

La république algérienne démocratique et populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
جامعة عمار ثلجي بالأغواط
Université Ammar Thelidji – Laghouat
كلية العلوم
Faculté Des Sciences
قسم البيولوجيا
Département De Biologie



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de master
Filière : Science Biologique
Option : Parasitologie

Thème

Comparaison de deux méthodes de diagnostic de la cryptosporidiose chez les veaux des régions méridionales et septentrionales.

Rédigé par : BENCHARIF Soumya
DJELLOULI Meriem

Devant le jury :

Président :	Mr GOUZI Hicham	Professeur
Examineur :	Mr BENACER Farouk	Maitre des conférences B
Promoteur :	Mr CHAIBI Rachid	Maitre des conférences A

Soutenu le : 08/07/2019

La république algérienne démocratique et populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
جامعة عمار ثلجي بالأغواط
Université Ammar Thelidji – Laghouat
كلية العلوم
Faculté Des Sciences
قسم البيولوجيا
Département De Biologie



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de master
Filière : Science Biologique
Option : Parasitologie

Thème

Comparaison de deux méthodes de diagnostic de la cryptosporidiose chez les veaux des régions méridionales et septentrionales.

Rédigé par : BENCHARIF Soumya
DJELLOULI Meriem

Devant le jury :

Président :	Mr GOUZI Hicham	Professeur
Examineur :	Mr BENACER Farouk	Maitre des conférences B
Promoteur :	Mr CHAIBI Rachid	Maitre des conférences A

Soutenu le : 08/07/2019

Remerciements

AU NOM D'ALLAH LE MISERICORDIEUX LE TOUT MISERICORDIEUX

El Hamdoulillah qui nous a guidés durant cette année d'étude, merci dieu de nous avoir donné la volonté et le courage d'effectuer ce travail.

Mr Chaibi Rachid, notre promoteur merci d'abord d'avoir accepté de diriger ce travail, ensuite pour ses encouragements et sa faculté de simplifier les choses lorsqu'elle nous paraissait difficile, ainsi que sa disponibilité et de son aide précieuse.

Nous remercions ;

Mr Brihoum Brahim, notre collègue et frère pour son aide, sa présence à nos coté tout le long du travail, et ses précieux conseils confraternels et fraternels.

Dr Magtouf.L, Merci de sa disponibilité et ses encouragements.

Teggari Israa, Bouchouireb Hasna et Yagoubi Inès pour leurs aides et encouragements.

Nos remerciements s'adressent aux membres du jury qui ont accepté d'examiner notre travail.

Et enfin nous remercions tous nos collègues et amis et tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Au nom de dieu, le créateur des cieux, avec son aide que j'ai réalisé ce travail.

Une prière et un hommage pour mon amour et défunt neveu et fils
YOUNES BENCHARIF *partit à la fleur de l'âge, tous mes*
grands-parents Younes, Mohamed Sadek, Saliha et tante Fifi je vous
aime vous me manquez tellement, que dieu vous accueille dans son vaste
paradis.

A mon mari : Bait Sofiane qui à toujours était à mes cotés depuis 22 ans, de ma première année à l'Ecole National Vétérinaire El Harrach à mon Mastère à l'université de Laghouat, son soutien infailible, et qui a toujours les bons mots qui m'encourage à aller de l'avant, tous les mots ne pourrons exprimer mes remerciements et ma gratitude.

A mes parents : Je dédie ce travail à ma maman chérie **Bouzar Nacera**, et mon papa chéri **Abdelhamid**, qui ont toujours cru en moi que dieu vous garde pour nous, je ne saurais vous exprimer tous l'amour, la reconnaissance et la gratitude que j'ai pour vous.

A mes beaux parents : **MALIKA Moulai** et mon beau père **Bait Mohamed**, mes chers parents je ne saurai vous remercier pour vos prières qui m'accompagnent et qui me protègent chaque jour, et l'amour paternel et maternel que vous me témoignez tant, je vous aime.

A mes chères filles : **NOUHA, Mouna et Jana**, d'ont laide l'affection et l'amour me comble et permet d'avancer chaque jour dans la vie. A votre succès inchallah, mes filles vous êtes ma joie de vivre et ma lumière.

A mes Nièces et neveux : mes enfants je vous adore, Sérine, Lyna, Wael, Israa, ahmed, Anes, Louai que dieu vous protège.

A ma sœur et mon beau-frère : **Isma et Lotfi Krimat**, Merci ma chère sœur pour tous les appels que je reçois chaque matin de bonheur, pour demander après moi, love you so much sister

A mes frères et belle sœur Abdelkrim Lamia et Mehdi : je vous aime tant.

A mes beaux-frères et belles sœurs: Hichem, Amer, Nawel, Souhila et Ouerd Yasmine, ma deuxième familles.

A ma Grand-mère : Bencharif Safia, yema je t'adore.

A mes oncles et tantes cousins et cousines paternels et maternels.

A mes Collègues frères et sœur du Laboratoire ma deuxième famille.

A Ma chère Meriem Djellouli

Soumya

Dédicace

Au Nom de DIEU tout Puissant Le Miséricordieux

Toutes les lettres ne seraient trouver les mots qu'il faut....Tous les mots ne seraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance....Aussi, c'est tout simplement que je dédie ce travail....

À Mon très cher neveu, Mohammed Jawad Abderrahmane :

L'ange dont je n'ai pas pu prendre entre mes bras et qui nous a quitté à la fleur de l'âge mais qui a captivé et pris nos cœurs, en si peu de temps... On ne t'oubliera jamais ... Que le bon Dieu le tout Puissant t'Accorde Sa Sainte Miséricorde et t'accueille en Son vaste Paradis Jannet al-Firdaws.

À mes très chers parents :

Aucune dédicace ne serait très assez éloquente pour exprimer la profondeur des sentiments d'affection, d'estime et de respect que je vous porte, pour l'amour et la bienveillance dont vous m'avez toujours comblé, l'éducation et le bien être que vous m'assurez, pour votre soutien, vos sacrifices et vos prières. Aussi fière à en être digne.

À mes chères frères et sœurs :

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées pour leur inlassable soutient, amour, soucis, et aide ; que Dieu les garde pour moi

À mes nièces et neveux que j'aime tant.

À mes grandes mères, tantes et oncles maternels et paternels.

À mes très chers défunts : grand-père Djelloul et tante Fatma

Que leur Accorde sa Miséricorde et l'Accueil en Son Vaste Paradis Inchallah

À mes belles sœurs et mon beau-frère.

À tous mes amis et collègues, chacun par son nom :

Pour tous les merveilleux moments que nous avons passés ensemble dans un environnement familial.

À tous mes professeurs, encadrant et jurys :

Il vous revient le mérite de nous avoir prodigué un enseignement profitable et une formation complète; Qui nous ont prodigués de conseils et de sagesse pour réussir notre parcours et consolider notre formation

À tous ceux ou celles qui me sont chers et que j'ai omis involontairement de citer

À tous ceux qui ont contribué à la réussite de ce travail

A Ma chère Soumia Bencharif

Meriem

TABLES DES FIGURES

Figure 1 : Taxinomie simplifiée de <i>Cryptosporidium</i>	6
Figure 2 : Cycle évolutif de <i>Cryptosporidium</i> spp. dans l'intestin grele, demontrant les étapes intracellulaires et extracellulaires connues (d'apresHijjawi et al, 2004; Barta et Thompson, 2006).....	9
Figure 3 : Microphotographie du trophozoite (ME à transmission) (Valigurova <i>et al.</i> ,2008)... ..	10
Figure 4 : Image au microscope électronique d'un méronte immature contenant des mérozoïtes (Source : KJP).....	11
Figure 5a : Microphotographie du méronte (ME à balayage) (Valigurova <i>et al.</i> ,2008) m: mérozoïte ; rb : corps résiduel..... ;.....	11
Figure 5b : Ultrastructure du mérozoite x24000 (Fayer et Ungar 1986)d: granules denses; N: noyau; P: pellicule.....	11
Figure 6 : Macrogamonte (A : Microphotographie (ME à transmission) x12000) (Fayer et Ungar 1986) - B : Ultrastructure (Valigurova <i>et al.</i> ,2008). fo : organite nourricier; er: réticulum endoplasmique; N: noyau; V: vacuole.....	12
Figure7 : Microgamonte (A : Ultrastrucure X 18800) (Current, 1989) - B : Microphotographie (ME à transmission (Valigurova <i>et al.</i> ,2008). - Fo: organite nourricier; Mi : microgamète; Pv : vacuole parasitophore).....	12
Figure 8 a : Image au microscope électronique d'un oocyste et de deux sporozoïtes matures (Source : KJP).....	13
Figure 8 b : Microphotographie du sporozoite (ME à balayage) (Valigurova <i>et al.</i> ,2008). mv : microvillosités.....	13
Figure 9 : Prévalence d'excrétion d'oocyste de <i>Cryptosporidium</i> par tranche d'âge dans les élevages de bovins laitiers.....	17
Figure 10 : Oocystes de <i>Cryptosporidium</i> sp en microscopie optique. (Source : Dr. Peter Drotman, Public Domain Images).....	25
Figure 11 : Coloration d'oocystes de <i>Cryptosporidium</i> à la fuschine (Source : MEYUS sur le site internet VETOFOCUS.....	27
Figure 12 : Coloration d'oocystes de <i>Cryptosporidium</i> à l'auramine-rhodamine (Source : CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC)).....	28
Figure 13 : Image d'oocystes de <i>Cryptosporidium</i> révélés par des anticorps Immunofluorescents (Source : CDC).....	29

Figure 14 : Coupe histologique colorée à l'Hémalin-Eosine-Safran d'un intestin parasité Par <i>Cryptosporidium parvum</i> (Source : NARO).....	32
Figure 15: Les principales formations géographiques en Algérie (FAO, 2003).....	34
Figure 16: Coupe topographique de l'Algérie Cote, (1981) (modifie).....	34
Figure 17: Diagramme ombrothermique et variation de la température de la Wilaya d'El- Bayadh.....	36
Figure 18 : Diagramme ombrothermique et variation de la température de la Wilaya de Laghouat.....	37
Figure 19 : Diagramme ombrothermique et variation de la température de la Wilaya de Djelfa.....	38
Figure 20 : Diagramme ombrothermique et variation de la température de la Wilaya de Ghardaia.....	39
Figure 21: Diagramme ombrothermique et variation de la température de la Wilaya d'Ouargla.....	39
Figure 22 : questionnaire à remplir.....	43
Figure 23 : Organigramme de la méthode de travail.....	46
Figure 24 : Etalement du frottis.....	47
Figure 25 : Séchage des lames.....	47
Figure 26 : coloration des lames à la fushine.....	48
Figure 27 : rinçage des lames.....	48
Figure 28 : coloration des lames au vert malachite.....	49
Figure 29 : Observation microscopique.....	49
Figure 30 : Oocyste de <i>Cryptosporidium</i> . Sp après coloration de ziehl Neelsen Grossissement X40	50
Figure 31 : Oocyste de <i>Cryptosporidium</i> . Sp après coloration de ziehl Neelsen Grossissement X100.....	50
Figure 32 : les constituants du kit ELISA.....	51
Figure 33 : Plaque et lecteur ELISA.....	53
Figure 34 : La répartition des veaux sains et diarrhéiques de l'étude.....	55
Figure 35 : Répartition des veaux selon leurs parasitismes.....	56
Figure 36 : Pourcentage des effectifs en fonction de l'âge.....	56
Figure 37: Tranches d'âges des veaux prélevés au niveau de la wilaya d'El Bayadh.....	57
Figure 38 : Les veaux positifs par rapport à la tranche d'âge au niveau de la wilaya d'El Bayadh.....	58

Figure 39 : la prévalence du <i>Cryptosporidium.sp</i> selon les tranches d'âge au niveau de la wilaya de Ghardaïa.....	59
Figure 40 : Le nombre des veaux positifs par rapport à la tranche d'âge au niveau de la wilaya de Ghardaïa.....	59
Figure 41 : Les tranches d'âge au niveau de la wilaya de Djelfa.....	60
Figure 42 : le nombre des veaux positifs par rapport à la tranche d'âge au niveau de la wilaya de Djelfa.....	61
Figure 43 : Répartition des veaux par tranches d'âges au niveau de la wilaya de Laghouat.....	61
Figure 44 : Les veaux positifs par rapport à la tranche d'âge au niveau de la wilaya de Laghouat.....	62
Figure 45 : la Répartition des veaux par tranches d'âge au niveau de la wilaya de Laghouat.....	63
Figure 46 : Le nombre de veaux positifs par rapport à la tranche d'âge au niveau de la Wilaya d'Ouargla.....	63
Figure 47 : Le nombre de veaux atteint au <i>Cryptosporidium sp</i> tous tests confondus.....	64
Figure 48 : La prévalence de tous tests confondus.....	65
Figure 49 : la Prévalence totale du <i>Cryptosporidium sp</i> des deux tests utilisés à travers les Cinq wilayas.....	66

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Espèces reconnues de <i>Cryptosporidium</i> pouvant infecter l'humain et leurs différents hôtes (Xiao and Ryan, 2004).....	8
Tableau 2: Désinfectants efficaces contre <i>Cryptosporidium</i> sp.....	24
Tableau 3 : Taille des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> sp.....	25
Tableau 4 : Taille des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> sp.....	45
Tableau 5 : Pourcentage des veaux sains et diarrhéique.....	55
Tableau 6 : La répartition des veaux selon leurs parasitismes.....	55
Tableau 7 : Les effectifs des veaux selon la tranche d'âge.....	56
Tableau 8: Les tranches d'âge des veaux prélevés au niveau de la wilaya d'El Bayadh.....	57
Tableau 9 : Les veaux positifs par tranche d'âge au niveau de la wilaya d'El Bayadh.....	58
Tableau 10 : Répartition des veaux par tranche d'âge au niveau de la wilaya de Ghardaïa.....	58
Tableau 11: Les veaux positifs par tranche d'âge au niveau de la wilaya de Ghardaïa.....	59
Tableau 12 : Répartition des effectifs par tranche d'âge au niveau de la wilaya de Djelfa.....	60
Tableau 13 : Les veaux positifs par rapport à la tranche d'âge au niveau de la wilaya de Djelfa.....	60
Tableau 14: Répartition des effectifs par tranche d'âge au niveau de la wilaya de Laghouat.....	61
Tableau 15 : Les veaux positifs par rapport à la tranche d'âge au niveau de la wilaya de Laghouat.....	62
Tableau 16 : La Répartition des veaux par tranches d'âge au niveau de la wilaya de Laghouat.....	62
Tableau 17 : Les veaux positifs par rapport à la tranche d'âge au niveau de la wilaya de Ouargla.....	63
Tableau 18 : Le taux d'atteinte au <i>Cryptosporidium</i> sp tout tests confondus.....	64
Tableau 19 : Taux d'atteinte de la cryptosporidiose tout tests confondus.....	64
Tableau 20 : Prévalence total des deux tests à travers les 5 wilayas.....	65

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ELISA : Enzym Linked Immunosorbent Assay : dosage d'immunoabsorption par enzyme liée ; c.-à-d. : dosage immuno-enzymatique sur support solide

p.p.m : partie par million

BSk : Climat semi-aride froid (système de classification de Köppen)

BWk : Climat désertique froid (système de classification de Köppen)

BWh : Climat chaud et désertique (système de classification de Köppen)

ملخص

الكريبتوسبورديوسيس هو مرض حيواني المنشأ له تأثير على الصحة العامة والحيوانية بسبب مشاركته في تلوث المياه وحيوانات المزرعة؛ قادنا ذلك إلى مقارنة طريقتين تحليليتين على البراز من 250 عجلًا من 5 ولايات: البيض ، الأغواط ، ورقلة ، غرداية ، وجلفة.

