre) mettant en évidence **2 allèles différents** pour ce gène chacun représentant un génotype différent. La figure suivante montre les différences de séquence du fragment de 369 paires de bases du gène étudié :

Génotype 1	G	C	T	C	T
Génotype 2	A	T	G	T	C
	↑	↑	↑	↑	↑
Position					
	15	42	64	111	244

Le **génotype 1 ou génotype humain** ne contient que des isolats d'origine humaine. Le **génotype 2 ou génotype bovin** contient tous les isolats d'origine bovine et trois isolats d'origine humaine mais pour lesquels on a mis en évidence un lien ou un contact avec un animal infecté. En effet pour le 1^{er} cas, il s'agit d'une contamination à partir de cidre préparé dans une ferme où des oocystes ont été retrouvés dans la presse servant à presser les pommes et dans les fèces des veaux élevés sur la ferme. Le 2^{ème} cas concerne trois familles qui venaient d'acquérir des jeunes veaux et chez lesquelles neuf personnes en tout ont été malades. Uniquement des oocystes de génotype 2 ont été retrouvés. Le 3^{ème} cas concerne un patient contaminé lors d'une épidémie dans une petite communauté rurale dans laquelle des oocystes ont été retrouvés dans le fumier d'origine bovine épandu près des sources en eaux et dans les réservoirs d'eaux. Pour tous les isolats humains appartenant au génotype 1, la source de l'infection n'a jamais pu être déterminée avec précision. Cependant aucun lien avec une source animale n'est noté mais des expositions à de l'eau souillée par des matières fécales humaines sont probables dans certains cas.

B. DEUX CYCLES DE TRANSMISSION DIFFERENTS

Des études d'infection expérimentale par administration orale d'oocystes sur des veaux et des souris sont ensuite menées à partir de certains isolats (77). Tous les isolats humains appartenant au génotype 2 sont aptes à reproduire l'infection sur l'animal ou, au moins, sur des souris immunodéprimées. L'isolat bovin de référence (Iowa), appartenant à une souche de laboratoire maintenue par passage en série sur des veaux, est capable lui aussi d'infecter des veaux et des souris. En revanche, **aucun isolat testé appartenant au génotype 1 ne peut infecter expérimentalement un animal** (77, 8). Ceci signifie que le génotype humain est soit incapable d'infecter un animal soit que l'infection qui en découle est asymptomatique.

Ces résultats suggèrent l'existence de 2 cycles de transmission différents de la maladie à l'homme. Le 1^{er} consistant en une **transmission zoonotique** de la maladie de l'animal à l'homme avec par la suite des transmissions entre individus humains et de l'homme à l'animal. Le 2^{ème} consistant en une **transmission « anthroponotique »** exclusivement entre hommes soit directement soit indirectement par la contamination fécale de différents supports comme l'eau ou les aliments.

Une autre étude s'intéressant à un gène codant pour une protéine de la paroi de l'oocyste (gène COWP (*Cryptosporidium oocyst wall protein*)) indique des résultats similaires (76). Le nombre d'isolats est plus important et se répartit comme suit :

Origine des isolats	Nombre d'isolats	Génotype
Foyer humain d'origine hydrique du Devon 1995	49	1 (100%)
Foyer humain d'origine hydrique de Londres/Hertfordshire 1997	46	1 (93%)
Cas humains sporadiques	46	1 (59%) 2 (35%)
Bétail (bovins, ovins, souches bovines de référence)	62	2 (100%)

Tableau 6 : Répartition des génotypes (76)

L'ADN des oocystes est extrait et purifié puis le gène COWP est amplifié par PCR. Les produits sont digérés par une enzyme de restriction et les fragments obtenus sont révélés pour mettre en évidence un polymorphisme dans les sites de restriction (PCR/RFLP). Si le gène étudié est bien un locus polymorphe, on obtiendra des fragments de longueur différente qui migreront en fonction de leur taille lors de l'électrophorèse en gel d'agarose. La visualisation des fragments se fait par ajout de bromure d'éthidium, un agent intercalant phosphorescent aux ultraviolets.

Le profil de migration peut se schématiser ainsi :

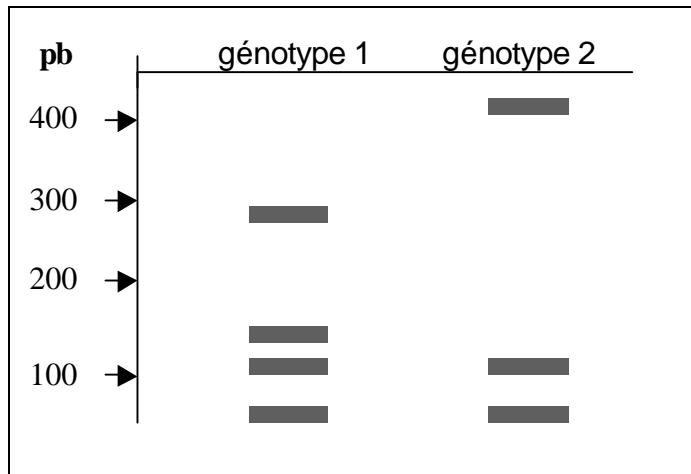


Figure 7 : Profil de migration

Quasiment tous les isolats provenant d'hommes contaminés lors d'épidémies d'origine hydrique sont du génotype 1 ou humain. Tous les oocystes d'origine animale sont de génotype 2. Les cas de cryptosporidiose humaine sporadique appartiennent aléatoirement à l'un ou l'autre groupe ; deux individus présentent même les deux génotypes. Donc, avec l'utilisation d'un marqueur différent, les résultats indiquent ici aussi l'existence de **2 sous-populations génétiquement distinctes de *Cryptosporidium parvum*** : l'une *a priori* confinée à l'homme et l'autre évoluant aussi bien chez l'homme que chez l'animal. La co-infection par les deux sous-populations est possible.

Sulaiman et Xiao (94) ont également utilisé la technique de PCR/RFLP pour étudier le polymorphisme de longueur des fragments de restriction du gène de la protéine TRAP-C2.

Quatre-vingt-douze isolats de *Cryptosporidium parvum* sont analysés : 50 d'origine humaine (dont 21 de patients atteints du SIDA) et 42 d'origine animale (des veaux en majorité, un chien, un singe et un cerf). **Le but des chercheurs est de mettre au point un outil de diagnostic simple permettant de différencier rapidement les deux génotypes existants de *Cryptosporidium parvum*.** Tous les isolats provenant d'animaux (bovin ou pas) appartiennent au génotype 2 ce qui montre que tous ces animaux sont susceptibles d'être infectés par la même forme de *Cryptosporidium parvum*. La grande majorité des patients humains qu'ils soient des cas sporadiques ou non sont du génotype 1. Les patients atteints du SIDA sont également du 1^{er} génotype.

Les enzymes de restriction utilisées sont spécifiques de chaque génotype : les enzymes de restriction humaine ne peuvent couper que des produits issus de l'amplification du génotype 1. Idem pour les enzymes de restriction spécifiques du génotype bovin. Les profils de migration obtenus sont donc différents pour chaque génotype et facilement identifiables. Cette technique, bien plus rapide que le séquençage du gène, peut servir dans les cas futurs à l'identification des sources et à comprendre l'épidémiologie.

D'autres régions du génome de *Cryptosporidium parvum* peuvent servir à différencier les isolats humain et animal (63). Morgan et ses collaborateurs ont amplifié et séquencé le gène de la sous-unité ribosomale 18S. L'analyse de l'ADN

ribosomal montre une zone où la séquence des bases est différente délimitant ainsi deux groupes. Tous les isolats animaux sauf un ainsi que trois isolats humains possèdent la même séquence. Les sept autres des dix isolats humains possèdent l'autre séquence. On retrouve donc avec ce séquençage **les deux sous-populations génétiquement distinctes : le génotype 1 ou humain et le génotype 2 ou bovin.**

Dans le but de vérifier leurs résultats, les isolats sont amplifiés avec des amores spécifiques. Les résultats sont identiques à ceux obtenus par séquençage. La spécificité des amores de PCR est vérifiée par essai d'amplification d'autres parasites et de matières fécales. Aucun produit d'amplification n'est obtenu.

II. EXPLICATIONS POSSIBLES

A. VARIATION EN FONCTION DU LIEU GEOGRAPHIQUE

Les différences observées pourraient s'expliquer par des **différences de provenance géographique des isolats** : des souches évoluant séparément présentent des variations géographiques. Afin de savoir si la variabilité existe au sein de souches issues d'une zone géographique restreinte, une étude a été menée sur des isolats bovins provenant du bassin hydrographique de la Red River dans le nord des Etats-Unis (87). Les oocystes bovins ont été purifiés puis analysés par RADP/PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) une technique d'amplification de l'ADN à l'aide d'amorce de séquence arbitraire qui met en évidence un éventuel polymorphisme dans les sites d'hybridation. Parmi les 16 isolats analysés et comparés à des isolats venant d'Australie, la plupart appartienne au même groupe mais trois souches montrent un profil de migration différent ce qui prouve qu'une variabilité existe même à l'intérieur d'isolats proches géographiquement.

Dans le but de mieux définir le degré d'isolement génétique de chaque génotype, plusieurs chercheurs (93) ont analysé 28 isolats (d'origine ovine, bovine ou humaine en majorité) provenant de **lieux géographiques très différents** comme l'Australie, les Etats-Unis, le Pérou, l'Espagne et le Royaume-Uni. Ces échantillons ont été analysé par PCR ou PCR/RFLP en utilisant cinq marqueurs polymorphes connus qui, d'après leur localisation sur le génome, constituent au moins trois groupes de marqueurs non liés génétiquement. Ici aussi, pour chaque locus, uniquement deux profils de migration sont révélés : le génotype 1 ne regroupe que des isolats d'origine humaine à l'exception de celui d'un singe en captivité (1^{er} échantillon d'origine non humaine appartenant au génotype humain). Le génotype 2 regroupe tous les isolats d'origine animale plus une minorité des isolats humains.

Aucun profil mixte n'est noté ce qui est en faveur de l'existence de deux sous-populations distinctes isolées reproductivement.

B. VARIATION EN FONCTION DU CHOIX DU MARQUEUR GENETIQUE

Lors de chaque étude, un marqueur du génome différent est utilisé. Mais les résultats fournis par ces marqueurs n'ont jamais été comparés. Une équipe de chercheurs anglais (50) a comparé les génotypes isolés par PCR/RFLP à partir des gènes COWP et TRAP-C1. Cette étude porte sur un grand nombre d'oocystes puisque les échantillons de 211 patients humains sont analysés : les matières fécales contiennent des oocystes visibles par microscopie et l'amplification par PCR est positive pour les deux gènes précédents plus le gène de la sous-unité ribosomale 18S.

Le nombre de patients positifs par PCR - indiquant la sensibilité de la PCR - est différent en fonction du gène :

- 97 % pour le gène 18S ARNr
- 91 % pour le gène COWP
- 66 % pour le gène TRAP-C1

La sensibilité des trois PCR augmente avec le nombre d'oocystes observés par microscopie, atteignant 100 % lorsque ce nombre est élevé. Le gène de la sous-unité ribosomale 18S est présent sous forme de cinq copies dans le génome de *Cryptosporidium parvum* ce qui explique sans doute la plus grande spécificité de la PCR basée sur ce gène.

Les produits de PCR des gènes COWP et TRAP-C1 sont ensuite soumis à une analyse RFLP.

Les résultats obtenus par les deux analyses se recoupent parfaitement : tous les isolats identifiés comme appartenant au géotype 1 par le marqueur COWP le sont aussi par le marqueur TRAP-C1 et idem pour le géotype 2.

Parmi les isolats amplifiés par PCR pour ces deux gènes, 38 % sont de géotype 1 et 62 % sont de géotype 2 sans distinction d'âge ni de sexe mais avec une plus forte proportion de personnes ayant voyagé à l'étranger dans le 1^{er} groupe.

Quelque soit le gène utilisé comme marqueur génétique, la PCR sépare toujours les isolats de la même façon : ceux qui sont typés comme étant du géotype 1 avec un marqueur le sont aussi avec l'autre marqueur. Ceci pourrait être lié à la proximité génétique des deux gènes. Or, deux équipes indépendantes ont montré que ces deux gènes sont situés sur des chromosomes différents. **Les deux génotypes de *Cryptosporidium parvum* sont donc bien deux sous-populations différentes se comportant comme deux espèces distinctes.**

Afin de mieux mettre en évidence la variabilité à l'intérieur de l'espèce *Cryptosporidium parvum*, Widmer (102) a étudié l'intron du gène codant pour la β -tubuline par PCR/RFLP. Il s'agit du seul intron connu chez *Cryptosporidium parvum* et les séquences non codantes sont généralement plus polymorphes que les séquences codantes. L'enzyme de restriction utilisée coupe ce fragment en 7 sites de restriction dont 3 sont des sites polymorphes. Deux de ces trois sites déterminent les 2 sous-groupes bovin et humain classiquement identifiés.

Cependant, pour l'un des sites, certains profils font penser que les 2 allèles (absence ou présence du site de restriction) peuvent être retrouvés au sein d'un même génotype. Le 3^{ème} site polymorphe situé au niveau de l'intron est très polymorphe et met en évidence plusieurs profils de restriction.

Le séquençage montre 4 allèles différents :

- 2 allèles déterminent les génotypes bovin et humain.

- 1 allèle se rencontre sur des isolats (dont le profil RFLP indique qu'ils appartiennent au génotype bovin) provenant de patient atteint du SIDA ou d'une souche provenant d'un patient péruvien mais maintenue par passage en série sur des veaux. Ce groupe d'isolats montre une séquence de nucléotides qui suggère une **recombinaison entre les allèles du génotype bovin et du génotype humain**.

- 1 allèle se retrouve sur un isolat provenant d'un individu atteint du SIDA et montre des divergences importantes avec les autres allèles dans la séquence de nucléotides.

Une variabilité à l'intérieur du génotype humain a déjà été notée par Peng et Xiao (77). Ces résultats contrastent avec ceux des autres marqueurs RFLP qui mettent en évidence uniquement les deux génotypes habituels. Widmer affirme qu'un certain nombre d'isolats naturels de *Cryptosporidium parvum* présentent en fait un **profil génétique mixte** et que l'analyse de marqueurs plus polymorphes révèlera d'autres profils génétiques. Pour d'autres chercheurs, aucune donnée n'indique une telle recombinaison entre les génotypes ce qui signifie que ces deux génotypes présentent un isolement reproductif.

III. UNE SITUATION ENCORE PLUS COMPLEXE

Les exemples suivants suggèrent que la variabilité au sein de l'espèce *Cryptosporidium parvum* est en fait beaucoup plus complexe que la simple division en deux génotypes (l'un humain et l'autre bovin) peut le laisser penser.

Morgan a comparé les régions ITS 1 et ITS 2 (Internal Transcribed Spacers) d'ADN ribosomal de plusieurs isolats de *Cryptosporidium* provenant de différents hôtes : hommes, un alpaga, bovins, ovins, caprins, un cerf, souris, un koala, porcs et chats (57).

Après séquençage de l'ADN, on s'aperçoit qu'il y a des variations considérables entre les isolats d'hôtes différents mais pas entre les isolats d'une même espèce hôte, même lorsqu'ils proviennent de pays différents. Par exemple, les pourcentages de divergence entre les isolats bovins et humains pour les régions ITS 1 et ITS 2 sont respectivement de 28 et 25 % ; ces valeurs sont supérieures à celle entre deux espèces déjà établies *Toxoplasma gondii* et *Neospora caninum* (24 % pour la région ITS1).

Une analyse phylogénétique est ensuite menée conduisant à la construction d'un arbre (ou phylogramme) basé sur la distance génétique entre les isolats. Six groupes différents se détachent et les divergences entre les isolats de porc, chat

ou koala sont beaucoup plus importantes que celles entre les isolats bovins et humains. L'analyse d'un isolat de souris montre en revanche qu'il est génétiquement très proche du génotype bovin. L'analyse des fragments de restriction par RFLP montre également une **division en 6 profils de migration différents qui identifient 6 génotypes** : **humain, bovin** (contient les isolats de bovins, ovins, caprins, du cerf et de l'alpaga ainsi qu'un isolat humain), **porcin** (5 porcs de lieux différents), **félin, murin** puis le **génotype du koala**.

Ces variations importantes au niveau de cette région du génome sont en faveur de l'existence de **plusieurs espèces distinctes au sein de *Cryptosporidium parvum***.

Xiao a séquencé et comparé le gène de la sous-unité ribosomale 18S de nombreux isolats (107). La séquence de ce gène est également comparée à celles du même gène issues d'autres espèces de sporozoaires comme *Babesia divergens*, *Eimeria tenella*, *Cyclospora* sp., *Sarcocystis tenella*, *Isospora suis*, *Toxoplasma gondii*...

Toutes les espèces de *Cryptosporidium* appartiennent au même groupe phylogénétique, bien distinct de celui des autres espèces. L'analyse de ce gène montre que le **genre *Cryptosporidium* est constitué d'au minimum quatre espèces et que ces espèces peuvent se diviser en deux groupes** :

Le 1^{er} groupe est constitué de tous les isolats de *Cryptosporidium parvum* et *Cryptosporidium baileyi*.

Le 2^{ème} groupe inclut *Cryptosporidium muris* et *Cryptosporidium serpentis*.

La division en ces deux groupes se retrouvent quelque soit le gène utilisé comme marqueur : gène 18S ARNr, gène COWP (*Cryptosporidium* oocyst wall protein), gène d'une protéine HSP70 (106).

Les différences génétiques entre ces deux groupes sont plus importantes que celles entre *Eimeria tenella* et *Cyclospora* sp. qui constituent pourtant deux genres distincts. En effet, la distance génétique (indiquée par le pourcentage de nucléotides différents) entre ces deux espèces déjà établies est de 3.24 % alors que la distance génétique entre les espèces de *Cryptosporidium* est de 1.8 à 7 %. Ceci indique que *Cryptosporidium* constitue bien un genre à plusieurs espèces.

	C. parvum	C. wrairi	C. baileyi	C. serpentis	C. muris
C. parvum	0 à 0.23				
C. baileyi	3.7 à 3.9	3.7			
C. serpentis	5.8 à 6.2	5.6 à 6	5 à 5.5	0 à 0.34*	
C. muris	6.5 à 7	6.6 à 7	5.5 à 5.7	1.8 à 2.3	0 à 0.8*

Tableau 7 : Distance génétique entre différents isolats et espèces de *Cryptosporidium* sp. (107) (% de nucléotides différents)

De plus, les différences génétiques entre ces deux groupes recoupent des différences biologiques préalablement observées puisque le 1^{er} groupe représente des parasites intestinaux et respiratoires alors que le 2^d représente des parasites de l'estomac et que les espèces hôtes de ces parasites sont différentes.

D'autres espèces du genre *Cryptosporidium* considérées comme valides par des critères biologiques se placent à côté ou à l'intérieur du groupe formé par les différents isolats de *Cryptosporidium parvum*. Il s'agit de *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium saurophilum*, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium wrairi*.

La distance génétique entre ces différents génotypes peut se représenter par un arbre phylétique basé sur la comparaison des séquences nucléotidiques entre isolats, ici pour le gène 18S ARNr (106). Deux espèces seront d'autant plus éloignées que leurs divergences seront plus grandes.

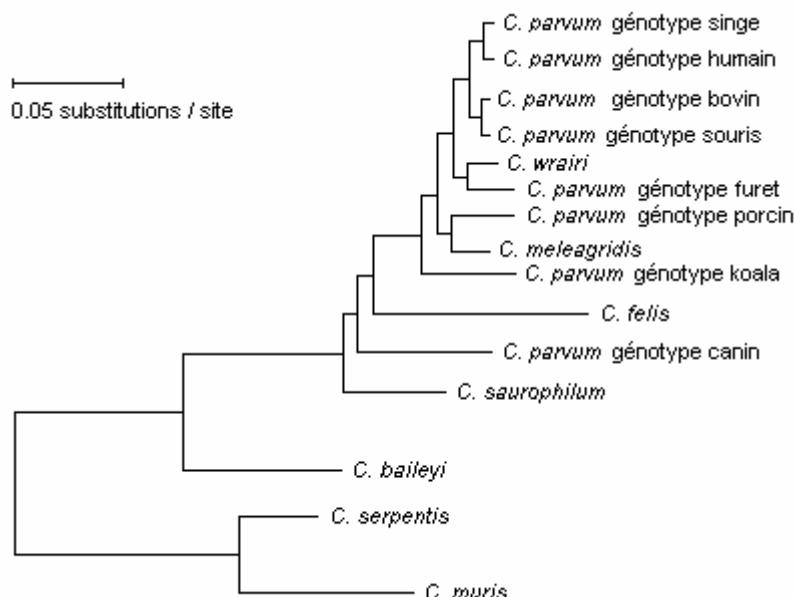


Figure 8 : Relations phylogénétiques entre les différentes espèces et génotypes de *Cryptosporidium* (106)

Les arbres obtenus à partir d'autres gènes utilisés comme marqueurs sont très proches de celui-ci.

A. CRYPTOSPORIDIUM FELIS

Bien que situé à l'intérieur des génotypes de *Cryptosporidium parvum*, *C. felis* est génétiquement différent de *C. parvum*. La distance génétique entre *C. parvum* et *C. felis* est de 2,22 % (106) et est similaire à celle existante entre deux espèces distinctes de *Eimeria* (2,91 %). Déjà d'autres études de spécificité d'hôtes et de morphologie (85, 58) avaient suggéré l'existence d'une forme de *Cryptosporidium* adaptée au chat, différente des autres isolats de *Cryptosporidium parvum* et qui doit être considérée comme une **nouvelle espèce du genre *Cryptosporidium***.

Les différences morphologiques, de spécificité d'hôte et de site d'infection entre ces deux espèces sont indiquées dans le tableau 8.

Espèces	Hôtes	Site d'infection	Dimensions des oocystes	
			Longueur (μm)	Largeur (μm)
<i>C. parvum</i>	Mammifère	Intestin	4.8-5.6	4.2-4.8
<i>C. felis</i>	Chat	Intestin	3.2-5.1	3.0-4.0

Tableau 8 : Différences biologiques et morphométriques entre *C. parvum* et *C. felis* (106)

Plus de 20 isolats félin provenant de différents continents ont été séquencés en utilisant le gène 18S ARNr (60). Tous les isolats examinés étaient identiques pour ce gène là.

Le niveau de divergence génétique ainsi que l'apparente spécificité d'hôte et les différences morphologiques suggère que *C. felis* soit une espèce vraie.

B. *CRYPTOSPORIDIUM CHEZ LES REPTILES : C. SERPENTIS ET C. SAUROPHILUM*

C. serpentis est la principale espèce et la seule unanimement reconnue chez les reptiles. Elle a été découverte en 1977 chez un serpent, nommée *C. serpentis* en 1980 et est toujours considérée comme valide. Elle est génétiquement et biologiquement proche de *C. muris*.

Pour le gène 18S ARNr, le pourcentage d'homologie dans les séquences nucléotidiques entre *C. serpentis* et *C. muris* est de 97,42 % alors qu'il n'est que de 93,38 % entre *C. serpentis* et *C. parvum* (59).

Les études morphologiques d'oocystes retrouvés chez des serpents et des lézards montrent une grande variété de types d'oocystes. Afin d'éclaircir la situation, Morgan et Xiao (59) ont mesuré la variabilité de 15 isolats de reptiles venant de lieux différents. La majorité des isolats montrent des oocystes de *Cryptosporidium serpentis* (12 sur 15) et ce génotype est stable quelque soit le continent de provenance du reptile (Australie, Europe ou Etats-Unis). Les autres isolats semblent appartenir à *C. muris* ou au génotype murin de *C. parvum*. Il est probable que ces oocystes soient en fait simplement des oocystes ingérés en même temps qu'une proie par le serpent (61).

Récemment, une nouvelle espèce : *C. saurophilum*, incapable d'infecter les serpents, a été décrite chez des lézards et des varans (60). Les différences entre *C. saurophilum* et *C. serpentis* sont résumées dans le tableau 9.

Espèces	Hôtes	Site d'infection	Dimensions des oocystes	
			Longueur (μm)	Largeur (μm)
<i>C. serpentis</i>	Serpent	Estomac	5.6-6.6	4.8-5.6
<i>C. saurophilum</i>	Lézard	Intestin	4.4-5.6	4.2-5.2

Tableau 9 : Différences biologiques et morphométriques entre *C. saurophilum* et *C. serpentis* (106)

Le pourcentage de différence dans les séquences nucléotidiques entre *C. parvum* et *C. saurophilum* (2.80 %) est similaire à celui existant entre deux espèces distinctes d'*Eimeria* (2.91 %) pour le gène de la sous-unité 18S d'ARNr

(106). Tout ceci plaide en faveur du statut d'espèce à part entière pour *C. saurophilum*. Cependant, cette hypothèse devra être vérifiée par l'analyse de nombreux échantillons.

C. *CRYPTOSPORIDIUM WRAIRI*

C. wrairi a été décrit pour la première fois lors d'un épisode d'entérite chronique dans une colonie de cochons d'Inde dans un laboratoire (60). Quelque soit le gène utilisé comme marqueur, *C. wrairi* est situé dans les arbres phylogénétiques à l'intérieur du groupe formé par les différents génotypes de *C. parvum*. Sa séparation en temps qu'espèce distincte est basée sur sa spécificité d'hôte (Cochon d'Inde) et le fait qu'il n'est pas facilement transmissible à la souris.

En comparant le pourcentage de différences dans la séquence de nucléotides entre *C. wrairi* et *C. parvum* pour le gène 18S ARNr, la distance d'évolution (donnée par ce pourcentage) entre ces deux espèces est de l'ordre de 0.46 à 0.63 % et donc est plus faible que la distance entre les autres espèces distinctes de *Cryptosporidium* (1,8 à 7 %).

C. wrairi pourrait donc être considéré comme un autre génotype de *C. parvum* et non pas comme une espèce distincte (107).

D. *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM : GENOTYPE CANIN*

Chez le chien, les oocystes excrétés sont morphologiquement identiques à ceux de *C. parvum* et se placent dans l'arbre phylétique au sein du groupe de génotypes de *C. parvum*. Cependant, le séquençage de deux gènes différents indique que des chiens venant des Etats-Unis ou d'Australie présentent un génotype distinct des autres génotypes de *C. parvum* et que ce génotype est stable dans le temps. De plus, le pourcentage de matériel génétique en commun entre ce génotype canin et le génotype bovin ou humain est relativement faible, similaire à celui séparant deux espèces comme *C. serpentis* et *C. muris*. Le niveau de divergence génétique entre le génotype canin et les autres génotypes de *C. parvum* et sa spécificité d'hôte a priori font penser que ce génotype est une espèce à part (55).

L'analyse génétique d'un isolat de furet semblable à *C. parvum* a également révélé un génotype distinct.

E. *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM : GENOTYPE PORCIN*

Morgan (61), par séquençage de l'ADN sur des isolats provenant de porcs indique que cette espèce montre un génotype distinct de *C. parvum*. Le **génotype porcin** apparaît stable et peu variable géographiquement puisque les isolats australien et suisse sont identiques. Dans une autre étude (56), Morgan a essayé de savoir si ce génotype porcin était répandu parmi les échantillons isolés de porcs en analysant une séquence d'ADN ribosomal et en la comparant aux génotypes bovin et humain. L'analyse génétique montre **deux types distincts de**

C. parvum chez ces porcs : le génotype bovin présent chez 4 des 12 porcs analysés et le génotype porcin présent chez les 8 autres. Deux isolats, l'un de génotype porcin et l'autre de génotype bovin, sont ensuite administrés par voie orale à des souris immunodéprimées. Le génotype porcin ne produit pas d'infection alors que le génotype bovin provoque l'excrétion d'oocystes. **Les deux génotypes sont donc génétiquement mais aussi biologiquement différents.**

F. CRYPTOSPORIDIUM PARVUM : GENOTYPE MURIN

Le **génotype murin** est génétiquement très différent de l'espèce *C. muris* et se rapproche plutôt du génotype bovin de *C. parvum*. Sur les 182 souris analysées, 6 % seulement sont positives pour *C. parvum* mais aucune pour *C. muris* (61).

G. CRYPTOSPORIDIUM CHEZ LES ANIMAUX SAUVAGES

Des échantillons d'eaux, prélevés après orages dans des ruisseaux de l'état de New York et soumis à la recherche de *Cryptosporidium* par PCR-RFLP et séquençage, ont montré 12 profils génétiques différents. La distance génétique entre ces différents génotypes est relativement grande. Quatre de ces 12 génotypes sont identiques à des espèces ou génotypes connus de *Cryptosporidium* présents chez les serpents, les oiseaux et les marsupiaux. Aucun génotype ne se rapproche des génotypes présents chez l'homme, les animaux de compagnie ou les animaux d'élevage ce qui indique que les autres génotypes isolés viennent probablement de la faune sauvage (105).

H. CONCLUSION

D'après ces résultats, tous les chercheurs s'accordent à dire que **l'espèce *Cryptosporidium parvum* n'est pas une espèce uniforme et peut être subdivisée en plusieurs génotypes distincts.**

Bien entendu, la distance phylogénétique entre les différents génotypes de *C. parvum* est inférieure à celles séparant les quatre principales espèces du genre : *C. parvum*, *C. muris*, *C. serpentis* et *C. baileyi*. Mais certains génotypes de *C. parvum*, qui s'éloignent un peu des autres (comme le génotype porcin et canin), pourraient constituer des espèces à part entière surtout si *C. wrairi* et *C. meleagridis* conservent leur statut d'espèce.

A l'exception du génotype bovin, tous les génotypes de *C. parvum* infectent un hôte défini donc une certaine spécificité d'hôte pourrait exister au sein de ces génotypes. C'est cette spécificité d'hôte qui a permis, entre autres, de distinguer *C. wrairi* et *C. felis* en temps qu'espèces ; ainsi, si on applique les mêmes critères de taxonomie aux génotypes de *C. parvum* certains d'entre eux pourraient avoir le statut d'espèce (108).

En fait, le problème de la taxonomie du genre *Cryptosporidium* revient à définir à quel endroit se trouve la séparation entre une espèce et un

génotype, à quel pourcentage de matériel génétique propre peut-on considérer qu'il s'agit d'une nouvelle espèce ?

Cette nouvelle taxonomie est loin d'être établie définitivement. Bien que l'intégration des données moléculaires soit indispensable dans cette révision, il ne faudra pas perdre de vue les données biologiques comme la spécificité d'hôte et le site d'infection au risque de perdre toute cohérence.

IV. CONSEQUENCES

Les résultats de ces études portent atteinte au statut d'espèce unique de *Cryptosporidium parvum* et remettent en cause le concept de transmission purement zoonotique de la cryptosporidiose. Les observations concernant les deux génotypes bovin et humain suggèrent l'existence de deux cycles de transmission distincts et exclusifs l'un de l'autre.

Le but de ces analyses moléculaires est de mieux comprendre l'épidémiologie de la maladie et en particulier de la cryptosporidiose humaine. La combinaison des différents marqueurs du génome permettra de typer facilement les isolats, d'estimer la prévalence de chacun des génotypes ou encore d'identifier des marqueurs de virulence. Bien qu'il soit admis que l'espèce *Cryptosporidium parvum* possède plusieurs génotypes, on ne sait que peu de chose sur les différences de virulence entre les souches.

Devant la grande variabilité au sein de l'espèce *Cryptosporidium parvum*, on peut supposer que tous les génotypes qui composent cette espèce sont potentiellement dangereux pour l'homme. Il existe peut être une différence en fonction du statut immunitaire du patient : les personnes immunodéprimées sont sans doute susceptibles d'être infectées par des génotypes non infectants pour les personnes immunocompétentes (106).

La clarification de la situation taxonomique de l'espèce *Cryptosporidium parvum* est fondamentale. Elle permettra de connaître les génotypes capables d'infecter l'homme et de prendre toutes les mesures de précaution nécessaires en cas d'épidémie. Ces études moléculaires sur le genre *Cryptosporidium* ont donc des applications d'une importance capitale dans le domaine de la santé publique.

Partie 5

CRYPTOSPORIDIOSE CHEZ L'HOMME

Le but de cette partie est de comprendre comment l'homme se contamine et de quelles manières l'animal participe à cette contamination.

I. POPULATION ATTEINTE

Cryptosporidium parvum est un agent entéropathogène humain fréquent à travers le monde ; peu connu avant la pandémie de SIDA, il est maintenant reconnu comme l'un des principaux agents d'infection intestinale. Des cas de cryptosporidiose humaine ont été répertoriés dans plus de 90 pays sur tous les continents. L'infection par *Cryptosporidium parvum* pourrait concerner environ 300 000 personnes tous les ans aux Etats-Unis (31). Les pays en voie de développement payent un lourd tribut à la maladie ; le niveau d'hygiène et la qualité sanitaire de l'eau en sont en grande partie responsables. L'évolution de la maladie dépend essentiellement du statut immunitaire de l'individu infecté. Chez les patients immunocompétents, la maladie est en général auto-résolutive en une à deux semaines. Chez les sujets immunodéprimés, la diarrhée est fréquemment sévère, résistante à tout traitement et peut avoir des conséquences fatales.

A. LES ENFANTS

La maladie touche préférentiellement les enfants probablement à cause de leur immaturité immunologique et de certains comportements peu hygiéniques. La prévalence de la cryptosporidiose parmi les autres maladies diarrhéiques varie de 0,5 à 1 % dans les pays développés jusqu'à 10 % dans les pays en voie de développement. Les enfants de 1 à 5 ans sont les plus atteints. Les taux de prévalence sont variables en fonction de la population étudiée, de son niveau d'hygiène... Ils sont évidemment plus élevés dans les populations d'enfants souffrant de diarrhée. La saison exerce également une influence : l'incidence est plus élevée lors des saisons chaudes et humides. Dans les pays en voie de développement, la cryptosporidiose est beaucoup plus fréquente parmi les enfants souffrant de malnutrition. La malnutrition peut conduire à un état d'immunodéficience par carence et dans cette population la cryptosporidiose prend souvent un caractère chronique. On ne sait pas si la malnutrition prédispose les enfants à la cryptosporidiose ou si la cryptosporidiose conduit à un état de malnutrition. En Inde, plus de la moitié des enfants atteints de cryptosporidiose aiguë ou chronique souffrent de malnutrition ; au Gabon, 31,8 % des enfants mal nourris sont atteints de cryptosporidiose contre 16,8 % des enfants correctement nourris. La cryptosporidiose aiguë est un indicateur de la mortalité infantile dans

les pays en voie de développement : les enfants souffrant de cryptosporidiose ont un taux de mortalité deux à quatre fois supérieur à celui d'enfants avec un autre agent entéropathogène (35). La maladie touche également les personnes qui vivent en groupe autour des malades comme les jeunes adultes contaminés secondairement par leurs enfants ou le personnel des hôpitaux et des orphelinats.

B. LES IMMUNODEPRIMES

La cryptosporidiose est très fréquemment associée chez l'homme au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et dans cette population, la maladie revêt un caractère particulièrement grave. Elle touche entre 5 et 50 % des patients atteints du SIDA en fonction des pays et est une des infections opportunistes de ce syndrome les plus fréquentes (92). De grandes différences sont à noter en fonction du niveau de développement du pays : en Europe ou aux Etats-Unis, 3 à 4 % des patients atteints du SIDA ont une cryptosporidiose alors que ce pourcentage peut atteindre les 50 % dans les pays en voie de développement. Ainsi, à Bamako, au Mali, dans un hôpital où 40 % des patients diarrhéiques sont atteints par le VIH, la quasi totalité des cas de cryptosporidiose se retrouvent sur les sujets immunodéprimés (VIH positif). Parmi ces sujets, 40 % décèderont dans les deux premières semaines d'hospitalisation des suites d'une diarrhée aqueuse profuse (35). En Europe, parmi les individus atteints du SIDA, les hommes homosexuels ont plus de risque d'avoir une cryptosporidiose que les femmes homosexuelles ou que les usagers de drogues injectables.

C'est vraisemblablement un facteur immunologique qui prédispose ces personnes à avoir des formes chroniques de cryptosporidiose. Les cas les plus graves chez les personnes VIH positif surviennent lorsque le système immunitaire est très altéré : lorsque le taux de lymphocytes CD4 est supérieur à 180 cellules/mm³ on assiste à une guérison spontanée alors que 87 % des patients avec un taux de CD4 inférieur à 180 cellules/mm³ font des formes chroniques (19).

Le tableau suivant donne d'autres exemples de la prévalence de la cryptosporidiose dans cette population à risque.