حصلنا على معدل إيجابي عام قدره 27.2٪ مع تقنية تلوين زيل نيلسن الكلاسيكية مقارنة مع التقنية المناعية إليزا 36.8٪، بزيادة قدرها 7.6٪ في تشخيص داء الكريبتوسبورديوسيس .

وجدنا أيضًا أن الزيادة ملحوظة في المناطق الموبوءة ويصبح الفرق بين الطريقتين أكثر أهمية.

الكلمات المفتاحية: الكريبتوسبورديوسيس العجول تلوين زيل نيلسن ، إليزا،

Résumé

La cryptosporidiose est une zoonose ayant un impacte de santé publique et économique de part son implication dans la contamination des eaux et des animaux d'élevages.

Ceci nous a conduit à comparer deux techniques d'analyses sur des selles de 250 veaux issus de 5 wilayas : El Bayadh, Laghouat, Ouargla, Ghardaïa, et Djelfa.

Nous avons obtenu un taux de positivité générale de 27.2% avec la technique classique de coloration de Ziehl Neelsen contre un taux de 36.8% en technique ELISA, soit une augmentation de 7.6% dans le diagnostic de la cryptosporidiose.

Nous avons constaté par ailleurs qu'en zone endémique l'augmentation est plus marquée et la différence entre les deux méthodes devient plus importante ;

Les mots clés: Cryptosporidiose, Veaux, Coloration Ziehl Neelsen, ELISA,

Abstract

Cryptosporidiosis is a zoonosis with a public health and economic impact due to its involvement in the contamination of water and farm animals.

This led us to compare two analysis techniques on stool of 250 calves from 5 wilayas: El Bayadh, Laghouat, Ouargla, Ghardaia, and Djelfa.

We obtained a general positivity rate of 27.2% with the classic Ziehl Neelsen staining technique compared to a 36.8% ELISA technique, an increase of 7.6% in the diagnosis of cryptosporidiosis.

We also found that in endemic areas the increase is more marked and the difference between the two methods becomes more important;

Key words: Cryptosporidiosis, Ziehl Neelsen staining, ELISA, Calves

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	I
TABLE DES FIGURES.....	II
TABLE DES TABLEAUX.....	V
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VI
INTRODUCTION.....	1
<u>CHAPITRE 1: CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE.....</u>	3
I. LES DIARRHÉES NÉONATALE CHEZ LE VEAU	4
I.1. Définition de la Cryptosporidiose.....	4
I.2. Historique : Découverte du parasite.....	4
II. BIOLOGIE GENERALE DES CRYPTOSPORIDIES.....	5
II.1. Taxinomie.....	6
II.2. Espèces du genre <i>Cryptosporidium</i>	7
III. Cycle évolutif.....	8
III.1. Caractéristiques du cycle.....	8
(a) Excystation	10
(b).Mérogonie.....	10
(c) Gamétogonie.....	11
(d) Sporogonie ou sporulation	12
III.2. Particularités du cycle du <i>Cryptosporidium</i>	13
III.3. Résistance des oocystes.....	14
III.3.1. Résistance dans l'environnement.....	14
III.3.1.1. Résistance dans l'eau.....	14
III.3.1.2. Résistance hors de l'eau.....	15
III.3.2. Résistance aux procédés de désinfection.....	16
IV. Epidémiologie des Cryptosporidiose.....	16
IV.1. Répartition géographique et prévalence de la Cryptosporidiose.....	16
IV.2. Sources du parasite.....	16
IV.2.1. Les jeunes animaux du troupeau	16
IV.2.2. Les mères	17
IV.2.3. Les animaux sauvages et les rongeurs	18

IV.2.4. L'eau	18
IV.3. Modes de transmission :.....	18
IV.3.1. Transport mécanique dans le sol et par les hôtes	19
IV.4. Critères de sensibilité de l'hôte.....	19
IV.4.1. La race	19
IV.4.2. L'âge	20
IV.4.3. Le statut immunitaire	20
IV.4.4. Facteurs de risque.....	20
IV.4.4.1. La saison	20
IV.4.4.2. La densité animale.....	21
IV.4.4.3. La conduite d'élevage	21
IV.4.4.4. Le rôle de l'épandage du fumier	22
V. Contexte prophylaxie et traitement	22
VI. Décontamination et désinfectants utiles	23
VII. Méthodes Diagnostic de la Cryptosporidiose	24
VII.1. Diagnostic épidémiologique et clinique.....	24
VII.2. Diagnostic de laboratoire.....	24
VII.2.1 Description macroscopique	25
VII.2.2. Microscopie conventionnelle.....	25
VII.2.2.1. Méthodes de concentration	26
VII.2.2.2. Méthodes de coloration	26
(a) La coloration au saccharose	26
(b) Coloration de Heine.....	27
(c) Coloration à l'auramine---fuschinecarbolique.....	27
(d) Coloration de Ziehl---Neelsen modifiée.....	28
VII.2.3. Méthodes immunologiques.....	29
(a) Immuno-fluorescence directe.....	29
(b) Immunochromatographie	29
(c) ELISA.....	30
VII.2.4. Diagnostic de biologie moléculaire.....	30
(a) Les marqueurs génétiques	30
(b) L'hybridation in situ en fluorescence	30
(c) La Réaction de Polymérisation en Chaîne(PCR).....	30

VII.2.5. Cytométrie de flux.....	31
VII.2.6. Diagnostic histologique.....	32
VIII. Cadre de l'étude.....	33
VIII.1. Délimitation géographique de la région et des sites d'étude.....	33
VIII.2. Bioclimatologie.....	33
VIII.3. Aspect géomorphologique et hydrographique.....	33
(a) Données géomorphologiques.....	33
(b) Données hydrologiques.....	35
VIII.4. Les caractéristiques climatiques de l'Algérie	35
VIII.4. 1. Climat de la wilaya d'El Bayadh	35
VIII.4. 2. Climat de la wilaya de Laghouat.....	36
VIII.4.3 Climat de la wilaya de Djelfa	37
VIII.4.4 Climat de la wilaya de Ghardaïa	38
VIII.4.5 Climat de la wilaya d'Ouargla	39
<u>CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</u>	41
<u>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS ET DISSCUSSION.....</u>	54
CONCLUSION.....	69
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	71

INTRODUCTION

1. Introduction

La production laitière en Algérie préoccupe au plus haut point les autorités du pays. L'Algérie est classée troisième importateur mondial de lait (Amellal R, 1995), de ce fait, le ministère de l'agriculture a pris une série de mesures, visant à diminuer la facture d'importation de cette denrée élémentaire et précieuse dans les foyers algériens.

L'une des plus importantes décisions est celle d'augmenter les effectifs locaux de bovins ; Ceci par (i) la multiplication des surfaces fourragères à travers le territoire national, axant sur la mise en valeur des terres du sud du pays, (ii) une incitation meilleure à l'organisation des éleveurs (iii) et par l'octroi de crédit financier.

Le but principal étant d'encourager le repeuplement progressif de nos élevages à partir de veaux nés en Algérie. Le veau constitue la matière première dans toute production car c'est d'abord et avant tout la future génisse productrice de lait, aussi le futur taureau géniteur, ainsi que le futur veau de boucherie pour la production de viande.

La période néonatale du veau doit faire l'objet d'une grande attention car elle constitue la phase la plus sensible et la plus fragile de sa vie.

Malheureusement les pertes des veaux en Algérie sont importantes ; elle s'élèvera à un taux de 24.15% dont la principale cause est d'ordre digestif avec un taux de 45%. (science & technologie c, 2007), en effet les gastroentérites sont les maladies les plus rencontrées pendant cette phase de la vie du veau qui est capital du point de vue de la trilogie santé, économie et médicale.

L'aspect économique de la maladie repose sur le fait que le veau est très sensible du jour de sa naissance jusqu'à la 8ème semaine, les mortalités et les morbidités constitueront une perte pour l'éleveur soit par la perte de l'animal, ou par le coût du traitement le plus souvent inefficace, sans omettre les effets d'une telle maladie provoquant un retard de croissance.

Du point de vue médical la diarrhée néonatale représente une menace certaine car la mort conclut souvent l'évolution clinique (Teinturier et Bezille, 1981), aucun traitement curatif n'est totalement efficace certains médicaments ont une activité partielle.

Non contente d'être une maladie intestinale grave, la cryptosporidiose est également transmissible à l'homme c'est une zoonose, et au moins 4 agents de cette maladie sont infectants pour l'homme, cette parasitose humaine constitue l'une des premières causes de morbidités dans le monde (I.J.I.A.S, 2013)

Devant cette trilogie il nous ai apparu primordial d'effectuer ce travail consistant à évaluer l'incidence de cette maladie sur les élevages de veaux dans le régions méridionales septentrionales, régions considérées comme le futur bassin laitier de l'Algérie et ainsi viser par ce modeste travail a établir un diagnostic précoce, reposant sur une méthode fiable et rentable d'une part pour l'éleveur et d'autre part pour la santé publique et l'environnement.

CHAPITRE 1
CONTEXTE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les diarrhées néonatales chez le veau :

En élevage bovin, les diarrhées néonatales peuvent occasionner des pertes économiques sévères, en raison du fort taux de mortalité, des coûts de traitements, et du possible retard de croissance qui les accompagnent. Elle est généralement le symptôme d'une infection gastro-intestinale est due à plusieurs agents infectieux sont responsables de diarrhée et peuvent coexister, voire se succéder sur un même veau, ce qui complique leur identification précise.

- Les **parasites**, comme *Cryptosporidium parvum*, *Eimeriasp.*, *Giardia sp.*, *Strongyloidesp.* Les cryptosporidies sont les parasites les plus fréquemment identifiés.
- Les **bactéries** : il s'agit essentiellement d'*Escherichia coli*, mais on peut retrouver des bactéries du genre *Salmonella*, *Clostridium*, *Yersinia*, ou *Campylobacter*.
- Les **virus** : il s'agit principalement des rotavirus, des coronavirus et du BVD. On isole aussi parfois des togovirus et des calicivirus.

On s'intéressera dans notre étude à la Cryptosporidiose et la recherche d'un outil de diagnostic fiable et rentable pour réduire l'impact de cette pathologie pour l'éleveur ainsi que pour la santé public et l'environnement.

I.1. Définition de la Cryptosporidiose:

La Cryptosporidiose est une affection parasitaire redoutable chez les ruminants nouveaux nés et elle peut l'être chez l'homme en cas de dépression du système immunitaire.

Longtemps considérée comme un agent de surinfection, *Cryptosporidium parvum* est reconnu depuis vingt ans comme un agent pathogène majeur, est très répondeur, des diarrhées néonatales des ruminants. Même si l'heure actuelle aucun traitement efficace n'excite contre cette affection.

Une autre préoccupation liée à l'infestation par *C. parvum* et son caractère zoonotique et, de manière plus générale, la diffusion de son agent causal par l'eau et les aliments.(1)

I.2. Historique : Découverte du parasite

Le genre *Cryptosporidium* fut décrit pour la première fois en 1907 par Ernest Edward Tyzzer suite à l'observation du parasite dans les glandes gastriques d'une souris de

laboratoire. Le parasite nouvellement découvert fut ainsi nommé *Cryptosporidium muris*. En 1912, Tyzzer mit en évidence chez la souris une autre espèce du même genre localisée dans l'intestin grêle et de plus petite taille qu'il nomma *Cryptosporidium parvum* (FAYER, 2004 ; TZIPORI et WIDMER, 2008 ; FAYER, 2010).

En 1955, la survenue de diarrhée aiguë chez des dindes permit à Slavin de décrire une nouvelle espèce, *Cryptosporidium meleagridis*.

Dans les vingt années qui suivirent, le genre *Cryptosporidium* fut retrouvé dans les intestins de veaux diarrhéiques confirmant ainsi l'importance pathogénique du parasite (O'DONOGHUE, 1995 ; FAYER, 2004). Dès lors, des recherches permirent la découverte de nouvelles espèces du genre *Cryptosporidium* et leur pathogénicité.