Pays, année	Proportion de la population infectée et caractéristiques
Brésil, 1991	14,3 % individus VIH positif et présentant une diarrhée
Cuba, 1993	38,3 % individus VIH positif
Ethiopie, 1994	40 % individus VIH positif présentant diarrhée et perte de poids
Europe, 1996	6,6 % individus VIH positif auront une cryptosporidiose au cours de leur maladie
France, 1993	37,3 % individus VIH positif et présentant une diarrhée ou une malabsorption
Italie, 1993	33,3 % individus VIH positif et présentant une diarrhée

Tableau 10 : Quelques exemples de la prévalence de la cryptosporidiose chez l'homme atteint par le VIH (35)

Le centre pour le contrôle et la prévention des maladies aux Etats-Unis déclare que la transmission de la cryptosporidiose par l'eau de consommation chez les personnes infectées par le VIH peut se produire en l'absence d'une source déclarée d'épidémie, malgré une qualité de l'eau supérieure à la normale et sans que l'on identifie d'oocystes dans l'eau (91). Ceci montre bien la fragilité de ces personnes à l'égard de cette maladie.

Les autres personnes à risque pour la cryptosporidiose sont les immunodéprimés sévères suite à une transplantation d'organe ou à une chimiothérapie pour le traitement d'un cancer. La grossesse ou la co-infection par un virus comme le virus de la rougeole sont également des facteurs de risque.

II. CLINIQUE

La cryptosporidiose chez l'homme peut prendre quatre formes intestinales différentes. Les complications touchent l'appareil respiratoire et le système hépatobiliaire (35).

A. FORME ASYMPTOMATIQUE

Le portage intestinal asymptomatique d'oocystes est peu fréquent chez les personnes au statut immunitaire normal mais semble plus important chez les personnes immunodéprimées : à Cuba, 45 % des personnes VIH positif et ayant une cryptosporidiose sont asymptomatiques. Ce portage peut jouer un rôle important dans la transmission de la maladie.

B. FORME TRANSITOIRE (OU AIGUË)

Cette forme concerne la plupart des hôtes normaux sur le plan immunitaire qui présente une diarrhée limitée dans le temps et autorésolutive en quelques jours. La durée d'incubation est d'environ 6 jours et les principaux signes cliniques sont une diarrhée aqueuse souvent accompagnée de crampes abdominales, de maux de tête, nausées, myalgies et vomissements. Cette forme s'apparente parfois à une diarrhée virale. Elle se rencontre souvent chez les patients VIH positif qui ont encore un taux de cellules CD4 assez élevé.

C. FORME CHRONIQUE

Cette forme est fréquente chez les personnes atteintes du SIDA ou souffrant de malnutrition. La survie de ces personnes immunodéprimées et souffrant de cryptosporidiose chronique est significativement plus faible que celle des personnes atteintes par les formes aiguës ou asymptomatiques. La clinique précédente s'accompagne de déshydratation et de perte de poids.

D. FORME FULMINANTE

C'est une forme dramatique qui n'arrive quasi exclusivement que sur des personnes ayant le SIDA ou souffrant d'une immunodépression sévère suite à une chimiothérapie. La diarrhée est très intense (parfois supérieure à 1 L/heure) et provoque un déséquilibre électrolytique. Les patients sont parfois présentés en état de profonde hypovolémie et de choc et nécessitent une réanimation ; cependant la mortalité est très élevée et l'espérance de vie ne dépasse pas quelques semaines. Les mécanismes de cette forme fulminante ne sont pas clairement élucidés.

E. EXTENSION

L'extension à l'appareil respiratoire est fréquente mais le plus souvent asymptomatique. Elle est fréquente chez les enfants et peut provoquer toux et dyspnée chez les personnes atteintes du SIDA. Chez les personnes souffrant de cryptosporidiose chronique, la maladie peut s'étendre au tractus hépato-biliaire ainsi qu'aux canaux pancréatiques. Cette localisation sert de réservoir à l'infection et provoque des rechutes même après traitement chez les personnes à risque. Les autres sites d'extension sont l'estomac et le pancréas.

F. INFECTION EXPERIMENTALE

Une infection expérimentale a été réalisée sur 29 personnes volontaires qui n'avaient jamais été en contact avec *C. parvum* et qui ont ingéré des doses croissantes d'un isolat bovin de référence de *C. parvum*. Le pourcentage de personnes infectées et donc excrétant des oocystes augmente avec la dose d'oocystes administrée : 20 % infectés pour 30 oocystes administrés et 100 % infectés pour plus de 1000 oocystes administrés (19).

III. MODES DE TRANSMISSION

Cryptosporidium parvum peut être transmis à l'homme par différentes voies : par l'eau du robinet, le contact avec un animal ou un homme infecté, la consommation de nourriture contaminée, l'ingestion d'eau de source ou de piscine contaminée... En fait, l'ingestion de tout support contaminé par des fèces humaines ou animales est potentiellement infectante. L'importance relative de ces différentes voies reste encore inconnue (22).

A. LISTE DES COMPORTEMENTS POTENTIELLEMENT A RISQUE

Cette liste est non exhaustive et les situations décrites peuvent représenter un risque essentiellement pour les populations à risque (22).

Contact avec un animal : posséder un animal, surtout un chiot ou un chaton ; changer la litière ; visiter une animalerie ou une ferme ; vivre dans une ferme ; s'occuper d'un veau...

Consommation : de fruits ou de végétaux crus, non lavés ; de produits laitiers non pasteurisés ; d'eau de source, de rivière ou de lac...

Contacts : avec une personne ayant la cryptosporidiose ; s'occuper d'une personne souffrant de diarrhée ; voyager dans un pays en voie de développement ; comportement sexuel à risque ; s'occuper d'un enfant de moins de trois ans...

Autres : camper ; nager dans une piscine, un lac ou une rivière où une contamination fécale de l'eau a pu se produire ; éviter d'avaler de l'eau dans les piscines, les lacs ou les rivières ; jardiner...

Pendant l'été 2000, cinq épidémies de cryptosporidiose ont été reportées par le CDC aux Etats-Unis (Centers for Disease Control and Prevention). En Grande Bretagne, de nombreux cas sont associés à la fréquentation d'une piscine mais il est parfois difficile de mettre en évidence une épidémie par contact avec une source de faible niveau de contamination. Lorsqu'un accident de contamination fécale se produit dans une piscine, les baigneurs sont exposés à de nombreux agents pathogènes mais la probabilité de transmission de la cryptosporidiose est supérieure à celle des autres pathogènes car le parasite résiste au traitement des piscines par le chlore et qu'il n'est pas efficacement éliminé par les systèmes de filtration.

B. TRANSMISSION PAR L'EAU

Bien que cette voie de transmission de la cryptosporidiose soit connue depuis plus de douze ans, des cas de contamination d'origine hydrique continuent de se produire. Lors des dix dernières années, des oocystes de *Cryptosporidium* sp. ont souvent été retrouvés dans l'eau du robinet causant plus de 19 cas d'épidémies de cryptosporidiose d'origine hydrique et affectant plus de 427 000 individus (91). **Fayer et Morgan (31) dressent la liste de 54 épidémies de cryptosporidiose humaine liée à la consommation d'eau ou d'aliment contaminés entre 1984 et 1999 et concernant environ 470 000 personnes (cf. annexe).**

L'augmentation du nombre de cas de cryptosporidiose par rapport à la décennie précédente est en partie due à une augmentation de la surveillance de la qualité des eaux et à une meilleure connaissance du parasite dans les centres hospitaliers de diagnostic.

L'épidémie de Milwaukee en 1993 a abouti à une prise de conscience générale de l'importance de *Cryptosporidium parvum* (33).

1) Des exemples de cryptosporidiose d'origine hydrique

Durant les mois de Mars et Avril 1993, la plus grande épidémie d'origine hydrique de cryptosporidiose a eu lieu à Milwaukee dans l'état du Wisconsin aux

Etats-Unis. Environ 403 000 personnes ont été atteintes de diarrhée parmi les habitants et les visiteurs de la ville et de ses environs (la zone représente une population de 1,6 million d'habitants). L'eau potable de la ville et des cités environnantes provient du traitement et de la filtration de l'eau du lac Michigan. C'est l'eau de ce lac, contaminée par des oocystes de *Cryptosporidium*, qui est à l'origine de la plus grande épidémie liée à la consommation d'eau de boisson. En plus d'une défaillance dans l'un des deux systèmes de traitement des eaux alimentant la zone, la fonte des neiges et les fortes pluies de printemps ont contribué à une concentration anormale en débris dans les eaux du lac (27). Le niveau de turbidité de l'eau a atteint un pic très important à la fin du mois de Mars 1993 dans une des deux stations de traitement des eaux du lac. Une semaine après, le nombre de consultation d'urgence ou d'admission à l'hôpital pour gastro-entérite a lui aussi augmenté. Ce laps de temps (7 jours chez les enfants et 8 jours chez les adultes) correspond vraisemblablement au délai d'incubation de la maladie. Aucun autre agent entéropathogène n'a une durée d'incubation identique (64). La durée d'incubation de la cryptosporidiose chez l'homme est en général de 5 à 7 jours mais des variations peuvent être observées en fonction de la dose ingérée. Ici, on pouvait s'attendre à une durée un peu plus longue car la dose infectieuse présente dans l'eau de boisson est en général assez faible. Cette épidémie est associée à des décès notamment dans la population d'immunodéprimés (41). La cause exacte de cette épidémie n'est pas connue mais le bassin versant du lac est connu pour son importante industrie laitière et d'abondantes pluies ont précédé l'épidémie. Il est probable que l'eau du lac ait été contaminée par des eaux d'égouts, des déchets de l'élevage ou des effluents venant des abattoirs.

Un an plus tard, à Las Vegas dans le Nevada, 78 cas de cryptosporidiose liée à la consommation d'eau du robinet - dont 63 chez des individus VIH positif - sont identifiés. La moitié des individus VIH positif contaminés décèdera des suites de cette épidémie dans les trois mois suivants. L'eau de consommation provient du traitement de l'eau d'un lac réputé comme une source très sûre car aucune industrie ni activité d'élevage n'est présente dans la zone. L'usine de traitement de l'eau possède un équipement de pointe et aucune défaillance dans le système n'est identifiée (91, 35). En résumé, ni la source, ni le niveau de contamination de l'eau n'ont pu être identifiés dans cette épidémie.

De l'eau venant d'un forage est probablement responsable de la contamination de 86 personnes dans l'état de Washington en 1994 (26). Jusque là, l'eau issue de la filtration de l'eau de pluie à travers les différentes couches du sol était considérée comme une source relativement pure.

Le tableau 11 dresse la liste, non exhaustive, de quelques épidémies de cryptosporidiose d'origine hydrique.

Année	Pays	Nombre de personnes infectées	Causes
1984	Texas, EU	79	Contamination par des eaux d'égouts
1987	Georgie, EU	13 000	Erreur dans les opérations de traitement de l'eau
1988	Ecosse, GB	27	Contamination d'une canalisation après le traitement de l'eau
1989	Oxfordshire, GB	> 515	Possible contamination de l'eau par du fumier
1990	N.Humberside, GB	447	Problème dans la filtration de l'eau
1991	Pennsylvanie, EU	551	Traitement de l'eau insuffisant
1992	Oregon, EU	15 000	Traitement de l'eau insuffisant
1992	Warrington, GB	47	Contamination depuis des pâturages lors de pluies violentes ; déficience dans la surveillance de l'alimentation en eau
1993	Dorset, GB	40	Faible niveau d'oocystes dans l'eau mais aucune explication quant au mécanisme de la contamination
1993	Washington, EU	3	Neiges et pluies de printemps contenant des matières fécales animales ont contaminé l'eau
1994	Kanagawa, Japon	461	Disfonctionnement dans la pompe évacuant les déchets et contamination de l'eau de consommation après traitement
1995	Floride, EU	72	Déversement des eaux d'égouts dans le système de distribution en eau potable
1997	N.Thames, GB	345	Probable contamination d'un forage d'eau potable mais aucune explication sur la cause. Oocystes retrouvés dans l'eau après traitement. 746 000 personnes ont dû faire bouillir leur eau.

Tableau 11 : Epidémies de cryptosporidiose d'origine hydrique (91 ; 103)

2) Etat des lieux

La contamination des eaux de surface est assez fréquente aux Etats-Unis ainsi qu'en Grande Bretagne. Des oocystes de *Cryptosporidium* sont présents dans 67 à 97 % des eaux de surface aux Etats-Unis (40) ; 26 % des eaux de boisson traitées sont également contaminées (91). Plus de 50 % des eaux de

surface et 37 % des eaux de boisson sont potentiellement contaminées par *Cryptosporidium* au Royaume-Uni et la densité en oocystes varie de 0,001 à 484 oocystes/ litre d'eau de surface et 0,005 à 0,017 oocystes/litre d'eau de boisson.

Outre cette importante contamination des eaux de surface, la dose d'oocystes nécessaire pour provoquer la maladie est faible. **La dose moyenne infectante pour un homme est de 132 oocystes environ** (41). Pour l'épidémie de Milwaukee, la concentration en oocystes a été calculée rétrospectivement et une dose de 0,42 à 4,5 oocystes / litre d'eau serait suffisante pour expliquer le nombre de cas observés (27).

3) Caractéristiques biologiques de *Cryptosporidium parvum* facilitant une transmission par l'eau

De nombreux facteurs favorisent la propagation de la cryptosporidiose par la voie hydrique (91). Tout d'abord **l'ubiquité du parasite** (recensé chez plus de 79 espèces de mammifères) et sa **très faible spécificité d'hôte** augmentent son potentiel infectieux. Ensuite, le nombre d'oocystes répandus par un individu infecté est très élevé : 10^9 à 10^{10} oocystes répandus dans le milieu extérieur par un homme au cours de sa maladie. Les animaux aussi participent à cette diffusion du parasite et notamment les bovins. Enfin le parasite excrété, sporulé, est **très résistant** dans le milieu extérieur et dans l'eau où il peut survivre quelques mois. Sa grande résistance lui permet aussi de résister aux procédures habituelles de traitement physique de l'eau ainsi qu'à la plupart des désinfectants chimiques utilisés. De plus, la **très petite taille** des oocystes leurs permet d'échapper aux systèmes de filtration de l'eau.

De l'eau contaminée par des oocystes de *Cryptosporidium* sp. qui rentrerait dans la fabrication d'un yaourt pourrait être un vecteur de transmission de la maladie puisque les oocystes résistent à la fabrication et au stockage à faible température des yaourts. En revanche, les oocystes ne survivent pas à la fabrication (mixage) et au stockage à -20°C des crèmes glacées. Les oocystes sont capables de survivre sur une surface en inox si cette surface est humide et pourront donc théoriquement entrer dans la composition de tout produit laitier fabriqué à cet endroit (80).

La propagation de la cryptosporidiose par l'eau est une voie de transmission importante ; cette voie n'est probablement pas limitée dans le temps à des épidémies ponctuelles mais constitue un mode de transmission constant. La contamination de l'eau par des déchets humains ou animaux est un problème de tous les jours. Ainsi, les matières fécales d'origine humaine ou animale doivent toujours être considérées comme une source potentielle de pollution de l'eau.

C. TRANSMISSION ZONOTIQUE

1) Transmission par contact avec un animal de compagnie

Les animaux de compagnie sont susceptibles d'excréter des oocystes de *Cryptosporidium* sp. dans leurs fèces ce qui suggère que la transmission de la maladie de l'animal de compagnie à l'homme immunodéprimé puisse se faire.

Il existe peu de cas décrits de cryptosporidiose acquise par contact avec un animal de compagnie. Cependant, il est fondamental de connaître le risque de transmission de la cryptosporidiose entre l'animal de compagnie et les individus atteints par le virus du SIDA car chats et chiens jouent un rôle important auprès de ces personnes souvent isolées professionnellement et socialement.

La prévalence sérologique (Ig G) de *Cryptosporidium parvum* parmi 600 chats à travers les Etats-Unis s'élève à 8,3 % de la population. Les vieux chats ont les résultats les plus élevés car le risque d'exposition augmente avec le temps. Il n'y a aucune prédisposition de race. Cette séropositivité informe uniquement sur la présence d'une infection antérieure mais n'est pas synonyme d'une excréption d'oocystes (51). Cette séroprévalence est beaucoup plus faible que la séroprévalence humaine mais le risque de contact avec le parasite auprès de la population féline existe bien.

La prévalence d'oocystes dans les fèces de chats sauvages et domestiques s'élève à 8,1 % de la population féline dans la zone de Glasgow (65). L'infection touche davantage les jeunes chatons et est souvent asymptomatique donc elle passe inaperçue. Dans cette étude, deux chats infectés par *Cryptosporidium* sont porteurs du virus FIV (Feline Immunodeficiency Virus) qui est un rétrovirus immunosuppresseur et dans l'un des cas, la diarrhée est chronique avec anémie et perte de poids.

Afin de mieux cerner le risque de cryptosporidiose acquise par contact avec un animal de compagnie, une étude a été menée au sein de deux populations d'individus (34) :

- 1^{er} groupe : individus VIH positif ; *Cryptosporidium* positif
- 2^{ème} groupe (contrôle) : individus VIH positif; *Cryptosporidium* négatif

Aucune différence statistiquement significative n'a été notée dans la proportion de personnes ayant des animaux de compagnie entre les deux groupes. **Ces résultats suggèrent que les animaux de compagnie ne constituent pas un risque majeur pour l'acquisition de la cryptosporidiose chez les personnes atteintes par le virus du SIDA.** En revanche, comme les jeunes animaux sont plus sensibles à la maladie, d'autres études portant sur un plus grand nombre d'individus sont nécessaires afin de mieux cerner le risque associé aux chiots et chatons.

Il est en fait difficile de savoir si c'est l'animal de compagnie qui est à l'origine de la contamination de l'homme ou l'inverse. Bien que le fait de posséder un animal de compagnie représente un risque pour les personnes fragiles, il faut prendre en compte les effets bénéfiques de la présence de cet animal sur le moral de ces personnes. Afin de minimiser les risques d'une transmission zoonotique, il

faut éduquer les personnes immunodéprimées, leur apprendre quels sont les risques encourus et comment se protéger. Les propriétaires d'animaux de compagnie souffrant d'immunodépression chronique doivent être plus vigilants sur la santé de leur animal, se laver systématiquement les mains après avoir caressé leur animal ou nettoyé sa cage et éviter tout contact direct avec les fèces de leur animal (82).

2) Transmission par contact avec le bétail

Bovins et petits ruminants sont les plus grands réservoirs animaux de *Cryptosporidium parvum*. L'homme peut acquérir la cryptosporidiose après un contact avec un animal malade lors d'une visite dans une ferme par exemple ou si son activité l'amène à travailler au contact des animaux.

Les porcs, qui hébergent, entre autres, le génotype bovin de *Cryptosporidium parvum*, peuvent représenter un réservoir infectieux pour l'homme et pour les autres animaux (56). Ce réservoir pourrait jouer un rôle important puisque en Espagne, 22 % des porcs et 78 % des fermes sont infectés par *Cryptosporidium*.

Bien que l'on ne sache pas exactement quelle est la proportion de cryptosporidiose humaine purement d'origine zoonotique, il est préférable pour les personnes à risque d'éviter un contact direct avec le bétail.

D. TRANSMISSION ENTRE PERSONNES

Le portage asymptomatique du parasite existe et peut conduire à une propagation sournoise de la maladie notamment chez les enfants. La transmission directe d'un individu malade à un autre peut se faire également au sein de la structure familiale, lorsqu'un enfant est malade par exemple. De petites épidémies peuvent se produire dans des unités de soins, des hôpitaux ou des orphelinats. Dans un hôpital pédiatrique, une épidémie de cryptosporidiose a touché 82 % des enfants en contact avec un enfant atteint de cryptosporidiose et du SIDA (35). Des précautions particulières concernant l'hygiène de vie sont à prendre pour toutes les personnes vivant avec un malade.

De nombreuses études montrent que dans les personnes atteintes du SIDA, les hommes homosexuels représentent une population davantage à risque pour développer une cryptosporidiose. Certains comportements sexuels sont répertoriés comme étant particulièrement à risque pour l'acquisition de la cryptosporidiose.

E. TRANSMISSION PAR LA NOURRITURE

Plusieurs supports alimentaires ont été incriminés dans la transmission de la cryptosporidiose : salades, lait cru... Du cidre de pomme a contaminé de nombreuses personnes et des oocystes ont été retrouvés dans le cidre, la presse des pommes et les fèces des animaux qui vivaient sur la ferme (35). Des pommes tombées sur le sol et ramassées à même le sol avaient dû rentrer dans la fabrication du jus.

A présent, il est encore impossible de détecter de petites quantités d'oocystes dans un support alimentaire et les aliments contaminés peuvent être distribués très largement, à travers tout un pays, donc il est très difficile de mettre en évidence la source d'une contamination. Certains chercheurs pensent que l'on sous-estime d'un facteur dix l'importance de la transmission de la cryptosporidiose par la nourriture.

Palourdes, moules et huîtres sont connues pour causer des désordres intestinaux chez l'homme. Plusieurs espèces de ces mollusques destinés à la consommation humaine sont testées pour rechercher la présence d'oocystes de *Cryptosporidium* (32). La majorité des échantillons testés provenaient de Galice en Espagne qui est une importante région d'élevage et où une contamination de l'eau de mer par des eaux d'égouts urbaines ou agricoles est possible. Toutes les espèces testées sauf une sont porteuses d'oocystes de *Cryptosporidium*. Les oocystes sont filtrés et se retrouvent dans les branchies, l'hémolymphé ou le tractus intestinal. La viabilité de ces oocystes et donc leur véritable pouvoir infectieux ne sont pas déterminés.

IV. GENOTYPES IMPLIQUES

La capacité à infecter l'homme est clairement établie pour les génotypes bovin et humain de *Cryptosporidium parvum*.

Lors de cas sporadiques de cryptosporidiose, on retrouve ces deux génotypes chez les personnes immunocompétentes mais chez les individus atteints du SIDA, on retrouve en plus le génotype canin de *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium felis* et *Cryptosporidium meleagridis* (106).

Dans un important laboratoire de recherche australien où un grand nombre de matières fécales d'origine humaine sont analysées, **17 % des isolats de *Cryptosporidium parvum* infectant sporadiquement l'homme sont du génotype 2 ou bovin** les autres étant du génotype humain (61). En revanche, en Grande-Bretagne, c'est le génotype bovin qui est responsable du plus grand nombre (57 %) de cas sporadiques de cryptosporidiose humaine (106).

Chez les personnes immunodéprimées, les infections par le génotype bovin semblent être plus fréquentes : 48 % des cas. Chez 77 patients sidéens présentant des symptômes de cryptosporidiose, le génotype humain de *Cryptosporidium parvum* représente 40 cas ; le génotype bovin 23 cas ; *Cryptosporidium felis* 9 cas ; le génotype canin de *Cryptosporidium parvum* 1 cas et *Cryptosporidium meleagridis* 2 cas ; 2 génotypes ne sont pas identifiés (106).

Les deux génotypes, bovin et humain, ont également été incriminés dans les épidémies humaines de cryptosporidiose. Lors de certaines de ces épidémies, le génotype en cause majoritairement a pu être mis en évidence. Ce n'est pas toujours le cas car le nombre d'échantillons identifiés lors de chaque épidémie est faible et parfois les deux génotypes sont présents.

Lieu	Année	Voie	Génotype
Milwaukee	1993	Eau de consommation	1
Georgie	1995	Transmission entre personnes	1
Georgie	1995	Eau d'un parc	1
Floride	1995	Eau de consommation	1
Grande-Bretagne	1995	Eau de consommation	1
Londres	1997	Eau de consommation	1
Washington	1997	Aliment	1
Washington	1998	Aliment	1
Maine	1993	Cidre de pomme	2
Canada	1996	Eau de consommation	2
Pennsylvanie	1997	Contact avec des veaux	2
Minnesota	1997	Eau	2

Tableau 12 : Epidémies de cryptosporidiose et génotype impliqué (81)

Les épidémies causées par le génotype bovin se retrouvent surtout dans des zones rurales. Les autorités britanniques ont été confrontées à une épidémie de cryptosporidiose dans le nord-ouest de l'Angleterre, entre avril et mai 1999, due à un incident dans le traitement de l'eau. Cent quatre-vingt huit cas ont été recensés en 17 jours et tous les échantillons qui ont pu être identifiés étaient du génotype bovin (75). Mais même en connaissant le génotype impliqué, il est impossible de dire s'il s'agit d'une contamination directe à partir du bétail ou s'il s'agit d'une contamination secondaire entre personnes contaminées par le génotype bovin. En effet comme l'homme est porteur du génotype bovin, il peut être à l'origine d'une épidémie liée à ce génotype mais qui est en fait imputable à une pollution de l'eau d'origine humaine.

Pour expliquer le plus grande fréquence du génotype humain dans les épidémies de cryptosporidiose, Xiao a émis l'idée d'une **différence de pouvoir infectieux** entre les deux génotypes chez l'homme (106). **Le génotype humain pourrait être mieux adapté à l'homme** et provoquer une plus grande excrétion d'oocystes. Il contribuerait donc davantage à la contamination du milieu extérieur.

V. CONCLUSION

Aux Etats-Unis, il n'a pas été prouvé que les bovins fussent la principale source de contamination de l'eau alors qu'en Europe, le bétail est plus fréquemment mis en cause dans les épidémies d'origine hydrique. L'existence de deux cycles de transmission différents est maintenant soutenue par plusieurs groupes de chercheurs qui utilisent des marqueurs génétiques différents. Si cette hypothèse se confirme, l'animal ne peut être rendu responsable de tous les cas humains, notamment dans les communautés urbaines où se maintient un cycle de

transmission interhumaine. Les conséquences à tirer en matière de lutte seront donc différentes en fonction du génotype impliqué lors de chaque épidémie comme l'illustre la figure 9.

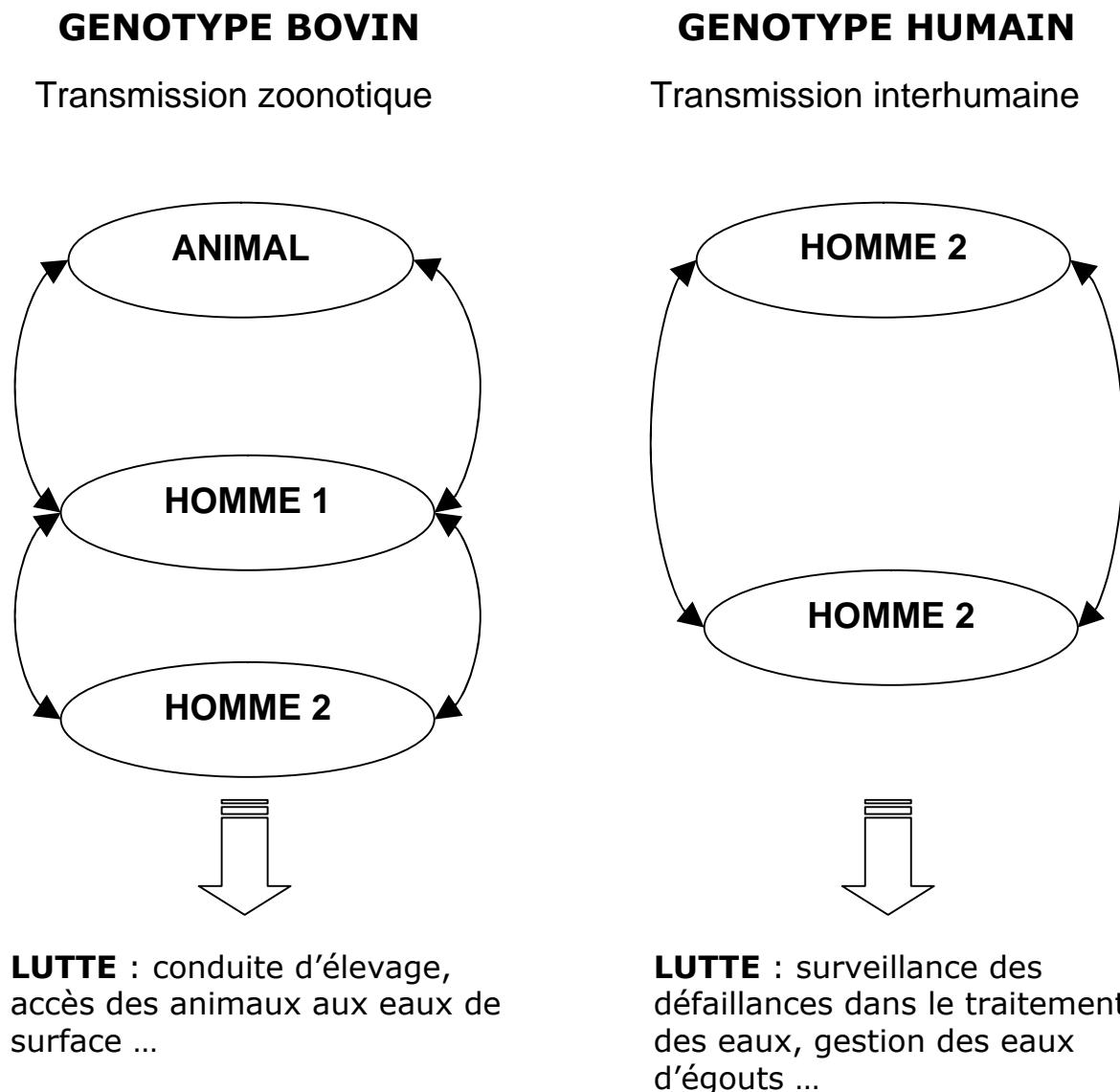


Figure 9 : Représentation schématique de la transmission de la cryptosporidiose à l'homme

Partie 6

METHODES DE LUTTE

I. MISE EN EVIDENCE DU PARASITE

A. CHEZ L'ANIMAL

1) Mise en évidence des oocystes (66)

Chez l'animal, le diagnostic fait appel à des techniques de **concentration et de coloration** à partir des matières fécales. Ces techniques sont suffisantes pour le diagnostic de cryptosporidioses cliniques mais pas pour des échantillons contenant un très petit nombre de parasites. Lorsqu'on recherche les porteurs sains dans un troupeau par exemple, il faut faire appel à des techniques plus sensibles comme l'**immunofluorescence ou l'ELISA** ; des kits sont disponibles mais ces techniques sont plus coûteuses.

(a) Concentration

Les techniques de concentration les plus employées sont la **flottation** avec des solutions de densité élevée et la **sédimentation**. Elles sont surtout utilisées lorsque les échantillons sont pauvres en parasites afin de purifier les oocystes à partir des fèces. Lorsque les oocystes sont excrétés en grande quantité, la technique de flottation peut être simplifiée :

- une goutte de matière fécale déposée sur une lame
- ajout d'une goutte de solution de Sheather (sucre cristallisé, eau, phénol à 5 % ; densité = 1,27)
- mélanger, recouvrir d'une lamelle et examiner au microscope

Les oocystes de *Cryptosporidium parvum* mesurent 4,5 à 5,5 µm et apparaissent légèrement rosés ce qui les différencie des levures. Les sporozoïtes sont parfois visibles sous forme d'un ou plusieurs points noirs.

La sédimentation consiste à ajouter un solvant (éther) au prélèvement fécal et à centrifuger : les oocystes se concentrent dans le culot et l'éther entraîne en surface tous les débris fécaux composés essentiellement de corps gras.

Parmi les méthodes de détection, c'est la flottation au sucre qui donne les meilleurs résultats. Elle donne le plus grand pourcentage de détection dans les fèces de veaux, sa mise en œuvre est assez rapide et son coût est modéré. La flottation avec une solution saturée de chlorure de sodium (densité = 1,27) est adaptée à la détection en routine des oocystes de *C. parvum* sur des supports variés : matières fécales, fumier, terre.... Le taux de détection ne varie quasiment pas en fonction de la concentration en oocystes dans l'échantillon mais est significativement plus faible si la matière fécale n'est pas fraîche (44).

(b) Coloration

Les prélèvements de matière fécale peuvent être colorés sur lame à l'aide de la coloration de Ziehl-Neelsen modifiée qui fait apparaître les oocystes en rouge vif sur un fond vert ou bleu. On peut utiliser la coloration négative de Heine qui fait apparaître les oocystes brillants, réfringents mais non colorés sur un fond sombre. Les levures, bactéries et débris fécaux prennent la couleur du fond sombre. D'autres colorations peuvent être utilisées comme le Kinyoun à froid modifié, la coloration de Giemsa ou l'acide périodique shift.

2) Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel chez l'animal est rendu difficile par les symptômes peu spécifiques et par la présence simultanée dans les classes d'âge concernées d'autres agents comme les rotavirus, coronavirus, *Escherichia coli* entérotoxinogènes ou *Salmonella* sp. C'est une étape **difficile mais indispensable** à la mise en place de tout traitement.

B. CHEZ L'HOMME

Dans les cas sporadiques, l'étape primordiale dans le diagnostic est pour le médecin de penser à la cryptosporidiose et d'aller au delà des cultures fécales habituelles. Même en l'absence de traitement, le diagnostic est utile puisqu'il permet au malade de prendre la mesure du risque de contamination pour ses proches et donc d'éviter la propagation de la maladie.

Le diagnostic clinique fait appel à différentes colorations ou à des techniques immunologiques : immunofluorescence directe, ELISA... (35).

Malgré l'application de ces techniques, **la cryptosporidiose chez l'homme est sous-diagnostiquée**. Le diagnostic microscopique est soumis au risque de confusion avec le genre *Cyclospora* et les techniques de coloration sont longues et de spécificité et sensibilité variables. Elles sont suffisantes pour diagnostiquer une cryptosporidiose chez un patient sidéen qui excrète des millions d'oocystes mais pas chez des individus immunocompétents et asymptomatiques (19). Le diagnostic immunologique ne permet pas la distinction entre les différents génotypes de *Cryptosporidium* et les anticorps sur lesquels sont basés ces techniques induisent parfois des réactions croisées avec d'autres micro-organismes (31).

La PCR (Polymerase Chain Reaction) fait partie d'une nouvelle génération d'outils de diagnostic qui apporte une grande facilité d'usage et une grande spécificité, la capacité d'analyser un grand volume d'échantillons et de distinguer les différents génotypes de *Cryptosporidium*. L'avantage des techniques moléculaires est qu'elles nous informent sur le génotype de *Cryptosporidium* impliqué dans la contamination. Cependant la PCR possède encore quelques limites à son utilisation en routine.

La diversité et le nombre de génotypes établis chez l'animal font qu'il est difficile de développer une méthode de diagnostic capable d'amplifier et d'identifier tous les génotypes potentiellement impliqués lors d'une contamination hydrique. Or

c'est sur le typage rapide du génotype de *Cryptosporidium* en cause que repose la prise de mesures sanitaires adaptées à la protection de l'homme (57).

C. DETECTION DES OOCYSTES DANS L'EAU (33)

La détection des oocystes de *Cryptosporidium* sp. dans l'eau est devenue indispensable étant donné le grand nombre de cas de cryptosporidiose chez l'homme d'origine hydrique. Alors que ce parasite était pratiquement inconnu il y a encore vingt ans, il est devenu aujourd'hui un problème majeur pour tous les chercheurs travaillant sur la qualité de l'eau.

1) Caractéristiques de *Cryptosporidium* sp. rendant sa détection dans l'eau difficile

Les techniques traditionnelles permettant l'identification de micro-organismes dans l'eau ne sont pas applicables à *Cryptosporidium parvum*.

Le parasite se trouve dans le milieu extérieur sous forme d'oocystes déjà sporulés qui sont des formes de résistance et donc quasiment impossibles à cultiver *in vitro*. Les prélèvements sont difficilement mis en culture en routine et sont donc essentiellement soumis à un examen au microscope. Les habituels indicateurs d'une contamination fécale de l'eau, comme la bactérie *Escherichia coli*, ne sont pas utilisables comme témoin car ils survivent moins longtemps que *Cryptosporidium* et ne résistent pas au traitement de l'eau par le chlore contrairement à *Cryptosporidium*.

2) Collection et concentration des oocystes

Il existe plusieurs méthodes de concentration des oocystes de *Cryptosporidium* sp. Aucune n'est satisfaisante dans toutes les situations. La méthode doit permettre de concentrer un grand volume d'eau et d'examiner le produit de la concentration facilement. Lorsque la turbidité d'une eau est très élevée, le volume résultant de la concentration est parfois trop important pour être examiné intégralement.

La concentration des oocystes fait appel à des techniques de **filtration ou de floculation**. Lors de la filtration de grands volumes d'eaux, 100 à 1000 L, sont filtrés à travers une cartouche filtrante de 1 µm de pore. Les particules filtrées sont ensuite obtenues en rinçant la cartouche filtrante. Les produits de cette filtration atteignent parfois un volume de 3 à 4 litres et sont ensuite centrifugés pour une meilleure concentration. La capacité à retrouver des oocystes avec cette technique de concentration est de 14 à 44 %. Une autre technique de filtration consiste à faire passer l'eau à travers une grande membrane plate. Le filtrat est récupéré en raclant la surface de la membrane. Le volume d'eau filtré est beaucoup plus faible surtout quand la concentration en particules de l'eau est importante. La floculation consiste en l'agglutination des particules par la formation d'un précipité par l'ajout de carbonate de calcium en milieu basique. Après sédimentation du précipité, l'eau surnageante est aspirée et le précipité de carbonate de calcium est dissous par

ajout d'un acide. L'efficacité de cette technique est estimée à 70 % pour les oocystes de *Cryptosporidium* sp. et les kystes de *Giardia* sp.