C'est avec la découverte des premiers cas humains de Cryptosporidiose en 1976 et le développement du SIDA (*Syndrome d'Immunodéficience Acquise*) que le monde médical s'est tourné vers le parasite, son pouvoir pathogène et son opportunisme (BONNIN et CAMERLYNCK, 1989 ; O'DONOGHUE, 1995 ; TZIPORI et WIDMER, 2008 ; GUYOT *et al.*, 2012). Cependant, ce n'est qu'en 1993, suite à l'épidémie de Milwaukee dans le Wisconsin (États-Unis) qui a touché plus de 400 000 personnes, que la Cryptosporidiose a été reconnue comme un problème de santé publique à part entière (FAYER, 2004). La source d'approvisionnement en eau potable de la ville de Milwaukee aurait été contaminée par l'eau de ruissellement ayant transporté des ookystes de *Cryptosporidium*spp. excrétés par le bétail paissant près des rivières du bassin versant du lac Michigan. D'autres sources potentielles de contamination ont été identifiées, telles que les eaux usées municipales et les abattoirs situés près de ces rivières (Mac Kenzie *et al.*, 1994). D'ailleurs, les personnes travaillant avec des animaux, principalement le bétail, sont plus à risque de se faire parasiter par *Cryptosporidium*spp. (O'Donoghue, 1995).

II. Biologie générale des Cryptosporidies :

Cryptosporidium est un eucaryote unicellulaire (protozoaire) se classe parmi l'embranchement des Apicomplexa, la classe des Coccidia et l'ordre des Eucoccidiorida, selon la taxonomie officielle du « National Center for Biotechnology Information » (NCBI). Plusieurs espèces du genre *Cryptosporidium* ont été à ce jour identifiées. L'infectivité dirigée spécifiquement contre un ou des hôtes a classiquement été la première caractéristique à appuyer la classification des différents isolats. Comme cette

caractéristique peut varier selon la dose, l'âge, les conditions de stockage, les méthodes d'isolation, les traitements chimiques que l'oocyste a subi ainsi que les expositions précédentes à différents hôtes (Xiao et al., 2004), les méthodes moléculaires viennent aujourd'hui préciser ces classifications via les analyses de la variation des séquences des locus 18S rRNA et HSP70 (Carey et al., 2004). Il est intéressant de noter que, depuis 2002, *C. parvum* a été officiellement divisé en deux espèces : *C. parvum* (le génotype „bovin“ infectant plus de 150 espèces de mammifère dont l'humain) et *C. hominis* (le génotype „humain“ restreint, sauf pour quelques rares exceptions, à l'humain) (Morgan-Ryan et al., 2002). Lorsque l'intérêt d'étudier les oocystes de *Cryptosporidium* se situe au niveau de la santé publique humaine, l'importance de bien discerner l'espèce présente se manifeste. Tel que résumé par le Tableau 2.1, les espèces reliées de près à l'humain se limitent à *C. parvum* et *C. hominis*. Dans de quelques rares cas, spécialement chez des populations immunodéprimées, *C. muris*, *C. felis*, *C. canis* et *C. meleagridis* ont contaminé des humains (Xiao and Ryan, 2004). Ce parasite obligatoire voyage d'un hôte à l'autre sous la forme d'oocysted'environ 5 µm de diamètre. Lorsqu'ingérée, cette capsule à parois très résistante colonise les parois du petit intestin ou de l'estomac selon l'espèce (Smith et al., 2005). Son cycle de vie complet est illustré par la Figure 2.1. Suite à l'ingestion d'oocystes via, par exemple, de l'eau ou de la nourriture contaminées, la température corporelle et l'acidité de l'estomac (pH 1.5 - 3.5) active l'excystation

II.1. Taxinomie :

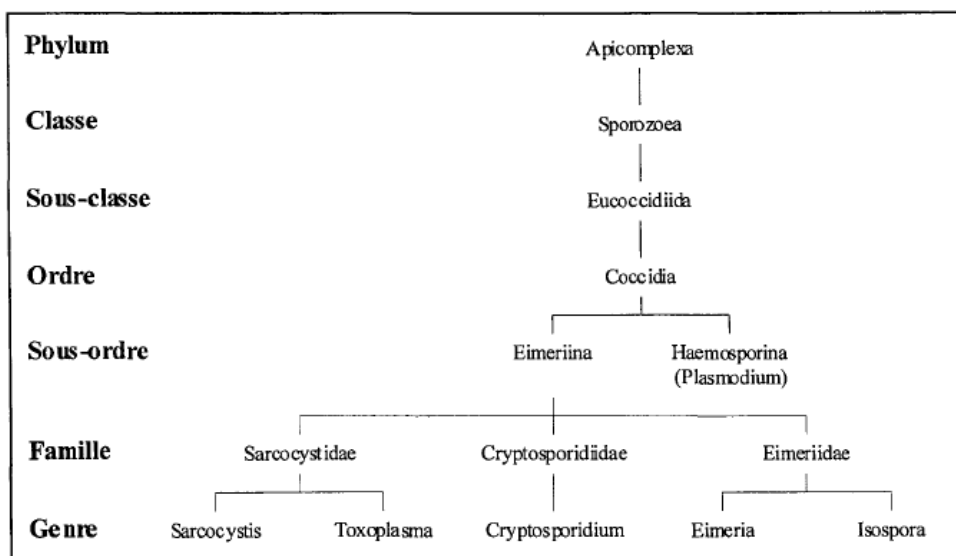


Figure 0~1 : Taxinomie simplifiée de *Cryptosporidium* (d'après LEVINE, 1984)

Cryptosporidium infecte les mammifères, les oiseaux, les reptiles et les poissons. Dans l'ensemble des études réalisées, on peut noter 22 espèces parmi le genre *Cryptosporidium* [MORGAN *et al.*, 1999]. Cependant FAYER *et al.* (2000) indiquent dix espèces validées. Seul *C. parvum* infecte l'homme, mais il est également retrouvé chez d'autres mammifères comme les animaux d'élevages (moutons, vaches, ...), les animaux domestiques (chiens, chats, ...) et les animaux sauvages (cerfs, rongeurs, ...). FAYER *et al.* (2000) rapportent 152 espèces différentes de mammifères infectées par *C. parvum*, qui est un protozoaire parasite de la classe des sporozoaires. Des études génétiques indiquent qu'au moins deux génotypes de *C. parvum* (1 et 2), infectent l'homme. Le génotype 1 serait strictement humain, il a seulement été possible de le transmettre expérimentalement à un primate captif. Le génotype 2 a aussi été trouvé chez les animaux (bovins, moutons, chèvre, ...) [BONNIN *et al.*, 1996]. Ces études génétiques récentes sont très importantes car elles infirment les théories classiques sur les modes de contaminations. En effet, la principale source d'oocystes dans les eaux potables était traditionnellement attribuée à la contamination des eaux par le ruissellement des sols agricoles. Cette hypothèse implique donc que la majorité des cas de contamination humaine soient associés au génotype 2, le type qui est perpétué par les animaux.

Or, des études montrent que la majorité des infections humaines libère des oocystes de génotype 1 [WIDMER *et al.*, 1998; McLAUCHLIN *et al.*, 2000]. Les contaminations des eaux seraient donc plutôt dues à des eaux usées qu'au lessivage de sols agricoles.

II.2. Espèces du genre *Cryptosporidium*

Cryptosporidium est le seul genre de la famille des Cryptosporidiidées et il est constitué de plusieurs espèces. Traditionnellement, les nouvelles espèces de *Cryptosporidium* étaient identifiées et nommées selon l'hôte dans lequel le parasite avait été identifié la première fois, la localisation des stades de développement endogènes, la morphologie et la localisation des stades de développement exogènes (Slapeta, 2009). Ainsi, les noms des hôtes de *Cryptosporidium* spp. ont souvent été utilisés pour désigner une nouvelle espèce (Fayer, 2010). Des 28 noms d'espèces étudiés par Slapeta en 2009, seulement 21 espèces seraient valides, puisque cinq espèces doivent être mieux décrites afin d'obtenir ce statut et que deux noms sont synonymes (Tableau I). Encore aujourd'hui, le statut des espèces de *Cryptosporidium* n'est pas toujours clair. En effet, une étude de Fayer (2010) accepte *C.*

macropodum (Power et Ryan, 2009), *C. fragile* (Jirku et al, 2008), *C. fayeri* (Ryan et al, 2008) et *C. Ryanae* (Fayer et Xiao, 2008), quatre nouvelles espèces non discutées dans l'étude taxonomique de Slapeta effectuée en 2009, alors que les espèces *C. nasoris*, *C. cichlidis*, *C. reichenbachklinkei*, *C. scophthalmi*, *C. pestis* et *C. cuniculus*, acceptées par Slapeta (2009) n'ont pas été discutées par Fayer (2010). Si l'on se fie à ces deux études récentes, il existerait 25 espèces de *Cryptosporidium* valides. La taxonomie des espèces de *Cryptosporidium* est particulièrement complexe étant donné qu'il existe très rarement de culture in vitro (Slapeta, 2009) et de spécimens de référence dans les collections, ce qui est le cas des protistes en général (Morrison, 2009).

Tableau 1: Espèces reconnues de *Cryptosporidium* pouvant infecter l'humain et leurs différents hôtes (Xiao and Ryan, 2004)

Espèce	Hôte principal	Hôte secondaire
<i>C. hominis</i>	Humains, singes	Dugongs, moutons
<i>C. parvum</i>	Bovins, chèvres, humains, moutons	Chevreuil, porcs, souris
<i>C. meleagridis</i>	Dindes, humains	Perroquets
<i>C. canis</i>	Chiens	Humains
<i>C. felis</i>	Chats	Bovins, Humains
<i>C. muris</i>	Chameaux, rongeurs	Chèvres de montagne, humains

III. Cycle évolutif

III.1. Caractéristiques du cycle :

Toutes les espèces de *Cryptosporidium* sont des parasites intracellulaires obligatoires (FAYER, 2004).

Le cycle du parasite est un cycle monoxène, ainsi toutes les étapes du développement interviennent chez un hôte unique (O'DONOGHUE, 1995).

Le cycle se déroule dans les cellules épithéliales de l'intestin ou du tractus gastro-intestinal plus généralement, cependant des localisations erratiques sont possibles comme l'arbre respiratoire, la vésicule biliaire, le foie ou le pancréas (FAYER, 2004).

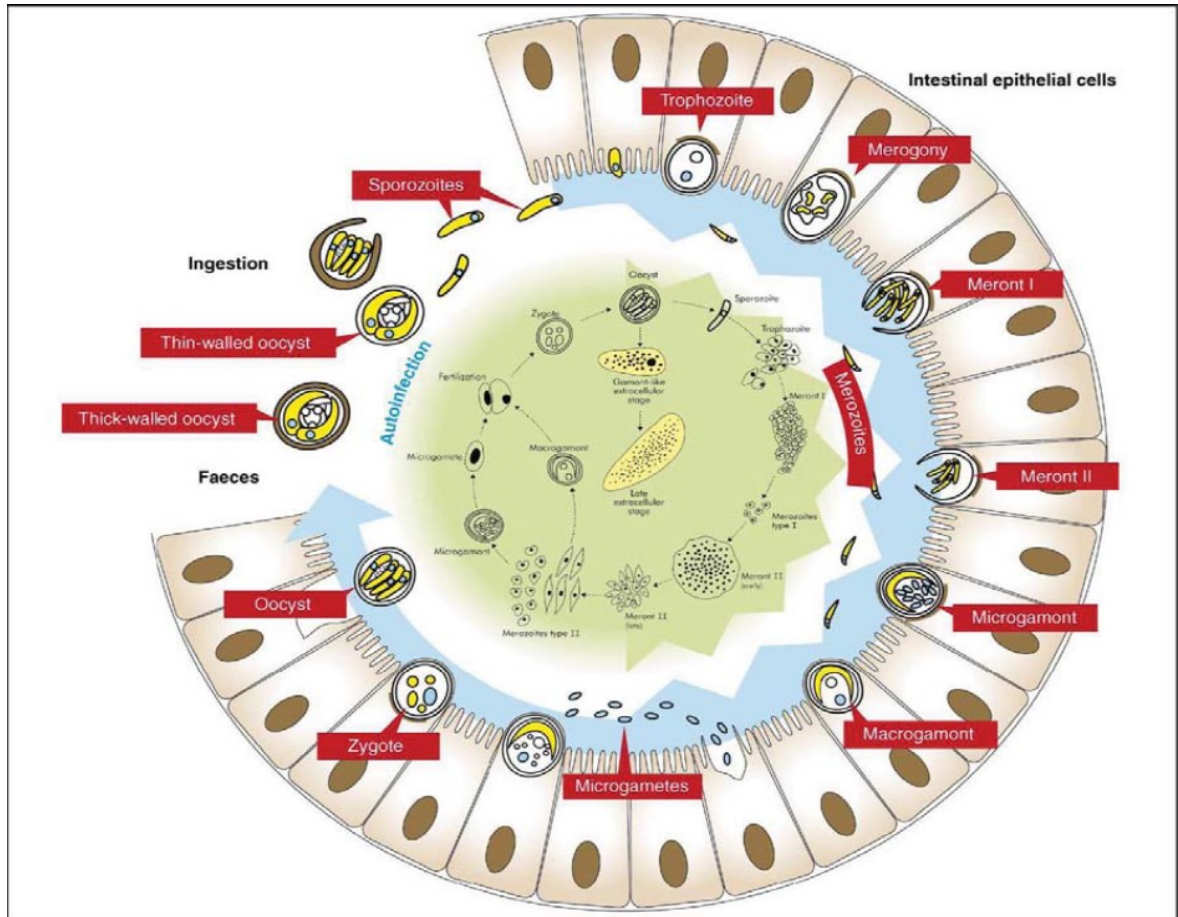


Figure 2 : Cycle évolutif de *Cryptosporidium* spp. dans l'intestin grêle, démontrant les étapes intracellulaires et extracellulaires connues (d'après Hijjawi et al, 2004; Barta et Thompson, 2006).

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

La période patente, correspondant à la durée totale d'excrétion des ocystes, est comprise entre quelques jours et quelques mois. Cette grande variabilité est fonction de l'immunocompétence de l'hôte et de l'espèce de *Cryptosporidium* incriminée (O'DONOGHUE, 1995).