L'avancée de la recherche des protozoaires dans l'eau permet l'avènement de nouvelles techniques permettant de traiter de grands volumes d'eaux avec une grande efficacité.

Lors de contamination hydrique, de grands volumes d'eaux doivent être analysés et la filtration est une **étape indispensable** à la détection des oocystes.

3) Séparation des débris

La collection des oocystes est basée uniquement sur leur taille et le filtrat comporte de nombreux débris comme des algues, des levures ou des bactéries. Afin de ne pas perdre trop de temps dans la recherche des oocystes, on pratique une **centrifugation** du filtrat qui va séparer les particules en fonction de leur densité.

Une autre technique fait appel à une **séparation immunomagnétique** des débris. Des anticorps spécifiques de *Cryptosporidium* sont attachés sur des particules magnétiques et minutieusement mélangés à l'échantillon de manière à ce qu'ils entrent en contact avec les oocystes. Les particules magnétiques sont ensuite séparées des autres débris. Cette technique est assez simple et permet la détection des oocystes dans les échantillons d'eaux mais elle est sensible à la spécificité des anticorps et à la turbidité de l'eau. Il existe dans le commerce de nombreux kits utilisant la séparation immunomagnétique et permettant d'isoler les oocystes de *Cryptosporidium* des particules et débris de l'eau mais tous n'ont pas la même efficacité (11, 83).

4) Détection des oocystes

(a) Immunofluorescence

Classiquement la détection des oocystes de *Cryptosporidium* fait appel à des **techniques d'immunofluorescence**. L'oocyste est mis en évidence soit directement sur la membrane filtre soit sur une lame par un anticorps monoclonal anti-*Cryptosporidium* sur lequel est fixé directement ou non un fluorochrome. Après lavage, la lame est observée en microscopie à fluorescence. Plusieurs anticorps anti-*Cryptosporidium* sont disponibles dans le commerce mais leur inconvénient est qu'ils sont assez peu spécifiques et ne permettent pas l'identification d'une espèce au sein du genre *Cryptosporidium*.

La révélation de la fluorescence peut aussi se faire avec un cytomètre en flux. Oocystes marqués et autres particules sont analysés et triés en fonction de leur taille, de leur forme et de leur fluorescence. Pour éviter de trop nombreux faux positifs, la présence des oocystes peut ensuite être vérifiée beaucoup plus facilement par microscopie à fluorescence.

(b) PCR

Une des techniques les plus répandues est la **PCR** qui permet de détecter des séquences d'acides nucléiques spécifiques de genre ou d'espèce. Cette technique est facilement automatisable et traite de grands volumes d'échantillons.

De plus, elle offre une sensibilité et une spécificité sans égale. De nombreuses amorces ont été décrites permettant la détection d'oocystes de *Cryptosporidium* sp. Il s'agit de la technique de choix pour l'identification d'une espèce précise par rapport à une autre très proche. Cependant son application à des échantillons venant de la concentration d'eaux pose certains problèmes. Le milieu réactionnel dans lequel se déroule la PCR est très sensible aux composants chimiques de l'eau qui peuvent causer un fort taux d'inhibition. Des faux positifs peuvent être engendrés par des acides nucléiques venant d'autres micro-organismes ou du laboratoire.

Pour que la PCR puisse être utilisée en routine pour la détection des oocystes dans l'eau, ces limites doivent être surmontées et une méthode fiable de détection des oocystes et d'extraction de l'ADN doit être développée.

Les qualités que la PCR devra afficher pour la détection en routine de *Cryptosporidium* sont résumées ci-dessous.

PCR idéale d'après U.M. Morgan (62)

- Applicable à des prélèvements cliniques ou environnementaux
- 10 à 20 prélèvements traités en 1 heure
- Sensibilité inférieure à 10 oocystes / prélèvement
- Résultats facilement interprétables
- Méthode fiable et reproductible
- Capacité de différencier **tous** les génotypes différents de *Cryptosporidium*
- Coût raisonnable
- Possibilité de compter les oocystes

L'association de la PCR à la séparation immunomagnétique des débris semble être une bonne technique pour la détection des oocytes dans l'eau (36). Il n'y a aucun faux négatif dû aux inhibiteurs de la PCR car la séparation immunomagnétique permet d'isoler les oocystes des autres constituants de l'eau. En comparaison avec l'immunofluorescence directe, les résultats de cette méthode sont meilleurs en raison notamment de la plus grande spécificité de la PCR.

(c) Autres techniques

Une autre technique moléculaire est l'utilisation d'une sonde fluorescente s'hybridant sur la sous unité 18S d'ARN ribosomal. Cette technique est spécifique et permet de détecter uniquement les oocystes viables. De plus elle permet l'utilisation de sondes spécifiques de genres et d'espèces. Cependant les sondes actuelles se sont pas assez fluorescentes par rapport à certaines algues qui possèdent une fluorescence naturelle beaucoup plus forte.

D'autres techniques simples et rapides permettant d'extraire et d'amplifier des oocystes à partir de prélèvements d'eaux de diverses origines sont en train de se développer (43).

5) Détermination de la concentration en oocystes dans l'eau

Après la détection, le comptage des oocystes est une étape importante mais difficile à réaliser avec précision. Un grand nombre de techniques est utilisé pour déterminer la concentration en oocystes dans l'eau. La fiabilité de ces techniques varie en fonction du nombre d'oocystes, de la turbidité de l'eau ... Il existe des méthodes manuelles basées sur l'observation au microscope de lames graduées contenant un volume précis d'échantillon et permettant de compter les oocystes ou encore des techniques automatisées comme le cytomètre en flux (9).

6) Détermination de la viabilité des oocystes

La détermination de la viabilité des oocystes détectés dans l'eau traitée est primordiale car c'est de cette étape que l'on pourra conclure sur le potentiel contaminant d'une eau. Face à cet enjeu de santé publique, de nombreuses techniques visant à déterminer la viabilité des oocystes ont vu le jour.

Ces techniques sont basées sur différentes colorations vitales qui permettent de différencier les oocystes viables et non viables. D'autres techniques essayent de provoquer *in vitro* l'excystation du parasite en reproduisant les conditions du milieu intestinal. La libération des sporozoïtes peut s'observer au microscope et le pourcentage d'oocystes viables peut être calculé. Cependant, l'excystation *in vitro* est peu précise car, parfois, elle ne se produit pas sur des oocystes qui se révèlent infectants *in vivo* (31). La viabilité des oocystes peut être déterminée par inoculation à des souriceaux nouveau-nés. Quelques jours après, le nombre d'oocystes présents dans l'intestin des souriceaux est évalué à l'aide d'un cytomètre en flux (24). Les résultats obtenus varient en fonction de la souche de souris, de la dose d'oocystes administrée ou des critères de détermination de l'infection. Des récentes techniques de culture du parasite *in vitro* essayent de mettre en évidence plus facilement la viabilité des oocystes.

Les techniques d'inoculation à l'animal sont trop longues et trop coûteuses pour être applicables industriellement au traitement de l'eau. La **RT-PCR** (reverse transcriptase PCR) permet de déterminer la viabilité des oocystes. L'ARN messager de la β -tubuline est particulièrement bien adapté à l'analyse par RT-PCR car il diminue rapidement après l'inactivation des oocystes et parce que la présence d'un intron permet de différencier les produits de la RT-PCR d'un ADN contaminant (100).

7) Détermination du génotype en cause

Les techniques moléculaires permettant de typer l'espèce et le génotype de *Cryptosporidium* sont adaptées aux échantillons de matière fécale ou aux oocystes purifiés mais peu adaptées aux prélèvements d'origine hydrique. La plupart des outils moléculaires utilisés pour l'eau ne permettent pas d'amplifier tous les génotypes pathogènes pour l'homme et donc sous-estime le danger de contamination.

Hommes, animaux de ferme, de compagnie et faune sauvage ont le potentiel d'excréter des oocystes de *Cryptosporidium* sp. dans l'environnement et

dans l'eau. La contribution de chacun à la pollution de l'eau est difficile à déterminer car on ne sait pas identifier les différentes espèces ou souches de parasite dans les échantillons environnementaux. L'application des techniques moléculaires aux échantillons hydriques doit permettre de déterminer le poids relatif de chacun dans la pollution de l'eau. La PCR basée sur le gène de la petite sous unité d'ADN ribosomal et suivie de l'analyse du polymorphisme des fragments de restriction permet de différencier les différents génotypes de *Cryptosporidium* présents dans des échantillons d'eaux de rivière.

L'application systématique de ce type de technique à la détection des oocystes dans l'eau permettra de connaître les sources de la contamination hydrique. Ces techniques vont jouer un rôle clef dans la compréhension de l'épidémiologie de la cryptosporidiose humaine. La connaissance des sources de contamination de l'eau permettra également d'appliquer les méthodes de lutte adéquates, de gérer intelligemment la présence animale dans les bassins hydrographiques.

II. TRAITEMENT

A. CHEZ L'ANIMAL

1) Thérapeutique spécifique

Le contrôle de la cryptosporidiose reste problématique. La plupart des agents testés sont inefficaces ou toxiques. Un très petit nombre de molécules permet le contrôle de la maladie sans provoquer d'importants effets secondaires.

(a) Lactate d'halofuginone

Le **lactate d'halofuginone** administré 2 jours après infection expérimentale à des veaux et pendant 7 jours consécutifs montre une efficacité dose dépendante. A la posologie de 30 microgrammes/kg, la molécule est incapable de prévenir la maladie clinique et la mortalité est identique à celle du lot témoin n'ayant reçu aucune médication. A 60 et 120 microgrammes/kg, aucun signe clinique n'est observé dans le lot traité mais l'excrétion des oocystes n'est pas stoppée intégralement (70).

La même molécule a été testée lors d'un essai clinique sur des veaux laitiers. Un groupe de veaux nouveaux-nés a reçu pendant 7 jours consécutifs du lactate d'halofuginone par voie orale à la posologie de 120 microgrammes/kg alors qu'un autre groupe de veaux recevait un placebo. Les animaux ont été suivis pendant trois semaines pour l'excrétion d'oocystes et l'indice fécal de diarrhée. Les résultats sont significativement meilleurs pour le groupe de veaux traités : ils excrètent moins d'oocystes et sont moins nombreux à avoir de la diarrhée (45).

Dans une exploitation caprine ayant des antécédents de cryptosporidiose aiguë, l'efficacité prophylactique du lactate d'halofuginone a été testée sur des jeunes chevreaux dans des conditions naturelles d'infection. Les chevreaux dès l'âge d'un jour sont séparés en deux groupes, l'un recevant le traitement à la posologie de 100 microgrammes/kg/jour et l'autre ne recevant aucun traitement

spécifique. Les deux groupes sont élevés dans la même stabulation de manière à assurer une pression d'infection très élevée. Chez les témoins non médicalisés, l'infection s'est déroulée de manière classique. En revanche, chez les chevreaux l'administration d'halofuginone réduit la prévalence et l'intensité d'excrétion. En fin de traitement, on note une baisse d'efficacité et de fortes excréptions peuvent être constatées. L'efficacité du lactate d'halofuginone est donc certaine mais doit être améliorée par une administration plus longue et une bonne adéquation entre la dose et le poids moyen des animaux de manière à éviter des sous-dosages en fin de traitement (18).

Le lactate d'halofuginone est présent sur le marché français depuis l'année 2000 sous le nom déposé d'**Halocur®**. Il s'agit du seul produit autorisé en France dans la prévention des diarrhées néonatales du veau dues à *C. parvum*. Son mode d'action est **cryptosporidiostatique** : il retarde le développement du parasite ce qui permet l'installation de l'immunité et il diminue l'intensité du pic d'excrétion. Halocur® est indiqué dans la **prévention de la diarrhée due à *C. parvum* diagnostiquée**. C'est donc essentiellement un produit de prévention dans les élevages ayant eu des antécédents de cryptosporidiose et dans lesquels un diagnostic de certitude a été posé. Eventuellement, il peut être utilisé dans la réduction d'une diarrhée due à *C. parvum* et apparue depuis moins de 24 heures. Il doit être administré 24 à 48 heures après la naissance du veau car il agit sur les stades de la multiplication asexuée. La posologie est de **100 microgrammes/kg de poids vif et par jour**, à administrer par voie orale après le repas pendant 7 jours consécutifs. A trois fois la dose thérapeutique, de graves effets secondaires peuvent survenir ; il est donc indispensable de respecter strictement la posologie recommandée.

(b) Paromomycine

La **paromomycine** est utilisée dans le traitement des cryptosporidioses chez les patients sidéens et est efficace dans la prévention d'infections expérimentales chez le veau et la souris. La paromomycine est un antibiotique de la classe des aminoglycosides qui est administré par voie orale. Dans deux études distinctes menées dans des troupeaux de chevreaux ayant des antécédents de cryptosporidiose, l'administration de paromomycine à la posologie de 100 mg/kg pendant 11 ou 21 jours diminue fortement mais pas complètement l'excrétion d'oocystes dans des conditions d'infections naturelles (17, 42). De plus les signes cliniques d'entérite et de diarrhée ainsi que la mortalité sont contrôlés dans les lots traités. La paromomycine n'a pas d'autorisation de mise sur le marché vétérinaire en France mais est commercialisée en Belgique sous forme de sulfate.

(c) Autres

De rares autres molécules ont montré une efficacité vis-à-vis de la cryptosporidiose. Il s'agit du **décoquinate** disponible en France sous le nom de Deccox 6® qui utilisé à la dose de 2,5 mg/kg pendant 21 jours permet de réduire la sévérité de l'infection expérimentale chez le chevreau (68). Le lasalocid a montré une efficacité *in vitro* en altérant la viabilité d'oocystes purifiés (15) mais certaines études indiquent que cette molécule est très toxique chez le veau.

2) Transfert d'immunité passive

Les découvertes immunologiques sur la cryptosporidiose font l'objet de très nombreuses publications qui ne seront pas exposées ici. Certaines données sont encore confuses puisque des résultats encourageants sont obtenus en utilisant des mécanismes basés sur les anticorps, notamment l'utilisation de colostrum hyperimmun bovin, alors que d'autres études indiquent que les anticorps du colostrum n'ont aucun effet protecteur.

L'immunité passive est l'apport de facteurs immunologiques comme les anticorps après la naissance par l'intermédiaire du colostrum. **Cette immunité n'apporte aucune protection contre *C. parvum* dans les conditions naturelles.** L'administration plusieurs fois par jour de colostrum contenant un fort taux d'anticorps anti-*C. parvum* ne protège pas les veaux de l'infection cryptosporidiosique (37).

Cependant, d'autres études montrent que **l'administration de colostrum hyperimmun de bovin ou d'ovin** avant l'inoculation par voie orale de *C. parvum* permet de réduire l'intensité des signes cliniques et de prévenir la mortalité mais n'empêche pas l'infection. L'obtention de résultats pour la prévention ou le traitement de la cryptosporidiose par cette voie nécessite de nombreuses administrations de colostrum de manière à obtenir un fort taux d'anticorps dans la lumière intestinale pendant une assez longue période pour prévenir l'infection (69).

L'immunisation de vaches en fin de gestation avec un antigène recombinant de *C. parvum* a un effet bénéfique sur l'infection en produisant un colostrum protecteur (79). **L'immunisation des mères protège les veaux de l'inoculation orale de 10^7 oocystes de *C. parvum*** douze heures après la naissance. Cette protection se résume en une absence de diarrhée et une réduction significative de l'excrétion d'oocystes chez les veaux nourris avec un colostrum de mères immunisées par rapport au lot témoin. De même, l'immunisation par voie nasale de chèvres gestantes avec l'ADN d'un antigène majeur de *C. parvum* induit une protection de la progéniture lors d'infection expérimentale (84).

Une étude récente a montré que l'inoculation par voie orale à des rats nouveaux-nés du contenu intestinal de rats ou de vaches adultes permet une relative protection contre l'infection expérimentale contre *C. parvum*. Le nombre de rats infectés ainsi que l'excrétion d'oocystes sont diminués en comparaison à des rats témoins. Ceci laisse penser que **le contenu intestinal des adultes contient un facteur de protection contre la cryptosporidiose et que ce facteur pourrait être transféré oralement à des rats nouveaux-nés.** Le contenu intestinal de veaux n'a aucune valeur protectrice (2).

3) Immunité active contre *C. parvum*

La protection contre *C. parvum* fait surtout appel à l'immunité à médiation cellulaire. La résistance à l'infection et la guérison sont dépendantes d'un mécanisme immunitaire dépendant clairement des lymphocytes T. La réponse immunitaire à médiation humorale ne semble pas jouer un rôle prédominant dans la résolution de l'infection (1). Quelques essais de vaccination contre la cryptosporidiose, prometteurs à moyen terme, sont cités ci-dessous.

Il est théoriquement possible d'induire une immunité contre *C. parvum* en vaccinant les veaux dès la naissance. Un vaccin, administré par voie orale pour stimuler le système immunitaire local, a été développé de façon à protéger les veaux de la cryptosporidiose (37, 39). Expérimentalement, les résultats sont intéressants. Un lyophilisat d'oocystes de *C. parvum* est administré à des veaux à la naissance. La lyophilisation a un effet létal sur *C. parvum*. Les veaux sont élevés en boxes séparés et sont inoculés oralement à une semaine d'âge par des oocystes vivants de *C. parvum*. Il y a moins d'animaux diarrhéiques dans le groupe de veaux vaccinés que dans le groupe témoin qui n'a pas reçu le lyophilisat. De plus la durée de la diarrhée et de l'excrétion sont réduites chez les animaux vaccinés. La réduction de la durée d'excrétion représente une diminution du nombre d'oocystes disséminés dans l'environnement. Les titres sériques en anticorps spécifique anti-*C. parvum* sont identiques entre le groupe vacciné et le groupe témoin. Les anticorps sériques ne semblent pas responsables de la protection conférée par la vaccination. Les auteurs présument que **le vaccin induit une immunité basée sur des anticorps locaux, qui jouerait un rôle de défense contre le parasite.**

Cette étude est ensuite menée sur le terrain dans une grande ferme laitière ayant des antécédents de cryptosporidiose. Sur le terrain, il n'y a pas de différence significative entre le lot vacciné et le lot contrôle pour le pourcentage de veaux diarrhéiques et excréteurs. Dans les conditions naturelles, l'exposition à l'antigène se produit dès la naissance lorsque le milieu est contaminé comme c'est le cas ici. Les veaux n'ont pas le temps de répondre à la vaccination et de développer leur immunité contre le parasite.

La réponse immunitaire à la vaccination doit donc être mise en place très rapidement étant donnée la pression d'infection dans les élevages.

La découverte de moyens de contrôle de la cryptosporidiose chez l'animal devient une nécessité du point de vue économique pour les éleveurs mais aussi du point de vue de la santé publique de manière à réduire la contamination de l'environnement par les animaux.

B. CHEZ L'HOMME

Il n'existe aucun traitement réellement efficace contre la cryptosporidiose malgré la centaine de molécules testées *in vivo* et *in vitro* (19, 104). Aucun des agents antibiotiques et antiprotozoaires testés n'a montré 100 % d'efficacité dans l'élimination ou la prévention de l'infection par *C. parvum*. Comme il n'existe pas de traitement spécifique, tous les efforts doivent être dirigés vers une amélioration du statut immunitaire du malade par la maîtrise du virus du SIDA chez les patients sidéens mais aussi à travers la suppression de facteurs immunosuppresseurs comme les drogues dures ou l'alcool. Les différentes options du traitement varient en fonction du statut immunitaire du malade.

1) Traitement symptomatique

En l'absence de traitement curatif efficace, le traitement symptomatique occupe la première place : fluidothérapie intraveineuse, rétablissement de

l'équilibre électrolytique et apport nutritionnel sont essentiels dans les formes fulminantes de cryptosporidiose.

Chez les adultes et enfants en bonne santé, aucun traitement spécifique n'est préconisé car la maladie est auto résolutive. En revanche chez les enfants mal nourris, un apport nutritionnel soutenu est fortement recommandé.

Chez les personnes pensant être en bonne santé mais chez lesquelles la cryptosporidiose persiste, il faut absolument rechercher tous les états d'immunosuppression sous-jacents (infection par le VIH, déficit congénital en Ig A ou en lymphocytes T...). Chez ces personnes, une antibiothérapie à base de macrolide ou de paromomycine est préconisée (35).

2) Traitements antirétroviraux

Depuis l'utilisation de thérapies anti-rétrovirus hautement actives, la morbidité et la mortalité dues aux infections opportunistes du SIDA ont beaucoup diminué (19). **Le meilleur traitement de la cryptosporidiose pour l'homme est de rétablir l'efficacité du système immunitaire.** La mise en place d'une thérapie anti-rétrovirus et si possible d'une multi-thérapie est l'élément le plus important dans le traitement de la cryptosporidiose chez les patients sidéens. Le but est de faire diminuer la virémie et d'augmenter le taux de cellules CD4.

Une attention particulière doit être portée à l'absorption des agents anti-rétrovirus car la cryptosporidiose provoque une malabsorption ; il est donc préférable d'utiliser des agents injectables afin d'être sûr d'atteindre une concentration efficace (35).

3) Modificateurs du transit

La réduction de la diarrhée améliore la qualité de vie et permet de lutter contre des pertes d'eau excessives. Les agents antispasmodiques ou spasmolytiques comme les opiacés et les analogues de la somatostatine sont particulièrement utilisés.

4) Thérapeutique spécifique

La résistance naturelle de *Cryptosporidium parvum* aux agents antibiotiques et antiprotozoaires est très largement répandue aussi bien chez l'animal que chez l'homme. Les traitements efficaces contre d'autres sporozoaires comme *Toxoplasma*, *Eimeria*, *Plasmodium* ou *Cyclospora* sont inefficace contre la cryptosporidiose humaine. Le matériel enzymatique de *C. parvum* est différent de celui des autres sporozoaires ce qui peut expliquer l'inefficacité des traitements dirigés contre des cibles enzymatiques. L'incapacité de maintenir en culture les différents stades de *Cryptosporidium* limite les investigations. Mais surtout la position privilégiée dans la cellule de *C. parvum*, sous la membrane apicale de l'hôte mais séparé de son cytoplasme, explique sans doute la résistance exceptionnelle du parasite. Cette position extracytoplasmique le rend moins accessible aux molécules actives à l'intérieur de la cellule épithéliale. La compréhension du transport moléculaire à travers l'organe de nutrition et la

membrane de la vacuole parasitophore constituera une des clefs de cette mystérieuse résistance (96).

Certains agents montrent quand même une efficacité contre *C. parvum* dans certaines situations. Les **macrolides** ont une efficacité variable contre *C. parvum*. L'azithromycine et la clarithromycine permettent d'accéder à une forte concentration intracellulaire et peut être ainsi d'atteindre le parasite. La **paromomycine**, un aminoglycoside, est l'agent le plus régulièrement efficace contre la cryptosporidiose humaine. La paromomycine n'est pas efficace contre les atteintes biliaires ou pancréatiques et les rechutes sont fréquentes chez les individus sidéens. La paromomycine n'empreinte pas la voie du cytosol de l'hôte pour atteindre le parasite mais semble passer à travers la membrane apicale de l'hôte et la membrane de la vacuole parasitophore. Les ionophores et notamment le lasalocid agissent sur la perméabilité de la cellule cible et suscitent un intérêt par leur site d'action.

Cet échec sans précédent à trouver un traitement efficace doit être considéré pour certains comme un « signal » permettant de s'orienter vers de nouvelles formes de traitement (35). Une des options est l'immunisation passive généralement à base de colostrum bovin. L'utilisation d'immunothérapie par voie orale comme le colostrum hyper immun d'origine bovine semble être efficace pour réduire l'intensité des signes cliniques (35, 73).

C. TRAITEMENT DES EAUX (33)

1) Objectif

Le traitement de l'eau consiste en une succession d'étapes visant à rendre saine, sans odeur, sans couleur et sans goût une eau de surface ou une eau souterraine.

Afin de purifier une eau, on peut réduire le niveau de contamination initial de la ressource en eau, éliminer physiquement le polluant de l'eau et/ou faire appel à une désinfection chimique. Le recours à telle ou telle technique dépend de la qualité de l'eau avant traitement. Etant donnée la grande variété de contaminants potentiels de l'eau, les processus de traitement font appel, en général, à toutes ces techniques à la fois.

Les eaux souterraines venant de puits profonds sont considérées comme sûres du point de vue sanitaire car l'eau a été filtrée à travers les différentes couches du sol avant de rejoindre son point d'extraction. C'est pourquoi ces eaux subissent un traitement minimal, souvent simplement une désinfection par le chlore qui n'offre aucune protection contre *Cryptosporidium* sp. Pourtant des roches fissurées peuvent laisser passer des petites particules et des oocystes de *Cryptosporidium* sp. ou des bactéries ont été retrouvés dans des forages profonds.

2) Etapes

Cryptosporidium sp. est connu pour sa très grande résistance dans le milieu extérieur et notamment pour sa résistance au traitement de l'eau par le chlore. Dans ces conditions, il est essentiel d'accorder une attention particulière à la

qualité de l'eau avant traitement. La qualité de la ressource en eau doit être contrôlée quotidiennement et toutes les sources de pollution doivent être maintenues à l'écart du lieu de captage.

(a) Sédimentation

Le stockage des ressources en eaux dans de grands réservoirs permet d'améliorer la qualité sanitaire de l'eau grâce à la sédimentation des particules. Pour *Cryptosporidium* sp., cette sédimentation se fait trop lentement pour être réellement efficace sauf dans les eaux de surfaces ou les eaux sales où une grande proportion des oocystes sont attachés à d'autres particules organiques et où la sédimentation se fait plus rapidement (52). Le stockage possède alors un effet bénéfique.

La sédimentation des particules peut être améliorée par **floculation** : on ajoute des sels de fer ou d'aluminium à l'eau et il se forme un précipité qui entraîne les particules au fond.

(b) Filtration

Différentes filtrations successives sont ensuite utilisées pour purifier l'eau. Leur principe consiste non pas à éliminer chimiquement les micropolluants mais à les extraire physiquement. Elles présentent l'avantage de n'utiliser aucun réactif chimique, sauf pour leur entretien. Très fiables, elles permettent de traiter des eaux très polluées et de produire une eau très pure, sans goût désagréable ni mauvaise odeur, et de qualité constante, quelles que soient les variations de qualité de l'eau à traiter.

Le passage à travers des filtres de pores assez élevés (25 à 35 micromètres) permet tout d'abord d'éliminer les algues cellulaires mais pas les oocystes. Toutefois, au fur et à mesure de la filtration, le diamètre des pores diminue à cause des particules piégées sur le filtre et une quantité non négligeable d'oocystes est retenue sur le filtre. Une filtration rapide sur sable est ensuite opérée avec une diminution du nombre d'oocystes d'un facteur 10^3 . Une filtration lente sur sable, à travers une couche de sable très fin peut compléter le traitement avec une bonne efficacité.

(c) Désinfection

La désinfection chimique de l'eau afin d'inactiver *Cryptosporidium* sp. est problématique car les oocystes résistent à tous les traitements classiques de l'eau. Les oocystes peuvent survivre au traitement de l'eau par le chlore, le dioxyde de chlore, l'ozone... Pour obtenir une inactivation des oocystes par la javel, il faudrait multiplier par 100 le niveau de chloration autorisé pour l'eau de consommation ou bien laisser en contact l'eau à traiter avec la javel pendant des années ! **Le traitement de l'eau par l'hypochlorite de sodium seul ne permet pas une maîtrise correcte du risque de cryptosporidiose.**

Le traitement par l'ozone donne des résultats intéressants mais il semble que l'avenir soit à l'utilisation de plusieurs méthodes combinées. Le traitement initial de l'eau par l'ozone est capable de rendre les oocystes plus sensibles à des agents chimiques comme le chlore sans doute par une altération de la paroi des oocystes qui les rendrait plus perméables au traitement chimique. Les eaux de piscines ont la particularité de contenir des matières organiques comme des

cheveux, de la sueur, des traces d'urines ou de matières fécales. Ces conditions particulières altèrent l'action des désinfectants chimiques (13).

Des méthodes d'inactivation physique des oocystes comme le rayonnement ultraviolet, des désinfectants comme l'ammoniaque sous forme de gaz (30) ou la chaleur existent mais ne sont pas exploitées industriellement. Pourtant l'utilisation d'un processus de pasteurisation (température de 71,7°C pendant 5, 10 ou 15 secondes) permet de détruire le pouvoir infectieux d'oocystes en suspension dans de l'eau ou du lait entier (38). Ces procédés permettront dans un futur proche d'assurer un approvisionnement sûr en eau et en aliment aux personnes à risque.

3) Législation

Au Royaume-Uni, la cryptosporidiose est le principal agent pathogène associé à des contaminations d'origine hydrique. Suite à une grande épidémie en 1997, un groupe d'experts gouvernementaux sur la cryptosporidiose a insisté sur la nécessité d'informer les compagnies de traitement des eaux sur le risque de cryptosporidiose. Toutes les étapes de traitement de l'eau ont dû être vérifiées et adaptées au risque en question. Les épidémies de cryptosporidiose résultent le plus souvent d'un traitement de l'eau inadapté. La turbidité de l'eau doit être mesurée en continu afin de mettre en évidence toute défaillance dans le traitement (99). Cependant la turbidité de l'eau, qui renseigne sur le fonctionnement d'un plan de traitement, ne donne aucune information sur la présence ou l'absence d'oocystes dans l'eau (33).

D. DESINFECTION DES LOCAUX

Les oocystes de *C. parvum* sont résistants à la plupart des désinfectants utilisés dans les hôpitaux et les laboratoires et *a fortiori* dans les bâtiments d'élevage. Les concentrations d'eau de javel normalement utilisées pour la désinfection ne suffisent pas à neutraliser les oocystes. Les solutions suivantes seraient efficaces avec un assez court temps d'exposition : ammoniac à 50 % pendant 30 minutes ou à 5 % sous forme gazeuse (Oocide®) ; formol à 10 % ; peroxyde d'hydrogène à 3 % ; dioxyde de chlore (Exspor®)... Les oocystes sont sensibles à la dessiccation et à la chaleur au-delà de 65°C pendant 30 minutes (72). Certaines des concentrations préconisées sont trop élevées pour constituer un protocole de désinfection utilisable sans danger pour les opérateurs et pour le matériel à nettoyer (instruments médicaux, endoscopes...).

III. PREVENTION

A. MESURES DE PREVENTION DE LA CONTAMINATION ANIMALE

Le traitement des animaux doit être une des voies de la réduction de la contamination environnementale. De nombreux facteurs contribuent à la

survenue de diarrhées dans le premier mois de vie des animaux et doivent être amélioré pour réduire la pression d'infection.

1) Gestion du troupeau

Les veaux doivent être élevés en boxes individuels jusqu'à l'âge de 2 à 3 semaines et ensuite regroupés en lots du même âge. Or, cette mesure de prévention est difficilement applicable dans les élevages allaitants. Les programmes de vaccination doivent être à jour car la mortalité est plus importante lors de co-infection avec d'autres entéropathogènes.

La gestion des animaux malades est un point crucial du contrôle de la propagation de la maladie. Les animaux malades sont immédiatement placés dans des locaux séparés des autres nouveaux-nés ; si possible dans des bâtiments différents. Les éleveurs veilleront à toujours s'occuper des animaux sains avant des malades et à ne pas véhiculer d'oocystes par leurs bottes ou leurs vêtements (37).

2) Alimentation

Les carences alimentaires en fin de gestation augmentent le taux de morbidité et de mortalité à la naissance. L'éleveur contrôle que chaque animal ait bien reçu une quantité suffisante de colostrum et que l'apport nutritionnel soit adapté surtout lors d'allaitement artificiel.

3) Hygiène des locaux

L'hygiène de l'élevage est maintenue à un niveau élevé. Le nettoyage des maternités et des boxes des nouveaux-nés doit faire l'objet d'une attention particulière. Les bâtiments doivent être nettoyés à l'eau bouillante sous pression et désinfectés. Dans la mesure du possible un vide sanitaire doit être respecté, au moins le temps de permettre un séchage complet des bâtiments car les oocystes sont sensibles à la dessiccation.

B. POLLUTION DE L'EAU IMPUTABLE A L'ELEVAGE

A cause de la très forte prévalence de l'infection chez les veaux, le cheptel bovin est fréquemment montré du doigt par les autorités sanitaires comme étant la principale source de contamination de l'eau.

1) Modalités

L'eau peut être souillée par des fèces animales de plusieurs manières : les eaux au contact du fumier ; les eaux ayant servi à nettoyer les bâtiments des veaux ; les eaux de ruissellement qui s'écoulent des pâtures... peuvent se déverser dans les cours d'eaux proches des élevages et constituer des sources de pollution pour les rivières qui recueillent ces d'eaux.

Les animaux peuvent avoir un accès direct aux cours d'eaux pour leur abreuvement et déféquer librement dans l'eau. Un bovin adulte produit environ 30 kg de fèces par jour (40) ; cette matière fécale, potentiellement contaminée, est déposée sur les pâtures, voire directement dans l'eau et représente une source de contamination pour l'environnement. Pour qu'une quantité conséquente d'oocystes atteigne les ruisseaux, il faut que la source de la pollution s'écoule directement dans le cours d'eau (5). En dehors de la défécation directe dans l'eau, les eaux de ruissellement qui s'écoulent des prés occupés par les veaux sont capables de transporter des oocystes jusqu'aux cours d'eaux. Au printemps, dans nos régions tempérées, lorsque les animaux excréteurs sont au pâturage, de violents orages peuvent créer de véritables ruisseaux au milieu des champs surtout après une saison pluvieuse lorsque le sol est imbibé d'eau.

Etant donnée **l'importance de l'excrétion chez les jeunes**, le risque de contamination des eaux imputable aux animaux est limité dans le temps à la saison qui suit les vêlages (5) ; si les vêlages sont regroupés dans le temps, cette période à risque est donc assez limitée dans le temps. Une étude montre l'association entre cette saison, où les jeunes sont au contact des sources hydriques, et l'augmentation du taux d'oocystes dans le ruisseau en aval du troupeau. Ce niveau d'oocystes revenant à une valeur plus faible après quelques mois.

Les **ruminants adultes** qui excrètent de façon quasi généralisée mais insidieusement car ils n'expriment pas de symptômes contribuent de façon importante à la contamination de l'eau.

Les eaux usées qui s'écoulent des exploitations d'élevage ou des lieux de pâturage sont des vecteurs potentiels d'oocystes. Plus que les eaux, le fumier, stocké sans traitement ni précaution et abandonné aux eaux de pluies, constitue un véritable risque de contamination. Des eaux de surface provenant d'une part d'eaux d'élevage ou d'autre part d'eaux d'égouts d'origine humaine ont été comparées. La concentration en oocystes était 1,5 à 1,9 fois plus élevée pour les eaux polluées par les exploitations d'élevage (91). Dans une autre ferme, avec un passé de cryptosporidiose, on estime que 550 oocystes/litre d'eau usagée sont déversés dans les cours d'eaux (90).

Dans une étude menée aux Etats-Unis, la majorité des 11 élevages laitiers étudiés avaient une quantité importante d'eaux usées qui se déversaient dans les ruisseaux adjacents. Neuf de ces onze fermes avaient une gestion des eaux de surface et un système d'écoulement des eaux qui contribuaient à dégrader la qualité des ruisseaux en aval (88).

2) Exemples

Une étude au Canada, menée dans une zone rurale, a cherché à savoir si le bétail participait à la contamination de l'eau. Des échantillons d'eau ont été collectés sur un ruisseau appartenant au bassin hydrographique et destiné, après traitement, à la consommation humaine. Ces échantillons sont prélevés en amont et en aval d'un élevage de bovins. Environ la moitié des échantillons sont positifs pour la présence d'oocystes de *Cryptosporidium* sp. en amont comme en aval de l'élevage. Mais **la concentration en oocystes dans l'eau est significativement**

plus élevée en aval de la ferme qu'en amont et cette concentration atteint un pic au mois de février soit juste au moment du pic d'incidence des vêlages (74).

Le **bassin hydrographique** est le bassin des eaux de surface. Les eaux de surface s'écoulent à la surface du sol par ruissellement puis par formation de ruisseaux. Cet écoulement de surface assure un transport mécanique des particules du sol. L'eau est en effet un agent d'érosion mécanique d'une force considérable. Ce ruissellement aboutit directement et rapidement dans les rivières où il constituera, après traitement, une ressource en eau pour la consommation humaine. L'autre alternative pour les ressources en eaux est le captage des eaux souterraines. La majorité de l'eau s'infiltra à travers les différentes couches du sol au profit de la nappe souterraine. Les eaux de surface sont une ressource en eau irrégulière dans le temps soumise aux aléas du climat : crues, orages, sol imbibé d'eau rendant l'infiltration impossible... (14).