L'ocyste est le seul stade parasite retrouvé dans l'environnement. Après son ingestion par l'hôte, le cycle se déroule en différentes étapes illustrées **Figure 2** et décrites par la :

(a) Excystation :

L'oocyste à paroi épaisse est ingéré par l'hôte et subit une excystation dans l'iléon.

Sous l'effet des conditions du milieu (température, présence de dioxyde de carbone, enzymes, sels biliaires, conditions réductrices), la paroi de l'oocyste est altérée et se fend libérant ainsi 4 sporozoïtes nus.

Les sporozoïtes s'attachent alors à la membrane apicale de la cellule épithéliale de la bordure en brosse et forment un trophozoïte (**Figure 3**) en s'enfermant dans une vacuole parasitophore qui lui confère une position intracellulaire mais extra-cytoplasmique. Le trophozoïte ainsi formé possède des organelles d'attachement avec le cytoplasme de la cellule-hôte participant notamment à sa nutrition (O'DONOGHUE, 1995 ; CHALMERS et DAVIES, 2010).

La taille varie de 2 à 2,5 µm de diamètre dans le cas de *Cryptosporidium parvum*.

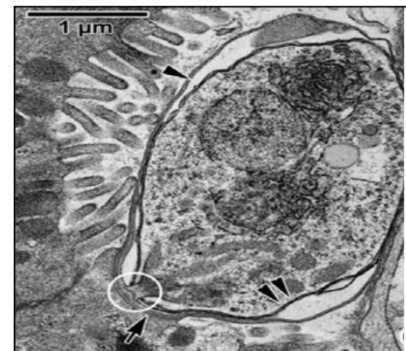


Figure 3 : Microphotographie du trophozoïte (ME à transmission) (Valigurova *et al.*, 2008)

(b) Mérogonie (anciennement dénommée schizogonie) :

La première génération de reproduction asexuée transforme les trophozoïtes en mérontes ou schizontes de type I contenant chacun 6 ou 8 mérozoïtes arrangés parallèlement les uns aux autres (**Figures 4**). Une fois matures, les mérozoïtes sont libérés de la vacuole parasitophore et deux devenir sont alors possibles : soit les mérozoïtes envahissent les cellules épithéliales voisines formant ainsi des mérontes ou schizontes de type II contenant 4 mérozoïtes (2ème génération de la reproduction asexuée), soit ils peuvent initier un cycle auto-infectieux reformant des mérontes de type I (O'DONOGHUE, 1995 ; CHALMERS et DAVIES, 2010). Cette rétro-infection permet d'allonger la période d'excrétion, d'augmenter le nombre d'oocystes excrétés mais également la pathogénicité et ce même si un petit nombre d'oocystes a été ingéré initialement. Les deux types de Mérontes mesurent 4 à 5 µm de diamètre (Fayer, 1997).

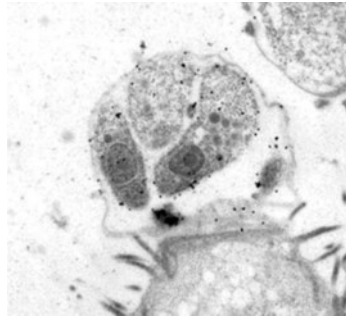


Figure 4: Image au microscope électronique d'un merozoite immature contenant des mérozoïtes (Source : KJP).

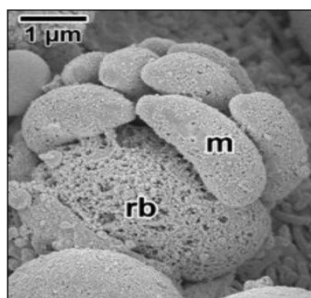


Figure 5a: Microphotographie du merozoite (ME à balayage) (Valigurova *et al.*, 2008)
m : mérozoïte ; rb : corps résiduel.



Figure 5b : Ultrastructure du mérozoite x24000 (Fayer et Ungar 1986)
d: granules denses; N: noyau; P: pellicule

Mérozoïte(Fig.5a,b) représenté par deux types, I et II qui sont morphologiquement identiques et caractérisés par l'absence de nucléole, de mitochondries, de conoïdes et de micropores; par la présence d'un complexe apical, de 28 microtubules sub-pelliculaires, d'un organe nourricier et par leur mobilité (O'Donoghue,1985; Fayer et Ungar,1986; Fayer,1997).

(c) Gamétonie

Les mérozoïtes de 2ème génération vont ensuite initier le cycle sexuel du parasite. Ils sont libérés puis envahissent de nouvelles cellules épithéliales se différenciant en microgamontes mâles ou en macrogamontes femelles, illustrés sur les **Figures 6 et 7**.

Le microgamonte mâle produit jusqu'à 16 microgamètes qui, une fois à maturité, sont libérés dans la lumière de l'iléon. Ceux-ci s'attachent et pénètrent dans la vacuole

parasitophore pour féconder le macrogamète et former un zygote (O'DONOGHUE, 1995 ; CHALMERS et DAVIES, 2010).

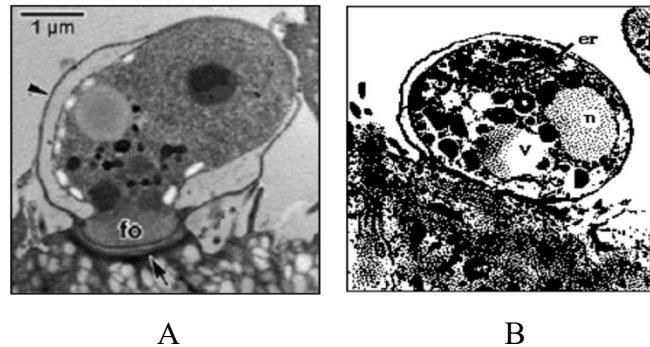


Figure 6:Macrogamonte

A : Microphotographie (ME à transmission) x12000) (Fayer et Ungar 1986)

B : Ultrastructure (Valigurovaet *al.*,2008).

fo : organe nourricier; er: réticulum endoplasmique; N: noyau; V: vacuole.

Microgamonte (Fig.7) en forme de tige avec une extrémité antérieure aplatie et renferme 14 à 16 microgamètes aflagellés et un corps résiduel (Fayer, 1997; Tzipori, 1988). Ce stade est rarement retrouvé à cause probablement de sa courte durée de vie (Gati, 1992).

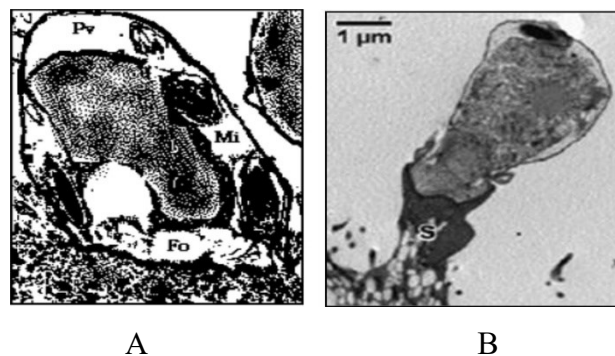


Figure 7 : Microgamonte

A : Ultrastructure X 18800) (Current, 1989)

B : Microphotographie (ME à transmission (Valigurovaet *al.*,2008).

Fo: organe nourricier; Mi : microgamète; Pv : vacuole parasitophore

(d) Sporogonie ou sporulation :

Une fois formé, le zygote subit une phase de sporulation (par méiose) aboutissant à la formation d'un oocyste sporulé et directement infectant contenant 4 sporozoïtes (**Figure 8 a - b**). Il existe 2 sortes d'oocystes en fonction de l'épaisseur de leur paroi : les oocystes à paroi épaisse excrétés dans les fèces et retrouvés dans l'environnement et les oocystes à

paroi fine libérant les sporozoïtes dans la lumière intestinale à l'origine d'une réinfection de l'hôte. Les oocystes à paroi épaisse disséminés dans le milieu extérieur sont prêts à infecter un nouvel hôte (O'DONOGHUE, 1995 ; CHALMERS et DAVIES, 2010).

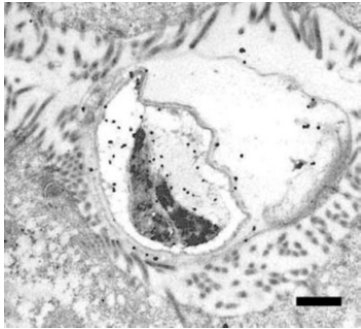


Figure 8 a: Image au microscope électronique d'un oocyste et de deux sporozoïtes matures (Source : KJP).

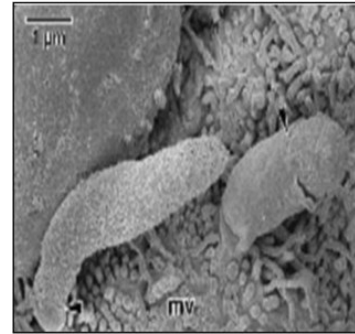


Figure 8 b : Microphotographie du sporozoïte (ME à balayage) (Valigurova *et al.*, 2008).
mv : microvillosités

Sporozoïte (Fig.8b) élément mobile, mesurant $4,9\mu\text{m} \times 1,21.\mu\text{m}$ et caractérisé par :

- la présence d'un noyau proéminent au niveau du tiers postérieur, d'anneaux apicaux, de granules denses, de douze microtubules sub-pelliculaires, d'un organite nourricier (F ayér, 1997) et d'un complexe apical composé :

- * de micronèmes: caractérisés par leur activité sécrétoire. Ils sont localisés à l'extrémité apicale des stades invasifs et participent dans la motilité du parasite, la pénétration et la vacuolisation,

- * de rhoptries : structures sécrétrices d'enzymes.

- l'absence de mitochondries, de conoïdes et de micropores.

III.2 Particularités du cycle du *Cryptosporidium* :

L'existence d'une auto-infestation à partir du recyclage des mérontes de type I et des oocystes à paroi fine serait à l'origine du caractère chronique de la maladie chez certains individus sans que ceux-ci ne soient en contact avec des oocystes d'origine exogène (O'DONOGHUE, 1995 ; CHALMERS et DAVIES, 2010 ; CHARTIER et PARAUD, 2010). Le cycle du parasite est court et permet une surinfection de l'hôte de même qu'une libération massive d'oocystes à paroi épaisse dans le milieu extérieur à l'origine d'une infection rapide de nouveaux hôtes.

III.3. Résistance des oocystes

III.3.1. Résistance dans l'environnement :

Les oocystes de *Cryptosporidium parvum* sont très résistants dans le milieu extérieur, que ce soit dans l'eau, le sol ou les matières fécales. Ils peuvent demeurer infectieux pendant une longue période sans pour autant être capables de se multiplier. Leur survie dans les différents substrats explique toute la difficulté du traitement et de désinfection de ceux-ci.

III.3.1.1. Résistance dans l'eau :

Les oocystes peuvent rester viables et infectieux pendant plusieurs mois dans l'eau à des températures comprises entre 0 et 30°C et jusqu'à un an dans de l'eau de mer (Rapport AFSSA, 2002). Ainsi pour des températures de 0, 5, 10, 15 et 20°C, les oocystes demeurent infectieux pendant 6 mois, ce chiffre passant à 3 mois pour des températures de 25 et 30°C et à 1 semaine pour une température de 35°C (FAYER, 2004). À des températures inférieures à 15°C, le niveau d'infectiosité des oocystes peut être maintenu sur une période de 24 semaines au moins et parfois sur plus d'une année. Cependant les oocystes sont très sensibles à une exposition à de hautes températures sur un temps court : des oocystes maintenus à 64,2°C pendant 5 minutes perdent leur infectiosité vis-à-vis de souris tandis qu'une exposition à 60°C pendant 45 secondes ou à 75°C pendant 20 secondes induit une perte d'infectiosité des oocystes sur des cultures cellulaires HCT-8.

L'exposition à des températures très basses ou la congélation conduit à une inactivation partielle des oocystes : 67% des oocystes sont inactivés après 21 heures passées à -22°C, cependant à -10°C pendant 7 jours ils demeurent viables (KING et MONIS, 2006).

L'effet de la salinité de l'eau sur la survie des oocystes a également été étudié. La viabilité de ceux-ci est plus importante pour des salinités et des temps d'exposition faibles mais même dans des conditions extrêmes (salinité de 35‰ à 18°C pendant 40 jours) les oocystes peuvent demeurer infectieux. (FAYER, 2004).

D'autres paramètres peuvent également avoir une influence sur la résistance des oocystes de *Cryptosporidium parvum* dans l'eau. La quantité de bactéries hétérotrophes, c'est-à-dire les bactéries tirant leur source de carbone de la matière organique, influence la survie des oocystes qui apparaît meilleure dans les eaux filtrées que dans les non filtrées. La présence

de la bactérie *Serratiamarcescens* à activité chitinolytique serait quant à elle associée à la dégradation des oocystes. Enfin, l'ingestion des oocystes par des êtres vivants peut avoir une influence sur leur pouvoir infectieux (FAYER, 2004).

III.3.1.2. Résistance hors de l'eau :

La résistance des oocystes dans le sol et les matières fécales dépend de nombreux facteurs. La température a été identifiée comme le facteur critique affectant la survie des oocystes. Une étude sur l'exposition de trois types de sol à une température de -10°C pendant un à neuf cycles de « gel-dégel » conduisait à une inactivation de 99% des oocystes au bout de 50 jours et cela même en l'absence de cycle « gel-dégel » (FAYER, 2004 ; KING et MONIS, 2006).

Le type de sol influence la survie des oocystes, avec une préférence pour les terres grasses limoneuses par rapport aux terres grasses argileuses ou sablonneuses (SOARES, 2003 ; JENKINS *et al.*, 2010). Les différences observées entre ces trois types de sols s'expliqueraient par leurs pH spécifiques. En effet, il a été montré que le nombre d'oocystes était plus faible dans les sols à pH neutre ou basique que dans ceux à pH acide (FAYER, 2004 ; KING et MONIS, 2006). En revanche, l'humidité des sols ne semble pas être un paramètre influençant la survie des oocystes à l'exception des sols argileux qui peuvent être sensibles à la sécheresse (KING et MONIS, 2006). Les oocystes sont très sensibles à la dessiccation : selon des études différentes seuls 3% restaient viables après 2h et seulement 5% après 4h à température ambiante (KING et MONIS, 2006).

En ce qui concerne les matières fécales, la survie des oocystes dépendrait de trois paramètres :

- La température : des températures élevées et des phases de gel et de dégel alternées réduisent la viabilité des oocystes ;
- Le temps : l'obscurité tend à diminuer la viabilité ;
- La concentration en ammoniacque : des concentrations élevées peuvent entraîner une inactivation des oocystes (Rapport AFSSA, 2002).

Le compostage permettrait également de réduire la viabilité des oocystes (Rapport AFSSA, 2002). Les paramètres ci-dessus permettent d'altérer la viabilité d'un grand nombre d'oocystes, cependant dans la plupart des cas un nombre faible, mais suffisant, d'oocystes infectieux reste présent dans l'environnement.

III.3.2. Résistance aux procédés de désinfection :

Les oocystes de *C. parvum* sont remarquablement résistants aux désinfectants utilisés couramment (composés alcalins ou contenant des aldéhydes, ammoniacaux, du chlore ou de l'alcool) (O'DONOGHUE, 1995). L'utilisation du chlore à des concentrations usuelles pour le traitement des équipements d'eau et des piscines n'a que peu d'impact sur la viabilité des oocystes (FAYER, 2004 ; JENKINS *et al.*, 2010). De la même manière, l'aluminium utilisé pour la floculation dans le traitement primaire de l'eau ne permet pas de réduire la viabilité des oocystes (FAYER, 2004).

IV. Epidémiologie des Cryptosporidiose

IV.1. Répartition géographique et prévalence de la cryptosporidiose :

La cryptosporidiose animale est présente sur les six continents, aussi bien dans des zones tropicales que tempérées (O'DONOGHUE, 1995). La prévalence de la maladie représente le nombre d'animaux infectés par le genre *Cryptosporidium spp*, à un moment donné et dans une population donnée. Cependant, la plupart des études menées sur le sujet visent à déterminer la prévalence d'excrétion, c'est-à-dire le nombre d'animaux excréant des oocystes indépendamment de leur statut clinique à un moment donné. La détermination de la prévalence d'excrétion chez les espèces domestiques a fait l'objet d'un grand nombre d'études. Chez les bovins, des variations de la prévalence d'excrétion sont observées selon les différentes classes d'âge des animaux. Les études s'accordent sur le fait que la prévalence décroît avec l'âge (DE GRAAF *et al.*, 1999(a) ; SANTIN *et al.*, 2008). Selon l'étude de SANTIN *et al.* (2008), elle est maximale chez les veaux non sevrés (45,8%) puis elle diminue chez les veaux sevrés (18,5%) et chez les génisses (2,2%). La prévalence d'excrétion est aussi fonction du type de race : elle est plus élevée pour les veaux allaitants que pour les veaux laitiers (NACIRI *et al.* 1999).

IV.2. Sources du parasite

IV.2.1. Les jeunes animaux du troupeau : Les jeunes ruminants non sevrés sont très

susceptibles d'être infectés par le parasite.

Selon l'étude de SANTIN *et al.* (2008) dans un élevage de vaches laitières au Maryland, la prévalence de la maladie est maximale chez les veaux âgés de 1 à 8 semaines puis elle diminue rapidement chez les veaux de 3 à 12 mois et chez ceux de 13 à 24 mois. De plus, *Cryptosporidium parvum*, principale espèce d'intérêt en médecine vétérinaire et humaine, est à l'origine de 97% des cas de cryptosporidiose chez les veaux non sevrés contre 4% et 0% respectivement pour les autres tranches d'âge. On comprend ainsi que les veaux non sevrés représentent une source majeure du parasite. Les données précédentes sont illustrées par les **Figures 9**

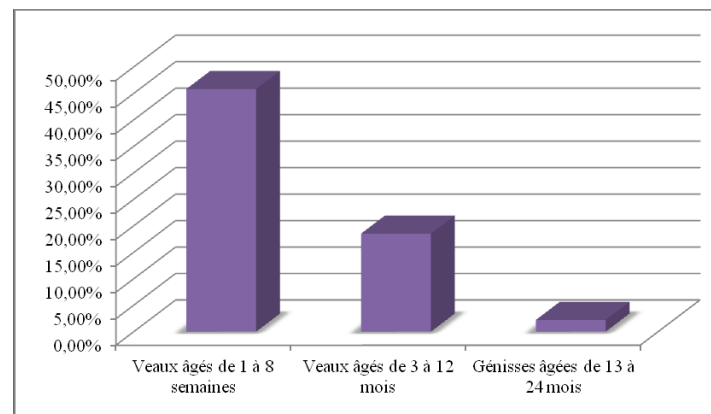


Figure 9 : Prévalence d'excrétion d'oocystes de *Cryptosporidium* par tranche d'âge dans un élevage de bovins laitiers (Adapté de SANTIN *et al.*, 2008).

Les veaux nouveau-nés infectés excrètent en moyenne 10^6 à 10^7 oocystes par gramme de fèces (DE GRAAF *et al.* 1999(a)). D'après d'autres études, les veaux infectés par 10^5 oocystes excrètent entre 10^9 et 10^{10} oocystes par gramme de fèces pendant une période de 7 à 10 jours. La quantité importante d'oocystes excrétés est à l'origine d'une contamination massive de l'environnement notamment à la fin de la saison des mises-bas (FAYER, 2004). Ainsi un veau nouveau-né peut facilement se contaminer par le biais des fèces des veaux voisins. Ceci est d'autant plus vrai que les veaux sont élevés dans des enclos collectifs et que la densité animale est élevée (DE GRAAF *et al.* 1999(a)).

IV.2.2. Les mères : La plupart des bovins adultes excrètent des oocystes de *Cryptosporidium*. Cependant, aucune différence dans l'excrétion n'est observée chez les adultes, qu'il s'agisse d'un élevage présentant des problèmes de cryptosporidiose ou non. Ainsi leur rôle dans la contamination des autres animaux n'est pas clairement établi. Il semblerait également que l'excrétion n'augmente pas autour du vêlage (DE GRAAF *et al.*, 1999(a)).

Dans une étude, des veaux séparés de leurs mères dès la naissance et placés dans des enclos désinfectés ont excrété des oocystes dès l'âge de 3 jours, suggérant la possibilité d'une infection *in utero* (FAYER, 2004). Chez les adultes, l'infection à *Cryptosporidium andersoni* est la plus fréquente (SANTIN *et al.*, 2008).

IV.2.3. Les animaux sauvages et les rongeurs : Etant sensibles à une contamination par *Cryptosporidium*, les animaux sauvages, tels que les cervidés, les rongeurs, les insectivores et les lagomorphes, constituent une source non négligeable du parasite.

La présence de rongeurs dans les élevages permettrait de maintenir le niveau de contamination de ceux-ci grâce à une transmission facilitée de l'agent pathogène entre les ruminants et les rongeurs (ANDERSON, 1998 ; FAYER, 2004).

Comme vu précédemment, certaines espèces animales, comme les mouches, les rotifères et les oiseaux migrateurs, jouent le rôle de transporteurs passifs du parasite (FAYER *et al.*, 2000). Les mouches, par exemple, peuvent héberger des oocystes de *Cryptosporidium* sur leurs surfaces externes, contribuant ainsi à leurs propagations (MOORE *et al.* 2003).

Enfin les coquillages, capables de filtrer des quantités d'eau importantes, représentent une source d'oocystes en milieu marin tant pour l'homme que pour la faune les consommant (KING et MONIS, 2006).

IV.2.4. L'eau : La fréquence des cas de cryptosporidiose d'origine hydrique chez l'homme peut laisser penser que la consommation d'eau contaminée pourrait être à l'origine de la maladie chez les animaux, et notamment chez les Ruminants. La contamination de l'eau pourrait avoir lieu par le biais des jeunes animaux de l'élevage mais également, dans une moindre mesure en raison de leur niveau d'excrétion plus faible, des animaux adultes et des rongeurs. Cependant, on ne connaît pas l'importance de cette voie de contamination.

IV.3. Modes de transmission :

La transmission du parasite se fait essentiellement par voie oro-fécale, via l'ingestion d'oocystes directement émis dans les fèces de l'hôte précédent.

- La contamination par la voie aérienne est anecdotique et concerne principalement les Oiseaux.

- La transmission chez les animaux peut se faire de manière directe, c'est-à-dire d'animal à animal, ou de manière indirecte par le biais de la nourriture, de l'eau, mais également du personnel s'occupant des animaux, des locaux ou du matériel utilisé... (FAYER *et al.*, 2000).

La dose infectante serait très faible pour les jeunes ruminants en raison de leur sensibilité à l'infection par *Cryptosporidium* (FAYER, 2004).

IV.3.1. Transport mécanique dans le sol et par les hôtes : La contamination du sol et des eaux de surface par les oocystes de *Cryptosporidium parvum* peut aboutir à une contamination des eaux de boisson ainsi que des eaux à usage récréatif (FAYER *et al.*, 2000). Des études ont montré que les oocystes étaient capables de migrer dans différents types de sol, notamment sous l'effet des irrigations. Ils migrent pendant plusieurs semaines voire plus de 70 jours dans certains cas. Leur concentration diminue avec la profondeur du sol : la plupart des oocystes sont ainsi retrouvés dans les 2 cm de la couche supérieure du sol, quelques uns sont encore présents à 30 cm de profondeur et à 70 cm de profondeur aucun oocyste n'était détecté (FAYER *et al.*, 2000).

D'autre part, des études ont mis en évidence le rôle de certains oiseaux migrateurs dans la dissémination des oocystes. En effet, l'oie bernache du Canada (*Branta canadensis*) et le canard colvert (*Anas platyrhynchos*) sont capables d'ingérer les oocystes et de les excréter tels quels, viables et infectieux, dans leurs fèces pendant une semaine (FAYER *et al.*, 2000).

D'autres espèces animales, telles que les cafards (*Periplaneta americana*), les scarabées, les mouches et les rotifères, jouent ce rôle soit par le biais de leurs fèces soit par portage des oocystes sur leurs surfaces externes (FAYER *et al.*, 2000).

IV.4. Critères de sensibilité de l'hôte :

Les critères de sensibilité de l'hôte jouent un rôle dans l'apparition de la cryptosporidiose mais peuvent également être à l'origine d'une augmentation des taux de mortalité dus à la maladie (CHARTIER et PARAUD, 2010).

IV.4.1. La race : En ce qui concerne les bovins, les différences de prévalence de la maladie entre les races allaitantes et les races laitières seraient dues à des différences dans

le mode d'élevage de celles-ci, les races allaitantes étant élevées sur un mode extensif seraient ainsi moins sensibles au parasite (CHARTIER et PARAUD, 2010).

NACIRI *et al.* (1999) ont montré que la prévalence de la cryptosporidiose était plus élevée chez les veaux allaitants que chez les veaux laitiers. En effet, ces derniers sont élevés en box individuels la plupart du temps permettant de limiter les contacts entre les animaux à l'inverse des veaux élevés sous la mère qui ont de nombreux contacts avec leurs congénères. Cependant, ces résultats sont contredits par une étude de KVAC *et al.* (2006) citée par XIAO et FAYER (2008) montrant que la prévalence est plus faible chez les veaux allaitants que chez les veaux laitiers élevés dans des conditions similaires.

IV.4.2. L'âge : Chez les bovins, l'étude de SANTIN *et al.* (2008) montre que la prévalence de l'infection est plus élevée chez les veaux non sevrés que chez les veaux sevrés et les génisses, suggérant ainsi que les jeunes animaux sont plus sensibles à *Cryptosporidium spp.* Dans cette même étude, il est mis en évidence que l'espèce de *Cryptosporidium* incriminée diffère en fonction de l'âge des animaux : les veaux non sevrés sont principalement atteints par *C. parvum* tandis que dans les autres tranches d'âge des espèces au pouvoir pathogène plus faible sont décrites (*C. bovis*, *C. andersoni*, *C. ubiquitum*).

IV.4.3. Le statut immunitaire : Comme chez l'Homme, le statut immunitaire de l'animal joue un rôle dans l'installation de l'infection. Celle-ci sera facilitée chez un individu présentant une immunodéficiência, qu'elle soit naturelle ou acquise. Ainsi des infections sévères ont été décrites chez des animaux immunodéprimés tels que des chats, des chiens, des chevaux et des singes (O'DONOGHUE, 1995). Le statut immunitaire influencerait la sévérité mais aussi la distribution de l'infection (FAYER et UNGAR, 1986).

Chez les jeunes veaux, la prise du colostrum dans les premières heures de vie permet un transfert d'immunoglobulines de la mère vers le nouveau-né, le protégeant alors d'un certain nombre d'infections. Ainsi, un défaut au niveau du colostrum, en quantité et/ou en qualité, est souvent associé à des épidémies de cryptosporidiose en élevage (ANDERSON, 1998).

IV.4.4. Facteurs de risque :

IV.4.4.1. La saison : Plusieurs auteurs ont tenté de mettre en évidence le caractère saisonnier de la cryptosporidiose chez les Ruminants. Dans une étude au Canada sur des

veaux allaitants, la prévalence de l'infection est plus élevée en hiver et au printemps, coïncidant ainsi avec la période des vêlages. En revanche, une autre étude, menée dans un élevage laitier aux Etats-Unis avec des vêlages tout au long de l'année, a montré que la prévalence est plus élevée pendant l'été (DE GRAAF *et al.*, 1999(a)). L'étude de TROTZ-WILLIAMS *et al.* (2007) au Canada dans un élevage laitier a mis en évidence que l'excrétion d'oocystes est plus élevée chez les veaux nés en été que chez ceux nés en hiver. Cependant, l'effet saison observé pourrait être dû à un regroupement des animaux pendant ces périodes et donc à une contamination de l'environnement plus importante. Ainsi de manière générale, le pic d'incidence de la cryptosporidiose est observé lors du pic d'incidence des naissances (PAOLETI, 2002).