3) Conclusion

Pour l'instant, **il n'y a pas de lien irréfutable** entre la présence du cheptel bovin sur les pâtures aux Etats-Unis et l'augmentation de l'incidence de la cryptosporidiose humaine d'origine hydrique. Une différence semble exister entre USA et Europe car la contamination d'origine bovine de l'eau est prouvée en dehors des USA (77).

Il existe peu d'études cherchant à mettre en évidence un lien entre la présence d'un troupeau à proximité d'un cours d'eau et la contamination de ce cours d'eau. **C'est pourquoi, il est nécessaire d'être prudent tant dans la sélection des bassins hydrographiques destinés à l'alimentation en eau potable que dans les pratiques d'élevages qui peuvent être à l'origine d'une contamination animale de l'eau (6).**

L'application systématique des techniques de biologie moléculaire aux prélèvements hydriques doit permettre d'avancer dans la compréhension du rôle du bétail dans la contamination de l'eau et plus largement dans celle de l'épidémiologie de la cryptosporidiose humaine.

C. COMMENT EVITER LA CONTAMINATION DE L'EAU

1) Par l'animal

Mesures de lutte contre la contamination imputable aux bovins (6)

- Réduire l'incidence et l'intensité de l'excrétion
- Réduire le nombre d'animaux au contact direct des sources d'eau
- Réduire le nombre d'animaux dans le bassin hydrographique
- Réduire la viabilité des oocystes avant leur contact avec les sources d'eau
- Regrouper les vêlages et gérer les eaux sales et le fumier

Si on compare deux bassins hydrographiques voisins, très proches topographiquement mais gérés de façon différente, on remarque **l'importance de la conduite d'élevage dans la contamination de l'eau** (ici, contamination par

des *Giardia* sp.). Le niveau de contamination est significativement plus élevé dans le bassin où les ruisseaux traversent des propriétés privées où l'on pratique l'élevage intensif de veaux et où les animaux se promènent librement près des ruisseaux. En revanche, dans le bassin adjacent, l'accès des animaux aux ruisseaux est réglementé et leurs lieux de pâture sont gérés avec soin. Dans les deux cas, les bovins sont excréteurs de *Giardia* sp. mais dans le second bassin la contamination animale des eaux de surface est réduite à son minimum par des pratiques d'élevage adaptées (74).

2) Par l'homme

Les pollutions d'origine humaine de l'eau sont plus fréquentes qu'on ne le pense en matière de cryptosporidiose et les mesures de lutte doivent être adaptées, en particulier lorsque le génotype humain est impliqué. Les mesures visant à éloigner les animaux et leurs éleveurs des grandes métropoles seront sans effet sur la prévention de la cryptosporidiose dans tous les cas où l'homme est à l'origine de la pollution hydrique. La lutte contre la transmission de la maladie à l'homme ne doit pas se tromper de cible en attribuant systématiquement au bétail les cas de contaminations de l'eau (77). Les mesures de prévention concernent alors le traitement des eaux usées, éviter que ne déborde le tout-à-l'égout, éviter la contamination fécale de l'eau...

D. COMMENT EVITER LA CONTAMINATION DE L'HOMME ?

1) Par l'animal

La contamination directe de l'animal à l'homme est facilement maîtrisable car les situations à risque sont peu nombreuses excepté pour les personnes travaillant avec les animaux comme les éleveurs, les vétérinaires ou les personnes en contact avec les matières fécales dans un laboratoire par exemple.

2) Par l'eau

L'absence d'oocystes dans l'eau n'est pas une garantie de sûreté de l'eau car bien souvent les oocystes sont indétectables par les techniques traditionnelles.

La filtration traditionnelle de l'eau du robinet ne permet pas de se débarrasser du risque de cryptosporidiose. Bien que la plupart des eaux en bouteille filtrées satisfassent aux normes standard, les personnes à risque doivent s'assurer que l'eau qu'ils utilisent est sûre. Les filtres adaptés doivent être certifiés pour la rétention des oocystes et le diamètre des pores ne doit strictement pas dépasser 1 micron.

Faire bouillir l'eau de consommation au-delà de 65°C est le moyen le plus efficace pour inactiver les oocystes de *Cryptosporidium*.

Une directive européenne exige que l'eau destinée à la consommation humaine ne contienne pas de microorganismes et parasites pathogènes dans des proportions constituant un danger pour la santé (91). Il est impossible de garantir l'absolue sûreté de l'eau du robinet. C'est pourquoi les personnes sévèrement

immunodéprimées, pour lesquelles la cryptosporidiose peut mettre en danger leurs vies, doivent être orientées vers une stérilisation permanente de leur eau (12). **Toute eau, quelque soit sa source, destinée à être consommée par une personne immunodéprimée doit être portée à ébullition et refroidie avant d'être bue ou incorporée dans un aliment (99).**

3) Eviter les comportements à risque

De nombreuses recommandations ont été données dans le but de prévenir la transmission des oocystes au sein des hôpitaux, laboratoires, élevages... Aux Etats-Unis, le CDC (Centers for Disease Control and Prevention) et le NCID (National Center for Infectious Disease) préconisent des mesures pour prévenir la contamination chez les personnes immunodéprimées (16).

Ces mesures visent à réduire le contact avec les sources de l'infection et à mettre en œuvre des processus de désinfection adaptés. Elles sont dictées par le bon sens et par une connaissance minimale du mode de transmission du parasite. Les personnes malades doivent être confinées dans des lieux isolés et régulièrement désinfectés. Les personnes à risque doivent éviter tout contact direct ou indirect avec les malades. Ces personnes doivent également être informées de tous les comportements à risque pouvant conduire à leur contamination. Elles doivent se laver les mains avec du savon après chaque passage aux toilettes, avant de préparer à manger et de passer à table, après avoir jardiner ou toucher un animal, après s'être occupé d'un enfant en bas âge... Elles doivent également faire bouillir leur eau et utiliser l'eau bouillie pour boire, cuisiner, laver les aliments et faire des glaçons...

Partie 7

CONCLUSION

S'il est certain que la cryptosporidiose est répandue dans les cheptels bovins, ovins et caprins un peu partout dans le monde, peut-on pour autant imputer systématiquement au bétail la responsabilité des cas de cryptosporidiose chez l'homme ?

La contamination du milieu extérieur et notamment de l'eau par les animaux est réelle. **Le cheptel de ruminants constitue, avec l'homme, la plus grande source de contamination de l'environnement.** Les veaux représentent le plus grand réservoir et la plus importante capacité de dissémination d'oocystes de *Cryptosporidium*. Aux Etats-Unis, **8×10^{16} oocystes** sont excrétés chaque année par l'ensemble de la population de veaux laitiers (33). L'intensité d'excrétion d'un veau est identique à celle d'un homme sidéen atteint d'une cryptosporidiose chronique.

Les fumiers et eaux usées dans toutes les régions d'élevage comme les eaux d'égouts non traitées dans les zones où la population sidéenne est importante représentent un fort risque de contamination.

Cependant, au vu des génotypes impliqués dans les cas de cryptosporidiose humaine qui impliquent majoritairement le génotype 1 et des études de biologie moléculaire qui mettent en évidence deux cycles de transmission distincts de *Cryptosporidium parvum*, on ne peut pas imputer systématiquement au bétail la responsabilité des cas de cryptosporidiose chez l'homme.

Présentée dans les années 1980 comme une zoonose émergente, la cryptosporidiose n'est en fait pas forcément une zoonose.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ABRAHAMSEN, M.S. .- Bovine T cell responses to *Cryptosporidium parvum* infection.- *International Journal for Parasitology*, 1998, **28**, 1082-8.
2. AKILI, D., HARP, J.A. .- A factor derived from adult rat and cow small intestine reduces *Cryptosporidium parvum* infection in infant rats.- *The Journal of Parasitology*, 2000, **86**, 5, 979-82.
3. ANANTHASUBRAMANIAN, M., ANANTHAN, S. .- *Cryptosporidium parvum* propagation of oocyst in neonatal calves.- *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 1997, Oct, **40**, 4, 469-72.
4. ANDERSON, B.C. .- Cryptosporidiosis in bovine and human health.- *Journal of Dairy Science*, 1998, **81**, 3036-41.
5. ATWILL, E.R., JOHNSON, E., KLINGBORG, D.J., VESERAT, G.M., MARKEGARD, G., JENSEN, W.A., PRATT, D.W., DELMAS, R.E., GEORGE, H.A., FORERO, L.C., PHILIPS, R.L., BARRY, S.J., McDougald, N.K., GILDERSLEEVE, R.R., FROST, W.E. .- Age, geographic, and temporal distribution of fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cow-calf herds.- *American Journal of Veterinary Research*, 1999, **60**, 4, 420-5.
6. ATWILL, E.R., JOHNSON, E.M., PEREIRA, M.C. .- Association of herd composition, stocking rate, and duration of calving season with fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in beef herds.- *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1999, **215**, 12, 1833-8.
7. ATWILL, E.R., HARP, J.A., JONES, T., JARDON, P.W., CHECEL, S., ZYLSTRA, M. .- Evaluation of periparturient dairy cows and contact surfaces as a reservoir of *Cryptosporidium parvum* for calfhood infection.- *American Journal of Veterinary Research*, 1998, **59**, 9, 1116-21.
8. AWAD-EL-KARIEM, F.M., ROBINSON, H.A., PETRY, F., McDONALD, V., EVANS, D., CASEMORE, D. .- Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using molecular and biological markers.- *Parasitology Research*, 1998, **84**, 4, 297-301.
9. BENNET, J.W., GAUCI, M.R., Le MOËNIC, S., SCHAEFER, F.W., LINDQUIST, H.D.A. .- A comparison of enumeration techniques for *Cryptosporidium parvum* oocysts.- *The Journal of Parasitology*, 1999, **85**, 6, 1165-8.
10. BSAVA NEWS.- Cryptosporidiosis.- *Journal of small animal practice*, 1997, **38**, 319-20.
11. BUKHARI, Z., McCUIN, R.M., FRICKER, C.R., CLANCY, J.L. .- Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* from source water samples of various turbidities.- *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, Nov, **64**, 11, 4495-9.
12. BYLEVELD, P.M., HUNT, A., McANULTY, J.M. .- Cryptosporidiosis in the immunocompromised : weighing up the risk.- *Medical Journal of Australia*, 1999, **171**, 8, 426-8.

13. CARPENTER, C., FAYER, R., TROUT, J., BEACH, M.J. .- Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*.- *Emerging Infectious Disease*, 1999, **5**, 4, 579-84.
14. CASTANY, G. .- L'eau propre.- Editions Hachette, 1980, 191 pages.
15. CASTRO HERMIDA, J.A., FREIRE SANTOS, F., OTEIZA LOPEZ, A.M., VERGARA CASTIBLANCO, C.A., ARES MAZAS, M.E. .- *In vitro* and *in vivo* efficacy of lasalocid for treatment of experimental cryptosporidiosis.- *Veterinary Parasitology*, 2000, **90**, 265-70.
16. Centers for Disease Control and Prevention.- Preventing cryptosporidiosis : a guide for people with compromised immune systems.- (consultation le 20/11/01).- Adresse URL :
http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/cryptosporidiosis/factsht_crypto_prev_ent_ci.htm
17. CHARTIER, C., MALLEREAU, M.P., NACIRI, M. .- Prophylaxis using paromomycin of natural cryptosporidial infection in neonatal kids.- *Preventive Veterinary Medicine*, 1996, **25**, 357-61.
18. CHARTIER, C., MALLEREAU, M.P., LENFANT, D. .- Efficacité du lactate d'halofuginone dans la prévention de la cryptosporidiose chez le chevreau nouveau-né.- *Revue de Médecine Vétérinaire*, 1999, **150**, 4, 341-48.
19. CLARK, D.P. .- New insights into human cryptosporidiosis.- *Clinical Microbiology Revue*, 1999, **12**, 4, 554-63.
20. COLE, D.J., COHEN, N.D., SNOWDEN, K., SMITH, R. .- Prevalence and risk factors for fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in horses.- *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1998, **213**, 9, 1296-1302.
21. CONSTANT, F. .- Etiologie des diarrhées néonatales des veaux.- *Le Point Vétérinaire*, Octobre 2001, 219, 16-7.
22. DAVIS, L.J., ROBERTS, H.L., JURANEK, D.D., FRAMM, S.R., SOAVE, R. .- A survey of risk factors for cryptosporidiosis in New York City : drinking water and other exposures.- *Epidemiology and Infection*, 1998, **121**, 357-67.
23. DE GRAAF, D.C., VANOPDENBOSCH, E., ORTEGA-MORA, L.M., ABBASSI, H., PEETERS, J.E. .- A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals.- *International Journal for Parasitology*, 1999, **29**, 1269-87.
24. DELAUNAY, A., GARGALA, G., LI, X., FAVENNEC, L., BALLET, J.J. .- Quantitative flow cytometric evaluation of maximal *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in a neonate mouse model.- *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**, 10, 4315-7.
25. Division of biology, Kansas state university (consultation le 22/05/01).- *Cryptosporidium/coccidial/parasitology/research*, (en ligne).- Adresse URL : <http://www.ksu.edu/parasitology/> ;
 Pour les photographies :
<http://www.ksu.edu/parasitology/625tutorials/index.html>
26. DWORKIN, M.S., GOLDMAN, D.P., WELLS, T.G., KOBAYASHI, J.M., HERWALDT, B.L. .- Cyptosporidiosis in Washington State : an outbreak associated with well water.- *The Journal of Infectious Disease*, 1996, **174**, 1372-6.
27. EISENBERG, J.N.S., SETO, E.Y.W., COLFORD, J.M.Jr., OLIVIERI, A., SPEAR, R.C. . - An analysis of the Milwaukee cryptosporidiosis outbreak based on a dynamic model of the infection process.- *Epidemiology*, 1998, May, **9**, 3, 255-63.

28. FAIRLEY, C.K., SINCLAIR, M.I., RIZAK, S. .- Monitoring drinking water : the receding zero.- *Medical Journal of Australia*, 1999, **171**, 8, 397-8.
29. FAYER, R., GASBARRE, L., PASQUALI, P., CANALS, A., ALMERIA, S., ZARLENGA, D. .- *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates : dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns.- *International Journal for Parasitology*, 1998, **28**, 49-56.
30. FAYER, R., GRACZYK, T.K., CRANFIELD, M.R., TROUT, J.M. .- Gaseous disinfection of *Cryptosporidium parvum* oocysts.- *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**, 10, 3908-9.
31. FAYER, R., MORGAN, U.M., UPTON, S. .- Epidemiology of *Cryptosporidium* : transmission, detection and identification.- *International Journal for Parasitology*, 2000, **30**, 1305-22.
32. FREIRE-SANTOS, F., OTEIZA-LOPEZ, A.M., VERGARA-CASTIBLANCO, C.A., ARES-MAZAS, E., ALVAREZ-SUAREZ, E., GARCIA-MARTIN, O. .- Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve molluscs destined for human consumption.- *The Journal of Parasitology*, 2000, **86**, 4, 853-4.
33. FRICKER, C.R., CRABB, J.H. .- Water-borne cryptosporidiosis : detection methods and treatment options.- *Advances in Parasitology*, 1998, **40**, 241-78.
34. GLASER, C.A., SAFRIN, S., REINGOLD, A., NEWMAN, T.B. .- Association between *Cryptosporidium* infection and animal exposure in HIV-infected individuals.- *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, 1998, Jan, **17**, 1, 79-82.
35. GRIFFITHS, J.K. .- Human cryptosporidiosis : epidemiology, transmission, clinical disease, treatment, and diagnosis.- *Advances in Parasitology*, 1998, **40**, 37- 85.
36. HALLIER-SOULIER, S., GUILLOT, E. .- Detection of cryptosporidia and *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental water samples by immunomagnetic separation-polymerase chain reaction.- *Journal of Applied Microbiology*, 2000, **89**, 5-10.
37. HARP, J.A., GOFF, J.P. .- Strategies for the control of *Cryptosporidium parvum* in calves.- *Journal of Dairy Science*, 1998, **81**, 289-94.
38. HARP, J.A., FAYER, R., PESCH, B.A., JACKSON, G.J. .- Effect of pasteurization on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water and milk.- *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**, 8, 2866-8.
39. HARP, J.A., GOFF, J.P. .- Protection of calves with a vaccine against *Cryptosporidium parvum*.- *The Journal of Parasitology*, 1995, **81**, 1, 54-7.
40. HOAR, B.R., ATWILL, E.R., ELMI, C., UTTERBACK, W.W., EDMONDSON, A.J. .- Comparison of fecal samples collected per rectum and on the ground for estimation of environmental contamination attributable to beef cattle.- *American Journal of Veterinary Research*, 1999, **60**, 11, 1352-6.
41. HOXIE, N.J., DAVIS, J.P., VERGERONT, J.M., NASHOLD, R.D., BLAIR, K.A. .- Cryptosporidiosis-associated mortality following a massive waterborne outbreak in Milwaukee, Wisconsin.- *American Journal of Public Health*, 1997, Dec, **87**, 12, 2032-5.
42. JOHNSON, E.H., WINDSOR, J.J., MUIRHEAD, D.E., KING, G.J., AL-BUSAIDY, R. .- Confirmation of the prophylactic value of paromomycin in a natural outbreak of caprine cryptosporidiosis.- *Veterinary Research Communications*, 2000, **24**, 63-7.
43. KOZWICH, D., JOHANSEN, K.A., LANDAU, K., ROEHL, C.A., WORONOFF, S., ROEHL, P.A. .- Development of a novel, rapid integrated *Cryptosporidium*