IV.4.4.2. La densité animale : Une forte densité animale facilite les contacts entre les individus et ainsi la transmission du parasite. Cette situation peut se retrouver dans des élevages avec une mauvaise conception des bâtiments, qui, associée à une hygiène défailante des locaux et à un renouvellement de l'air insuffisant, facilite la contamination des animaux (PAOLETI, 2002).

IV.4.4.3. La conduite d'élevage : La gestion de l'élevage dans son ensemble peut être à l'origine d'une augmentation de la prévalence de la cryptosporidiose.

De nombreuses études ont pu mettre en évidence différents facteurs de risques tels que la présence de nurseries dans l'élevage, le stress d'un sevrage trop précoce, les transports etc. La mise en place d'une prophylaxie chez les mères contre les diarrhées néonatales est associée à une augmentation de la prévalence d'excrétion du parasite. Ceci pourrait être dû au fait que de telles prophylaxies sont souvent mises en place dans des élevages présentant une forte incidence de diarrhées chez les veaux, cependant ces mesures prophylactiques s'avèrent inefficaces contre les cas de cryptosporidiose (TROTZ-WILLIAMS *et al.*, 2008). Chez les animaux logés sur un sol en béton, la prévalence d'excrétion des oocystes est plus faible. En effet, ce type de sol facilite son nettoyage régulier par rapport aux sols de type sable, terre ou graviers. De la même manière, l'utilisation de savon ou de détergent pour le nettoyage des ustensiles ayant servis à nourrir les animaux est associée à une diminution du risque d'excrétion des oocystes (TROTZ-WILLIAMS *et al.*, 2008).

En contradiction avec certains auteurs, l'étude de TROTZ-WILLIAMS *et al.* (2008) a montré que la prévalence de l'infection est plus importante dans les élevages où les

animaux sont nourris avec un lacto6remplaceur, c'est-à-dire dans les élevages à fort effectif.

IV.4.4.4. Le rôle de l'épandage du fumier : L'épandage de fumier ou de lisier dans le but d'enrichir ou de fertiliser les sols conduit à un recyclage des micro-organismes qui peuvent persister pendant de longues périodes aussi bien sur les végétaux que dans les couches supérieures du sol.

En ce qui concerne *Cryptosporidium*, la survie des oocystes après l'épandage peut être à l'origine de la contamination d'animaux qui pâturent sur ces terres ou qui consomment de l'ensilage d'herbe contaminée.

Les différentes méthodes de conservation de l'ensilage (aucun traitement, inoculation de *Lactobacillus plantarum* ou ajout d'acide formique) ne permettent pas une destruction totale du parasite. Quel que soit le mode de conservation de l'ensilage, le taux de viabilité des oocystes à la fin de l'étude oscille autour de 30% : le pouvoir infectieux de l'ensilage n'est donc pas négligeable (MERRY *et al.*, 1997).

L'épandage du fumier entraînerait également la contamination des cours d'eau situés à proximité des exploitations agricoles, par phénomènes de ruissellement (PAOLETI, 2002).

V. Contexte prophylaxie et traitement :

La Cryptosporidiose représente le type de pathologie pour lequel la résolution de la problématique est nécessairement préventive. Les cryptosporidies sont des parasites présents dans tous les élevages. Seules les insuffisances immunitaires et/ou les facteurs favorisant de contamination permettent leur développement entraînant des signes cliniques sur les animaux. En cas de présence de cryptosporidiose dans votre élevage, la première phase consistera en une association de mesures sanitaires et médicales afin de limiter son impact. Dans une seconde phase, une visite d'élevage sera effectuée pour recenser les facteurs de risques et les solutions à mettre en place afin de réaliser une prévention efficace et durable.

Durant les quinze dernières années, nos connaissances sur la Cryptosporidiose ont progressé de manière variable selon les domaines de recherche. En épidémiologie, les données nouvelles sont peu nombreuses, même si le caractère ubiquiste du parasite a été finalement confirmé, et si le rôle des animaux adultes comme réservoirs pérennes de

parasites a été démontré de manière indiscutable. En revanche, les conditions d'apparition de la Cryptosporidiose-maladie restent obscures ; il est évident maintenant que cette infection est multifactorielle et qu'une phase d'amplification chez le ruminant nouveau-né paraît nécessaires pour déclencher une épizootie au sein de l'élevage. Cette amplification trouve certainement son origine dans les conditions environnementales, y compris celles liées à l'intervention d'autres agents entéropathogènes. En matière de prophylaxie, on estime pouvoir disposer aujourd'hui d'au moins deux médicaments ayant une activité certaine vis-à-vis de *Cryptosporidium* : l'halofuginone et la paromomycine, même si ces produits ne permettent pas un contrôle total du parasite. Dans ces conditions, l'approche hygiénique reste un élément fondamental du contrôle de la Cryptosporidiose animale, source potentielle de parasites pour les êtres humains.

VI. Décontamination et désinfectants utiles :

Des études ont montré que les rayons UV, le chlore et l'ozone affecteraient la viabilité des ookystes de *Cryptosporidium* spp. en modifiant la perméabilité de leur membrane, ou encore en modifiant les stimuli biochimiques qui permettent au protozoaire de pénétrer et de se multiplier dans les entérocytes de son hôte (Quilez et al, 2005).

Certaines compagnies d'épuration des eaux utilisent du dioxyde de chlore et du dioxyde d'ozone pour désinfecter l'eau. Cependant, ces derniers ne sont efficaces que lorsque le seuil de contamination est bas (moins de 104 ookystes par ml : Peeters et al, 1989). Une étude in vivo montre que la température influence la capacité d'infection. En effet, des ookystes de *C. muris* en suspension dans l'eau, placés trois jours à -5°C et une journée à -20°C ne sont plus infectieux. La même étude démontre le même effet pour une exposition à 55°C durant une minute (Neumayerova et Koudela, 2008).

Quelques désinfectants (Tableau 2) ont la capacité d'inactiver des ookystes infectieux.

Parmi eux se trouvent les produits à base de formol (10%), d'ammoniaque (5%) ainsi que le peroxyde d'hydrogène (Peeters et al, 1989; Quilez et al, 2005). Quilez et collaborateurs (2005) ont comparé l'efficacité de deux produits à base de peroxyde d'hydrogène sur *Cryptosporidium* spp. Leurs travaux montrent que 3% du produit « Ox-Agua », qui contient une concentration de 48% de peroxyde d'hydrogène appliqué pendant 30 minutes rend inactifs les ookystes; le même effet est obtenu avec 5% du produit « Ox-Virin » ayant une concentration de 5% de peroxyde d'hydrogène appliqué pendant 120 minutes.

Tableau 2: désinfectants efficaces contre *Cryptosporidium* sp.

Produits	Temps de contact (minutes)	Références
Ammoniac 5%	120	Campbell et al, 1982
Dioxyde de chlore	15	Peeters et al. 1989
Dessiccation	120 (air libre)	Robertson et al. 1992
Formol 10%	120	Campbell et al, 1982
Congélation -5°C	4320	Neumayerova et Koudela, 2008
Congélation -20°C	1440	Neumayerova et Koudela, 2008
Congélation -70°C	Non spécifié	Campbell et al, 1982
Chaleur 55°C	1	Neumayerova et Koudela, 2008
Chaleur 65°C	30	Tzipori, 1983
H ₂ O ₂ 5%	120	Quilez et al. 2005
H ₂ O ₂ 48%	30	Quilez et al. 2005
Ozone 1,11 p.p.m	6	Peeters et al. 1989

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

VII. Méthodes Diagnostic de la Cryptosporidiose :

VII.1. Diagnostic épidémiologique et clinique :

Les signes cliniques et les critères épidémiologiques permettent de suspecter mais pas de confirmer la Cryptosporidiose. Les critères de suspicion sont l'apparition d'une diarrhée chez des animaux âgés de 5 à 21 jours, dont la prévalence augmente à mesure que la saison des mises-bas avance, et résistante aux traitements habituellement utilisés. Dans les élevages de type mixte, la sévérité de l'infection apparait plus élevée chez les chevreaux que chez les agneaux (PARAUD et CHARTIER, 2012).

VII.2. Diagnostic de laboratoire :

Les techniques de laboratoire permettent de mettre en évidence le parasite (d'oocystes de *Cryptosporidium* sp.) dans les fèces ou dans d'autres types de prélèvement supposés contaminés. Les niveaux d'excrétion d'oocystes sont très élevés lors de Cryptosporidiose clinique, il est donc facile de mettre en évidence leur présence.

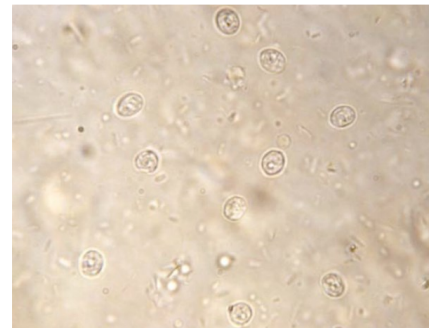
VII.2.1 Description macroscopique :

Une description macroscopique des selles prélevées doit être réalisée en complément des autres examens. Elle permet ainsi d'apprécier la couleur, la consistance, et l'aspect des selles prélevées.

VII.2.2. Microscopie conventionnelle (description microscopique) :

Les méthodes microscopiques permettent de détecter la présence d'oocystes dans les matières fécales prélevées. L'observation directe de l'échantillon au microscope est réalisable. (figure 10)

Figure 10 : Oocystes de *Cryptosporidium sp* en microscopie optique. (Source : Dr. Peter Drotman, Public Domain Images)



Cependant les techniques de concentration et de coloration facilitent celle-ci. En effet, l'échantillon peut contenir un faible nombre d'oocystes, qu'il sera alors utile de concentrer, et la coloration permet de différencier les oocystes d'autres composants de l'échantillon (O'DONOGHUE, 1995).

Les oocystes sont des structures rondes à ovalaires dont la taille varie selon l'espèce de cryptosporidies observée.

Tableau 3 : Taille des oocystes de *Cryptosporidium sp*.

Espèces de <i>Cryptosporidium</i>	Taille de l'oocyste
<i>C. parvum</i>	5,4x4,9µm
<i>C.bovis</i>	4,9x4,6µm
<i>C.ryanae</i>	3,7x3,2µm
<i>C. andersoni</i>	7,5x5,5µm

C. parvum, *C. bovis* et *C. ryanae* sont de tailles similaires et sont très difficiles à différencier à l'examen microscopique. (WYATT *et al*, 2010)

VII.2.2.1. Méthodes de concentration :

La concentration de l'échantillon est une étape préalable et indispensable lorsqu'une faible concentration d'oocystes est présente. Elle permet d'augmenter la sensibilité de détection des méthodes microscopiques et moléculaires. (WYATT *et al.*, 2010)

Les techniques les plus utilisées sont les méthodes de flottation. Ces dernières s'appuient sur la différence de densité entre le liquide et les éléments parasitaires. La première étape consiste à suspendre les fèces par l'addition d'eau et à retirer les particules les plus grosses à l'aide d'un tamis ou d'une gaze. Une centrifugation de l'échantillon permet ensuite de séparer le surnageant contenant les particules les plus petites et légères (WYATT *et al.*, 2010). Le culot contenant les oocystes de *Cryptosporidium* peut alors être soumis à différentes techniques : la centrifugation au gradient de Percoll®, la flottation au chlorure de sodium saturé, la flottation au sucrose, la flottation au sulfate de magnésium ou de zinc mais également des filtrations à travers du polypropylène tissé ou des filtres en polycarbonate dans le cas des échantillons d'eau (O'DONOGHUE, 1995 ; WYATT *et al.*, 2010). Dans le cas de fèces avec un taux élevé de lipides, il est recommandé d'effectuer des étapes supplémentaires utilisant du formol-éthyl acétate ou du diéthyl éther (WYATT *et al.*, 2010).

Il semblerait que les méthodes les plus adaptées soient celles utilisant des solutions de densité élevée. Il est cependant recommandé d'examiner l'échantillon le plus rapidement possible après la préparation en raison des effets délétères de ces solutions sur les oocystes (O'DONOGHUE, 1995). Le liquide le plus employé pour la mise en évidence des oocystes de *Cryptosporidium sp.* est la solution de Sheather (ou solution de saccharose). (CHANUDET, 2012)

VII.2.2.2. Méthodes de coloration :

Avant toute coloration, il est recommandé de fixer l'échantillon (frottis de matières fécales) à l'aide d'un fixateur de type formol à 10% ou de SAF (*Sodium Acetate – aceticacid – Formaldehyde*) (O'DONOGHUE, 1995). De nombreuses techniques de coloration sont disponibles :

(a) La coloration au saccharose : La coloration au saccharose repose sur l'utilisation de la solution de Sheather. Elle permet de visualiser les oocystes qui apparaissent réfringents

et roses sur fond gris-orange. (CHANUDET, 2012). Un montage entre lame et lamelle est réalisé avec une goutte de saccharose et une goutte de matière fécale. La lecture doit être effectuée dans les 20 minutes pour éviter la baisse en intensité de la coloration et l'altération des oocytes. (BEUGNET *et al*, 2004). Cette technique a une bonne sensibilité et spécificité, elle est peu coûteuse, rapide et facilement réalisable, mais ne permet pas une conservation des lames. (CHARTIER et PARAUD, 2010)(CHANUDET, 2012)

(b) Coloration de Heine : Cette méthode repose sur l'emploi de fuchsine pour la mise en évidence des oocystes.

Un montage entre lame et lamelle est effectué à quantité égale entre les matières fécales et le réactif. Les cryptosporidies ne sont pas colorées mais apparaissent réfringentes sur un fond rouge pendant une quinzaine de minutes. (BEUGNET *et al*, 2004)(figure 11)

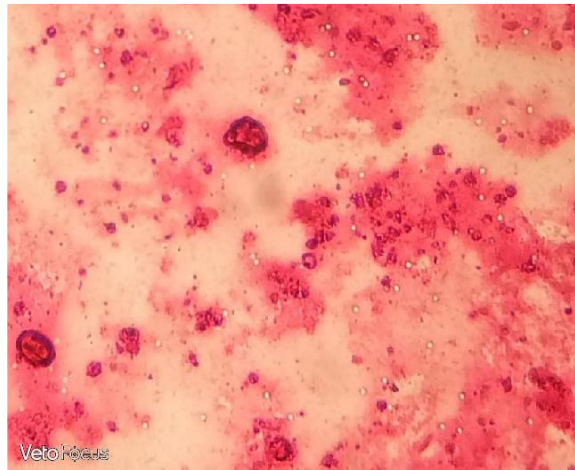


Figure 11 : Coloration d'oocystes de *Cryptosporidium* à la fuchsine (Source : MEYUS sur le site internet VETOFOCUS)

C'est une méthode simple, facile à mettre en œuvre et sensible. La détection des oocystes peut être améliorée par l'utilisation d'un microscope à contraste de phase. (CHANUDET, 2012)

(c) Coloration à l'auramine--fuschinecarbolique : C'est une technique de coloration par fluorescence qui s'effectue en deux temps:

1. Le frottis est coloré par l'auramine phénol puis
2. Recolorer par la fuchsine carbolique, sans étape de décoloration. (CHANUDET, 2012)

Les oocystes fluorescent sur un fond rouge-noir au microscope à fluorescence. Cette technique est rapide mais coûteuse et nécessite une coloration de contrôle. (BEUGNET *et al*, 2004)(O'DONOGHUE, 1995). D'autres fluorochromes, tels que l'auramine-rhodamine (**Figure 12**) peuvent également être utilisés, ils sont très sensibles mais demeurent coûteux (FAYER et UNGAR, 1986 ; O'DONOGHUE, 1995).

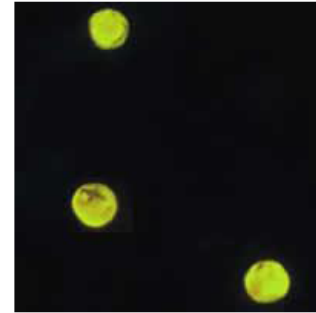


Figure 12 : Coloration d'oocystes de *Cryptosporidium* à l'auramine-rhodamine (Source : CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC)).

(d) Coloration de Ziehl---Neelsen modifiée : C'est la technique la plus utilisée par les laboratoires. Elle comprend quatre étapes: Une étape de fixation, une de coloration, une autre de décoloration et une dernière de recoloration. (*Technique décrite dans le chapitre matériels et méthodes*)

Elle permet de visualiser les oocystes qui apparaissent rouges sur un fond vert. C'est une technique longue à mettre en œuvre, mais qui reste une méthode de référence dans la détection des oocystes de *Cryptosporidium sp*. C'est une méthode sensible et facile de lecture, permettant une conservation des lames.(CHANUDET,2012)

NB :

Il existe également des colorations dites « négatives », comme le vert de malachite, la merbromine ou la nigrosine, qui colorent le fond, les bactéries et les levures mais pas les oocystes. Cependant ces techniques sont chronophages et nécessitent un manipulateur expérimenté (FAYER *et al.*, 2000).

En résumé des méthodes microscopiques : la coloration de Ziehl---Neelsen modifiée ou la coloration à l'auramine-fuschine carbolique s'avèrent très longues de mise en œuvre, et nécessitent une personne qualifiée et un équipement adapté pour la lecture des lames. D'autres colorations telles que la coloration au saccharose sont faciles de réalisation et adaptables au sein d'une clinique vétérinaire. Toutefois l'ensemble de ces méthodes peut faire l'objet d'un manque de spécificité et/ou de sensibilité lorsque l'échantillon est pauvre en oocyste de *Cryptosporidium sp*.(JEX *et al*,2008)

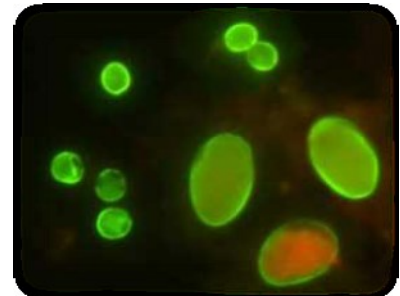
VII.2.3. Méthodes immunologiques :

Les techniques d'immunomarquage permettent la mise en évidence des oocystes dans l'échantillon grâce à deux réactions immunologiques de type antigène-anticorps. En effet, un antigène de surface de l'oocyste est reconnu spécifiquement par un anticorps dit primaire, lui-même reconnu spécifiquement par un anticorps secondaire portant un marqueur. Ceci permet une amplification du signal mais également une détection du parasite présent en faible quantité. (FAYER *et al.*, 2000).

- (a) **Immuno-fluorescence directe** : L'immunofluorescence directe est une technique de coloration utilisant des anticorps monoclonaux fluorescents dirigés contre les cryptosporidies (FITC-C-mAB:fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-Cryptosporidium monoclonal antibody).

Cette technique présente une bonne spécificité (96–100%) et une forte sensibilité (98,5–100%). Elle est utilisée en routine dans les laboratoires.(JEX*etal*,2008). C'est une méthode rapide et peu onéreuse, mais nécessitant un équipement spécialisé (utilisation d'un microscope a fluorescence). (CHANUDET,2012)

Figure 13 : Image d'oocystes de *Cryptosporidium* révélés par des anticorps immunofluorescents
(Source : CDC).



- (b) **Immuno-chromatographie** : Plusieurs tests immuno-chromatographiques rapides sont disponibles pour le vétérinaire praticien. Ils peuvent détecter les antigènes d'un agent pathogène seul, telque *Cryptosporidium sp*, ou en détecter plusieurs simultanément.

Les anticorps monoclonaux sont dirigés contre des protéines spécifiques de la paroi des oocystes. Ils sont généralement liés à un composé colloïdal ou à des billes de latex à fin de produire un signal visuel. (CHANUDET, 2012)

Ces tests se présentent sous forme de tiges ou de plaquettes. La spécificité de ces tests est généralement de 93% pour une sensibilité de 78%.(CHARTIER et PARAUD, 2010)

(c) ELISA : La technique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) repose sur la détection des antigènes de surface des oocystes de *Cryptosporidium sp.* (Technique décrite dans le chapitre matériels et méthodes)

Ces tests sont intéressants pour mettre en évidence des oocystes de *Cryptosporidium* présents en faible quantité parmi un nombre important de débris (O'DONOGHUE, 1995). Cependant, des réactions croisées sont possibles entre les anticorps et d'autres microorganismes révélant un manque de spécificité de ces méthodes (FAYER *et al.*, 2000).

En résumé des méthodes immunologiques : Les techniques ELISA et immunochromatographiques permettent une bonne détection des antigènes de *Cryptosporidium sp.*, et leur spécificité est généralement de 98 à 100%. Cependant la sensibilité est parfois plus basse que pour les méthodes microscopiques. Ils sont avantageux sur le plan financier et permettent de tester plusieurs animaux. (JEX *et al.*, 2008)

VII.2.4. Diagnostic de biologie moléculaire :

a) Les marqueurs génétiques : Les techniques moléculaires actuelles se basent principalement sur la petite sous unité *SSU* d'ARN ribosomal pour la détection du genre *Cryptosporidium sp.*

La présence de séquences hautement conservées intraspécifiques et de séquences interspécifiques hautement variables et le nombre élevé de copies au sein des oocystes en font une cible de choix.

b) L'hybridation in situ en fluorescence : L'hybridation in situ en fluorescence (*FISH: Fluorescent in situ hybridization*) repose sur l'hybridation d'une séquence cible d'ARN ou d'ADN avec des oligo-nucléotides marqués par fluorescence.

La séquence cible choisie pour la détection de *Cryptosporidium sp.* est une région variable de la séquence de la petite sous-unité ribosomale.

En principe seul les oocystes viables sont détectés, l'ARN se dégradant dans les oocystes non viables. Cette théorie est actuellement très controversée. (JEX *et al.*, 2008)

c) La Réaction de Polymérisation en Chaîne(PCR) : De nombreuses méthodes basées sur la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sont utilisées pour la détection et la caractérisation des espèces de *Cryptosporidium sp.*

Les principales sont l'amplification aléatoire d'AND polymorphe (*RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA*), le polymorphisme de longueur de fragment amplifié (*AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism*), la PCR associée au polymorphisme de longueur des fragments de restriction (*RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism*), et la PCR en temps réel. (JEX *et al.*,2008)(GASSER,2006)

La PCR –RFLP est la méthode la plus utilisée dans la détection et la caractérisation de *Cryptosporidium sp.* (JEX*etal.*,2008)

En résumé des méthodes moléculaires : Comme le rappelle DE WAELE *et al.* (2010), les examens microscopiques souffrent très souvent d'un manque de sensibilité et ne permettent la mise en évidence que d'animaux cliniquement atteints et excréant de grandes quantités d'oocystes.

Selon une étude de DE WAELE *et al.* (2010), la PCR quantitative serait la méthode la plus sensible et permettrait d'identifier les animaux dans les stades les plus précoces de la maladie. La quantité de faux positifs n'est cependant pas négligeable, elle résulte de la détection d'acides nucléiques nus, de micro-organismes non viables et d'une contamination de l'échantillon en laboratoire (FAYER *et al.*, 2000).

D'un point de vue épidémiologique (un intérêt en santé publique), l'utilisation de telles techniques permet de déterminer le génotype mais aussi le sous-type de *Cryptosporidium* présents tant chez les animaux que dans les autres sources de parasites à l'origine d'une contamination humaine. La principale limite réside dans le fait que seul le génotype dominant est détecté dans l'échantillon (XIAO, 2010).

VII.2.5. Cytométrie de flux :

La cytométrie de flux se définit comme l'étude précise de cellules isolées entraînées par un flux liquide. L'analyse de signaux optiques ou physiques émis par les particules coupant le faisceau lumineux d'un laser permet une caractérisation individuelle, qualitative et quantitative de celles-ci.

Dans le cas de la détection des oocystes de *Cryptosporidium*, le marquage de ceux-ci avec des anticorps fluorescents est effectué préalablement au passage dans le cytomètre de flux. La combinaison de ces deux méthodes permet la détection de faibles quantités d'oocystes,

cependant les seuils de sensibilité et les taux de récupération des oocystes varient selon les études (JEX *et al.*, 2008 ; LECONTE, 2013).

Les techniques de cytométrie de flux et de tri cellulaire auraient une meilleure sensibilité que les techniques de microscopie conventionnelle (O'DONOGHUE, 1995).

VII.2.6. Diagnostic histologique :

L'infection à *Cryptosporidium parvum* est à l'origine d'une atrophie modérée à sévère des villosités intestinales accompagnée d'une fusion de celles-ci et d'une infiltration de la lamina propria par des cellules mononucléaires et des granulocytes neutrophiles (DE GRAAF *et al.*, 1999(a) ; SMITH, 2008). Cependant ces lésions, non pathognomoniques, ne permettent pas de confirmer le diagnostic de Cryptosporidiose. L'examen histologique peut en revanche mettre en évidence la présence de différents stades du parasite dans les échantillons observés, ceci est illustré par la **Figure 14**. Dans un premier temps, les tissus sont fixés pour éviter l'autolyse. Les échantillons sont ensuite colorés à l'aide d'hématoxyline et d'éosine ou par la coloration de Giemsa. Néanmoins, l'utilisation d'un microscope électronique est souvent nécessaire pour confirmer l'identité des micro-organismes présents (O'DONOGHUE, 1995).

Ces techniques s'avèrent peu sensibles en raison de la taille des échantillons et de la distribution irrégulière du parasite dans les tissus prélevés. Etant également coûteuses et chronophages, elles ne sont pas recommandées pour un diagnostic de routine (O'DONOGHUE, 1995).

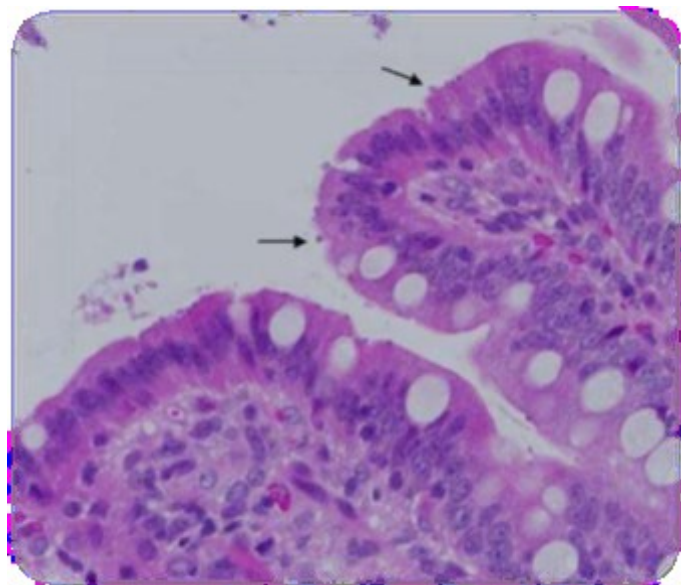


Figure 14 : Coupe histologique colorée à l'Hémalin-Eosine-Safran d'un intestin parasité par *Cryptosporidium parvum* (Source : NARO).

VIII. Cadre de l'étude

VIII.1. Délimitation géographique de la région et des sites d'étude :

Dans cette étude, nous avons échantillonné un total de 25 exploitation à vocation sur l'élevage semi-intensif, répartis dans une vaste région du sahara méridional et septentrional, (entre 32°10'N et 36°30'N, 3°25'E à 7°55'E). Cette région s'étale sur un ensemble de 5 Wilayas et de 3 bassins versants et abritent une grande diversité de milieux et d'écosystème naturel (aquatiques, forêt, steppes, montagnes,...).