- parvum* detection assay.- *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**, 7, 2711-7.
44. KUCZYNSKA, E., SHELTON, D.R. .- Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures, and soils.- *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, July, **65**, 7, 2820-6.
45. LEFAY, D., NACIRI, M., POIRIER, P., CHERMETTE, R. .- Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in suckling calves.- *Veterinary Record*, 2001, **148**, 4, 108-12.
46. LEFAY, D., NACIRI, M., POIRIER, P., CHERMETTE, R. .- Prevalence of *Cryptosporidium* infection in calves in France.- *Veterinary Parasitology*, 2000, **89**, 1-9.
47. LINDSAY, D.S., UPTON, S.J., OWENS, D.S., MORGAN, U.M., MEAD, J.R., BLAGBURN, B.L. .- *Cryptosporidium andersoni* n. Sp. (Apicomplexa : Cryptosporiidae) from cattle, *Bos Taurus*.- *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2000, **47**, 91-5.
48. MARTINS, C.A.P., GUERRANT, R.L. .- *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis.- *Parasitology today*, 1999, **15**, 8, 434-6.
49. MCKENZIE, D.M.A., DIFFAY, B.C. .- Diarrhoea associated with Cryptosporidial oocyst shedding in a Quarterhorse stallion.- *Australian Veterinary Journal*, 2000, **78**, 1, 27-8.
50. McLAUCHLIN, J., PEDRAZA-DIAZ, S., AMAR-HOETZENEDER, C., NICHOLS, G.L. .- Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhoea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis.- *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, Oct., **37**, 10, 3153-58.
51. McREYNOLDS, C.A., LAPPIN, M.R., UNGAR, B., McREYNOLDS, L.M., BRUNS, C., SPILKER, M.M., THRALL, M.A., REIF, J.S. .- Regional seroprevalence of *Cryptosporidium parvum*-specific Ig G of cats in the United states.- *Veterinary Parasitology*, 1999, Jan, **80**, 187-95.
52. MEDEMA, G.J., SCHETS, F.M., TEUNIS, P.F.M., HAVELAAR, A.H. .- Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water.- *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, Nov, **64**, 11, 4460-6.
53. MERRY, R.J., MAWDSLEY, J.L., BROOKS, A.E., DAVIES, D.R. .- Viability of *Cryptosporidium parvum* during ensilage of perennial ryegrass.- *Journal of Applied Microbiology*, 1997, **82**, 115-20.
54. MOHAMMED, H.O., WADE, S.E., SCHAAF, S. .- Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in dairy cattle in southeastern New York State.- *Veterinary Parasitology*, 1999, **83**, 1-13.
55. MORGAN, U.M., XIAO, L., MONIS, P., FALL, A., IRWIN, P.J., FAYER, R., DENHOLM, K.M., LIMOR, J., LAL, A., THOMPSON, R.C. .- *Cryptosporidium* spp. in domestic dogs : the «dog» genotype.- *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**, 5, 2220-3.
56. MORGAN, U.M., BUDDLE, J.R., ARMSON, A., ELLIOT, A., THOMPSON, R.C.A. .- Molecular and biological characterisation of *Cryptosporidium* in pigs.- *Australian Veterinary Journal*, 1999, Jan, **77**, 1, 44-7.
57. MORGAN, U.M., DEPLAZES, P., FORBES, D.A., SPANO, F., HERTZBERG, H., SARGENT, K.D., ELLIOT, A., THOMPSON, R.C.A. .- Sequence and PCR-RFLP analysis spacers of the rDNA repeat unit in isolates of *Cryptosporidium* from different hosts.- *Parasitology*, 1999, **118**, 49-58.
58. MORGAN, U.M., MONIS, P.T., FAYER, R., DEPLAZES, P., THOMPSON, R.C.A. .- Phylogenetic relationships among isolates of *Cryptosporidium* :

- evidence for several new species.- *The Journal of Parasitology*, 1999, **85**, 1126-33.
59. MORGAN, U.M., XIAO, L., FAYER, R., GRACZYK, T.K., LAL, A.A., DEPLAZES, P., THOMPSON, R.C.A. .- Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* isolates from captive reptiles using 18S rRNA sequence data and random amplified polymorphic DNA analysis.- *The Journal of Parasitology*, 1999, **85**, 525-30.
60. MORGAN, U.M., XIAO, L., FAYER, R., LAL, A.A., THOMPSON, R.C.A. .- Variation in *Cryptosporidium* : towards a taxonomic revision of the genus.- *International Journal for Parasitology*, 1999, **29**, 1733-51.
61. MORGAN, U.M., SARGENT, K.D., DEPLAZES, P., FORBES, D.A., SPANO, F., HERTZBERG, H., ELLIOT, A., THOMPSON, R.C. .- Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts.- *Parasitology*, 1998, Jul, **117**, Pt 1, 31-7.
62. MORGAN, U.M., THOMPSON, R.C.A. .- PCR detection of *Cryptosporidium* : the way forward ?- *Parasitology Today*, 1998, **14**, 6, 241-5.
63. MORGAN, U.M., CONSTANTINE, C.C., FORBES, D.A., THOMPSON, R.C.A. .- Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis.- *The Journal of Parasitology*, 1997, **83**, 5, 825-830.
64. MORRIS, R.D., NAUMOVA, E.N., GRIFFITHS, J.K. .- Did Milwaukee experience waterborne cryptosporidiosis before the large documented outbreak in 1993 ?- *Epidemiology*, 1998, May, **9**, 3, 264-70.
65. MTAMBO, M.M.A., NASH, A.S., BLEWETT, D.A., SMITH, H.V., WRIGHT, S. .- *Cryptosporidium* infection in cats : prevalence of infection in domestic and feral cats in the Glasgow area. *Veterinary Record*, 1991, Dec 7, 502-4.
66. NACIRI, M. .- Cryptosporidiose des ruminants et santé publique.- *Le Point Vétérinaire*, numéro spécial « Ruminants et santé publique », 1994, **26**, 49-55.
67. NACIRI, M., LEFAY, M.P., MANCASSOLA, R., POIRIER, P., CHERMETTE, R. .- Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France.- *Veterinary Parasitology*, 1999, **85**, 245-57.
68. NACIRI, M., MANCASSOLA, R., RICHARD, A. .- Etude de l'efficacité du décoquinate (DECCOX 6®) dans la prévention de la cryptosporidiose expérimentale du chevreau.- *Bulletin des GTV*, 1998, Sept-Oct, 3, 47-52.
69. NACIRI, M., MANCASSOLA, R., REPERANT, J., M, CANIVEZ., O, QUINQUE., B., YVORE, P. .- Treatment of experimental ovine cryptosporidiosis with ovine or bovine hyperimmune colostrum.- *Veterinary parasitology*, 1994, **53**, 173-190.
70. NACIRI, M., MANCASSOLA, R., YVORE, P., PEETERS, J.E. .- The effect of halofuginone lactate on experimental *Cryptosporidium parvum* infections in calves.- *Veterinary Parasitology* , 1993, **45**, 199-207.
71. National Center for Biotechnology Information (consultation le 22/05/01).- The NCBI Taxonomy homepage, (en ligne).- Adresse URL : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/>
72. O'DONOOGHUE, P. .- *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in Man and Animals.- *International Journal for Parasitology*, 1995, **25**, 2 , 139-95.
73. OKHUYSEN, P.C., CHAPPELL, C.L., CRABB, J., VALDEZ, L.M., DOUGLASS, E.T., DUPONT H.L. .- Prophylactic effect of bovine anti-*Cryptosporidium*

- hyperimmune colostrum immunoglobulin in healthy volunteers challenged with *Cryptosporidium parvum*.- *Clinical Infectious Diseases*, 1998, **26**, 1324-9.
74. ONG, C., MOOREHEAD, W., ROSS, A., ISSAC-RENTON, J. .- Studies of *Giardia* spp. And *Cryptosporidium* spp. in two adjacent watersheds.- *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**, 2798-2805.
75. Outbreak of cryptosporidiosis in north west England.- *Commun Dis Rep CDR Wkly*[en ligne], 1999, **9**, 20, 175-8. Adresse URL : Communicable Disease Report.- CDR WEEKLY - Back issues.- <http://www.phls.co.uk/publications/cdrw.htm#cdrreview>
76. PATEL, S., PEDRAZA-DIAZ, S., McLAUCHLIN, J., CASEMORE, D.P. .- Molecular characterisation of *Cryptosporidium parvum* from two large suspected waterborne outbreaks.- *Communicable Disease and Public Health*, 1998, Dec, **1**, 4,231-3.
77. PENG, M.M., XIAO, L., FREEMAN, A.R., ARROWOOD, M.J., ESCALANTE, A.A., WELTMAN, A.C., ONG, C., MAC, KENZIE, W.R., LAL, A.A., BEARD, C.B. .- Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates : evidence of two distinct human transmission cycles.- *Emerging Infectious Diseases*, 1997, Oct-Dec, **3**, 4, 567-73.
78. PEREIRA, M.D., ATTWILL, E.R., JONES, T. .- Comparison of sensitivity of immunofluorescent microscopy to that of a combination of immunofluorescent microscopy and immunomagnetic separation for detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in adult bovine feces.- *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, Jul, **65**, 7, 3236-9.
79. PERRYMAN, L.E., KAPIL, S.J., JONES, M.L., HUNT, E.L. .- Protection of calves against cryptosporidiosis with immune bovine colostrum induced by a *Cryptosporidium parvum* recombinant protein.- *Vaccine*, 1999, **17**, 2142-9.
80. QI DENG, M., CLIVER, D.O. .- *Cryptosporidium parvum* studies with dairy products.- *International Journal of Food Microbiology*, 1999, **46**, 2, 113-21.
81. QUIROZ, E.S., BERN, C., MacARTHUR, J.R., XIAO, L., FLETCHER, M., ARROWOOD, M.J., SHAY, D.K., LEVY, M.E., GLASS, R.I., LAL, A. .- An outbreak of cryptosporidiosis linked to a foodhandler.- *The Journal of Infectious Diseases*, 2000, **181**, 695-700.
82. ROBERTSON, I.D., IRWIN, P.J., LYMBERY, A.J., THOMPSON, R.C.A. .- The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses.- *International Journal for Parasitology*, 2000, **30**, 1369-77.
83. ROCHELLE, P.A., DE LEON, R., JOHNSON, A., STEWART, M.H., WOLFE, R.L. .- Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of infectious *Cryptosporidium parvum* ookysts from environmental samples.- *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**, 2, 841-5.
84. SAGODIRA, S., BUZONI-GATEL, D., IOCHMANN, S., NACIRI, M., BOUT, D. .- Protection of kids against *Cryptosporidium parvum* infection after immunization of dams with CP15-DNA.- *Vaccine*, 1999, **17**, 2346-55.
85. SARGENT, K.D., MORGAN, U.M., ELLIOT, A., THOMPSON, R.C.A. .- Morphological and genetic characterisation of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats.- *Veterinary Parasitology*, 1998, **77**, 221-7.
86. SCOTT, C.A., SMITH, H.V., MTAMBO, M.M.A., GIBBS, H.A. .- An epidemiological study of *Cryptosporidium parvum* in two herds of adult beef cattle.- *Veterinary parasitology*, 1995, **57**, 277-288.
87. SHIANKA, K.V., RYTTER, R., SPANIER, J.G. .- Randomly amplified polymorphic DNA PCR analysis of bovine *Cryptosporidium parvum* strains

- isolated from the watershed of the Red River of the North.- *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, June, **64**, 6, 2262-5.
88. SISCHO, W.M., ATWILL, E.R., LANYON, L.E., GEORGE, J. .- Cryptosporidia on dairy farms and the role these farms may have in contaminating surface water supplies in the northeastern United States.- *Preventive Veterinary Medicine*, 2000, **43**, 253-67.
89. SKERRETT, HE., HOLLAND, CV. .- Asymptomatic shedding of *Cryptosporidium* oocysts by red deer hinds and calves.- *Veterinary Parasitology*, 2001, **94**, 239-46.
90. SLIFKO, T.R., SMITH, H.V., ROSE, J.B. .- Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal for Parasitology*, 2000, **30**, 1379-93.
91. SMITH, H.V., ROSE, J.B. .- Waterborne cryptosporidiosis : current status.- *Parasitology today*, 1998, **14**, 14-
92. SPANO, F., CRISANTI, A. .- *Cryptosporidium parvum* : the many secrets of a small genome.- *International Journal for Parasitology*, 2000, **30**, 553-65.
93. SPANO, F., PUTIGNANI, L., CRISANTI, A., SALICANDRO, P., MORGAN, U.M., LE BLANCQ, S.M., TCHACK, L., TZIPORI, S., WIDMER, G. .- Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from different hosts and geographical origins.- *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, Nov., **36**, 11, 3255-9.
94. SULAIMAN, I.M., XIAO, L., YANG, C., ESCALANTE, L., MOORE, A., BEARD, C.B., ARROWOOD, M.J., LAL, A.A. .- Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*.- *Emerging Infectious Diseases*, 1998, Oct-Dec, **4**, 4, 681-5.
95. The Ohio State University - College of biological sciences.- Graphic Images of Parasites.- *Cryptosporidium parvum* - Cryptosporidiosis.- (consultation le 23/10/01).-
Adresse URL : <http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/cryptosporidium.html>
96. TZIPORI, S. .- Cryptosporidiosis : laboratory investigations and chemotherapy.- *Advances in Parasitology*, 1998, **40**, 187-221.
97. TZIPORI, S., GRIFFITHS, J.K. .- Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*.- *Advances in Parasitology*, 1998, **40**, 5-36.
98. WARD, H., CEVALLOS, A.M. .- *Cryptosporidium* : molecular basis of host-parasite interaction.- *Advances in Parasitology*, 1998, **40**, 151-85.
99. Waterborne cryptosporidiosis.- Commun Dis Rep CDR Wkly [en ligne], 1998, Dec, **8**, 49, 431-4. Adresse URL : Communicable Disease Report.- CDR WEEKLY - Back issues.-
<http://www.phls.co.uk/publications/cdrw.htm#cdrreview>
100. WIDMER, G., ORBACZ, E.A., TZIPORI, S. .- β -tubulin mRNA as a marker of *Cryptosporidium parvum* ookyst viability.- *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, Apr., **65**, 1584-8.
101. WIDMER, G. .- Genetic heterogeneity and PCR detection of *Cryptosporidium parvum*.- *Advances in Parasitology*, 1998, **40**, 223-39.
102. WIDMER, G., TCHACK, L., CHAPPELL, C.L., TZIPORI, S. .- Sequence polymorphism in the β -tubulin gene reveals heterogeneous and variable population structures in *Cryptosporidium parvum*.- *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, Nov, **64**, 11, 4477-81.
103. WILLOCKS, L., CRAMPIN, A., MILNE, L., SENG, C., SUSMAN, M., GAIR, R., MOULSDALE, M., SHAIFI, S., WALL, R., WIGGINS, R., LIGHTFOOT, N. .-

- A large outbreak of cryptosporidiosis associated with a public water supply from a deep chalk borehole.- *Communicable Disease and Public Health*, 1998, Dec, **1**, 4, 239-43.
104. WOODS, K.M., NESTERENKO, M.V., UPTON, S.J. .- Efficacy of 101 antimicrobials and other agents on the development of *Cryptosporidium parvum* *in vitro*.- *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 1996, **90**, 6, 603-15.
105. XIAO, L., ALDERISIO, K., LIMOR, J., ROYER, M., LAL, A.A. .- Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**, 12, 5492-8.
106. XIAO, L., MORGAN, U.M., FAYER, R., THOMPSON, R.C., LAL, A.A. .- *Cryptosporidium* systematics and implications for public health.- *Parasitology Today*, 2000, **16**, 7, 287-92.
107. XIAO, L., ESCALANTE, L., YANG, C., SULAIMAN, I., ESCALANTE, A.A., MONTALI, R.J., FAYER, R., LAL, A.A. .- Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus.- *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, Apr., **65**, 4, 1578-83.
108. XIAO, L., MORGAN, U.M., LIMOR, J., ESCALANTE, A., ARROWOOD, M., SHULAW, W., THOMPSON, R.C.A., FAYER, R., LAL, A.A. .- Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species.- *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**, 3386-91.

ANNEXE

Année	Localité	Nombre de cas	Cause
1984	Braun station, Texas	2006	Contamination source par eaux d'égouts
1986	Great Yarmouth, RU	36	Inconnue
1987	Carrollton, GA	12960	Déficience traitement de l'eau
1988	Ayrshire, RU	27	Déficience traitement de l'eau
1989	Oxfordshire, RU	516	Déficience traitement de l'eau
1990	Loch Lomond, RU	442	Déficience traitement de l'eau
1990-91	Thanet, RU	47	Déficience traitement de l'eau
1991	London, RU	44	Déficience traitement de l'eau
1991	Berks county, PA	551	Déficience traitement de l'eau
1992	South Devon, RU	?	Contamination eau de boisson
1992	North west, RU	42	Contamination eau de boisson
1992	North west, RU	63	Contamination eau de boisson
1992	South west, RU	108	Contamination eau de boisson
1992	Jackson county, Oregon	15000	Déficience traitement de l'eau
1992	Yorkshire, RU	125	Contamination eau du robinet
1992	Mersey, RU	47	Contamination eau du robinet
1992	Bradford, RU	125	Contamination eau du robinet
1992-93	Warrington, RU	47	Contamination eau du robinet
1993	Milwaukee, Wisconsin	403000	Déficience traitement de l'eau
1993	Waterloo, Canada	> 1000	Contamination eau du robinet
1993	Las Vegas, Nevada	103	Inconnue
1993	Wessex, RU	40	Contamination eau du robinet
1993	Northern, RU	5	Contamination eau université
1993	Yorkshire, RU	97	Contamination eau du robinet
1993	Wessex, RU	27	Contamination eau du robinet
1993	Central Maine	> 150	Contamination cidre de pomme
1994	Kanagawa, Japon	461	Contamination eau de boisson
1994	Walla Walla, WA	104	Contamination source par eaux d'égouts
1994	SW Thames, Wessex, Oxford, RU	224	Contamination eau du robinet
1994	Trent, RU	33	Contamination eau du robinet

Année	Localité	Nombre de cas	Cause
1995	Gainesville, Florida	77	Contamination eau du robinet
1995	Torbay, Devon, RU	575	Eau de rivière
1995	Italie	294	Réservoir d'eau
1995	South West, RU	575	Contamination eau du robinet
1995	Irlande	13	Visite à la ferme
1995	Minnesota	50	Aliment contaminé
1996	Eagle Harbor, Florida	16	Inconnue
1996	Kelowna, BC	environ 14500	Eau non filtrée
1996	Cranbrook, BC	environ 2097	Eau non filtrée
1996	Ogose, Japon	> 9000	Eau non filtrée
1996	Northern England	environ 126	Contamination eau de boisson
1996	Yorkshire, RU	20	Contamination eau de boisson
1996	Northern-western England	?	Contamination eau de boisson
1996	New York	> 30	Contamination cidre de pomme
1996	Collingwood, Ontario	environ 182	Eau non filtrée
1997	Shoal lake, Ontario	environ 100	Eau non filtrée
1997	North Thames, RU	345	Eau de forage filtrée
1997	England, Wales	> 4321	Multiples
1998	Chiliwack, BC	30	Inconnue
1998	Brushy creek, Texas	32	Contamination source par eaux d'égouts
1998	Spokane, WA	environ 54	Inconnue
1999	Hawke's Bay, New Zealand	20	Inconnue
1999	North Island, New Zealand	?	Inconnue
1999	North-west England	environ 360	Eau non filtrée