VIII.2. Bioclimatologie :

La région prospectée est caractérisée par cinq étages bioclimatiques différents: semi-aride, aride, sub-désertique et désertique (UNESCO, 1963)

VIII.3. Aspect géomorphologique et hydrographique :

(a) Données géomorphologiques :

Le relief d'Algérie du Nord se compose de deux principales chaînes montagneuses : l'Atlas Tellien et l'Atlas Saharien : ce sont deux ensembles parallèles qui parcourent le pays d'Ouest en Est, ils se rapprochent au centre du pays jusqu'à presque se confondre à l'extrême Est (Aurès) vers la Tunisie. Ces deux chaînes constituent des frontières naturelles entre lesquelles s'intercalent de vastes plaines et hauts plateaux (FAO, 2003). La partie sud est dominée par le vaste désert (Fig. 15, 16). Le point le plus bas d'Algérie se trouve au Chott Melrhir (- 40m). L'Algérie présente une très grande variété de contextes géologiques. Morphologiquement, il y a trois grands domaines se distinguent du nord au sud du pays (Terra, 2006) (fig.7).

Au Nord, au pied de l'Atlas Tellien, se trouvent les plaines côtières qui donnent directement sur la mer méditerranée. La bande du Tell, large de 80 à 190 km, s'étend sur près de 1200 km de côtes. Elle est formée par une chaîne de montagnes (l'Ouarsenis, le Djurdjura, les Babors, les Bibans...) qui longe le littoral. Ces montagnes sont, souvent,

séparées par des vallées parcourues de cours d'eau. Ce caractère confère à la région une richesse floristique et faunistique importante Terra (2006).

Entre l'Atlas tellien et l'Atlas saharien, on trouve un ensemble de plaines et hauts plateaux semi-arides parsemés de nombreuses dépressions appelées «Chotts » , lesquels se transforment en lacs salés à la saison des pluies.

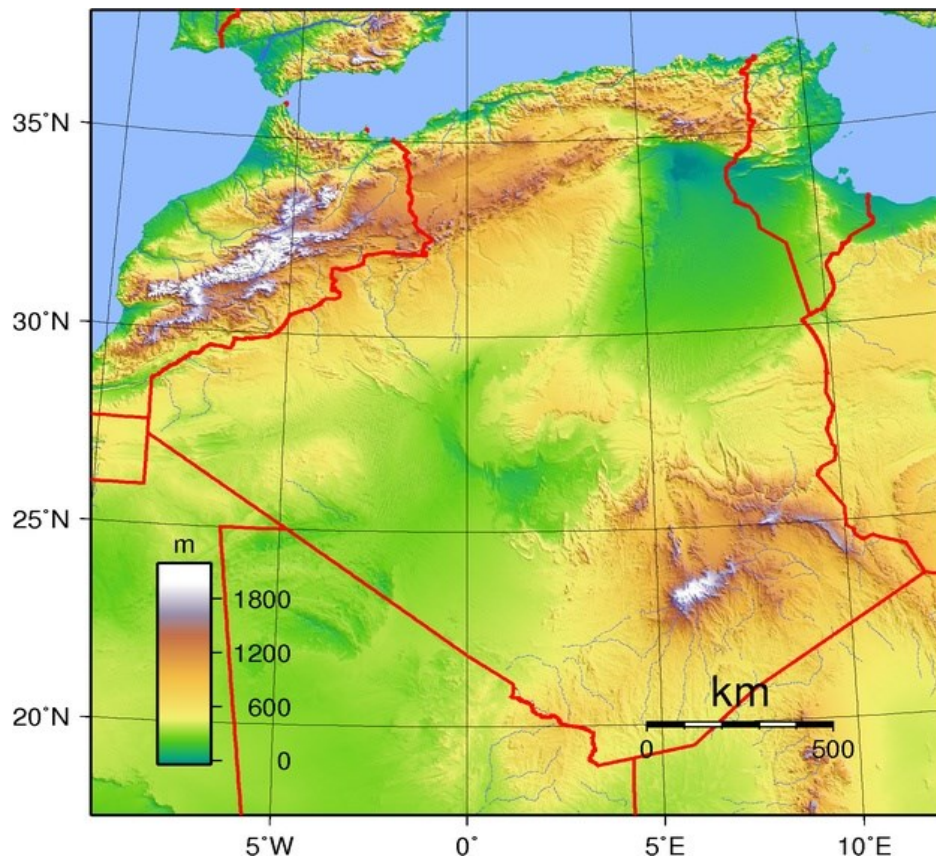


Figure 15: Les principales formations géographiques en Algérie (FAO, 2003)

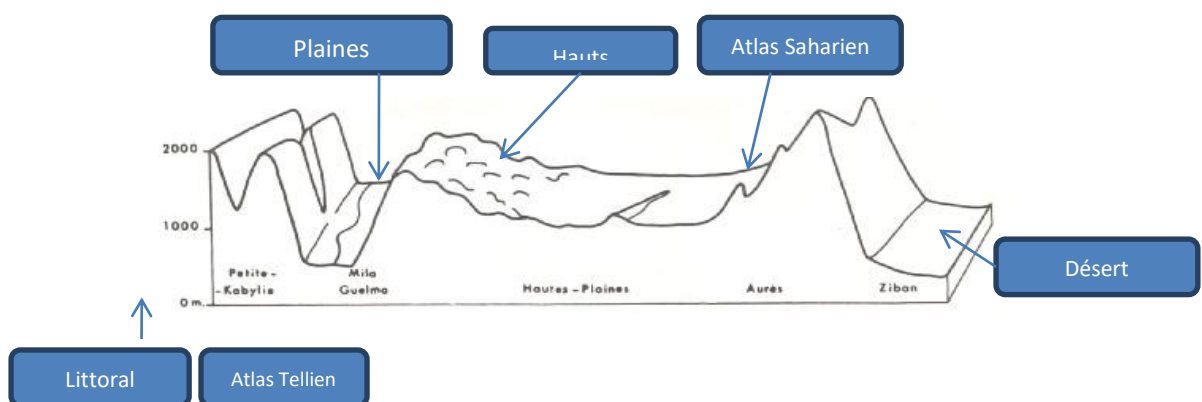


Figure 16: Coupe topographique de l'Algérie Cote, (1981) (modifie).

Selon Terra (2006), l'Atlas tellien (ou Tell), constitué de reliefs escarpés et de plaines littorales s'étalant sur une bande de 100 à 150 kms. Dans cette région on distingue deux types de plaines ;

- les côtières et sub-littorales, sont sous l'influence du climat méditerranéen
- les plaines intérieures et alluviales, du climat continental de l'Atlas Tellien.

Les Hauts Plateaux occupent une bande de 300 à 350 kms et sont caractérisés par des espaces steppiques ou semi-arides à vocation agro-pastorale ou de céréaliculture. L'Atlas saharien, relie le Haut Atlas marocain à la frontière tunisienne où l'on y rencontre le massif des Ksour, le Djebel Amour, les Zibans et les monts Hodna qui rejoignent la bande du Tell à l'Est et continue pour finir dans les Aurès. La zone connectée par notre travail constitue un véritable échantillon représentatif de la région Est du pays. Elle est subhumide au Nord, passant par le semi-aride, aride et, subdésertique jusqu'au désert au Sud.

(b) Données hydrologiques :

L'Algérie septentrionale présente un climat semi-aride qui se caractérise par une forte irrégularité pluviométrique (Fig.4). D'une manière générale, les bassins versants sont imperméables (A.N.R.H, 1993). Ce qui donne sur le plan des régimes hydrologiques:

- (i) Une extrême irrégularité saisonnière et interannuelle des écoulements qui est accentuée par de longues périodes de sécheresse;
- (ii) des crues violentes et rapides en périodes de pluies;
- (iii) une érosion intense et un transport de corps solides important.

Notre étude est portée sur un réseau de 9 bassins versant : Cheliff, Hauts Plateaux Constantinois, Cotier Constantinois, Sahara, Hodna, Seybouse, Chott Melghir et Zahrez.

VIII.4. Les caractéristiques climatiques de l'Algérie :

VIII.4. 1. Climat de la wilya d'El Bayadh :

Bénéficie d'un climat de steppe. A n'importe quel période de l'année, les précipitations sont faibles à El Bayadh. Selon la classification de Köppen-Geiger, le climat est de type BSk. El Bayadh affiche une température annuelle moyenne de 14.2 °C. La moyenne des précipitations annuelles atteints 271 mm.

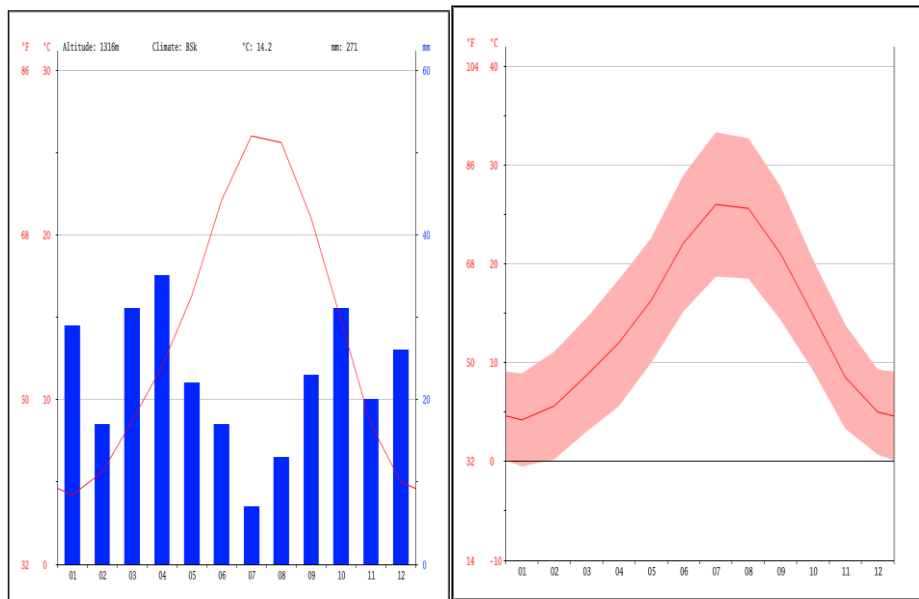


Figure 17: Diagramme ombrothermique et variation de la température de la Wilaya d'El-Bayadh

Une différence de 28 mm est enregistrée entre le mois le plus sec et le mois le plus humide. 21.8 °C de variation sont affichés sur l'ensemble de l'année.

Juillet est le mois le plus chaud de l'année. La température moyenne est de 26.0 °C à cette période. Janvier est le mois le plus froid de l'année. La température moyenne est de 4.2 °C à cette période.

VIII.4. 2. Climat de la wilaya de Laghouat :

Laghouat est doté d'un climat désertique. Au cours de l'année, il n'y a pratiquement aucune précipitation en Laghouat. D'après Köppen et Geiger, le climat y est classé BWk. Sur l'année, la température moyenne à Laghouat est de 17.4 °C. Chaque année, les précipitations sont en moyenne de 176 mm

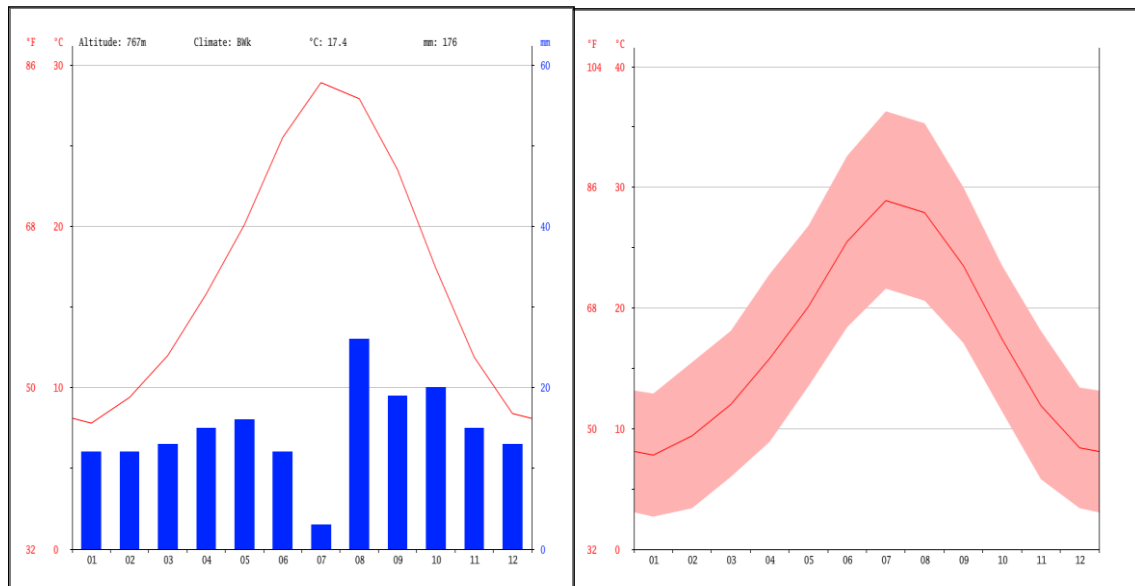


Figure 18 : Diagramme ombrothermique et variation de la température de la Wilaya de Laghouat

Les précipitations varient de 23 mm entre le plus sec et le plus humide des mois. Entre la température la plus basse et la plus élevée de l'année, la différence est de 21.1°C. Au mois de Juillet, la température moyenne est de 28.9°C. Juillet est de ce fait le mois le plus chaud de l'année. Le mois le plus froid de l'année est celui de Janvier avec une température de 7.8°C.

VIII.4.3 Climat de la wilaya de Djelfa :

Le climat de Djelfa est dit "de steppe". Il y a peu de précipitations, quelque soit la période de l'année, à Djelfa. Cet emplacement est classé comme BSk par Köppen et Geiger. En moyenne la température à Djelfa est de 13.4 °C. Les précipitations annuelles moyennes sont de 338 mm.

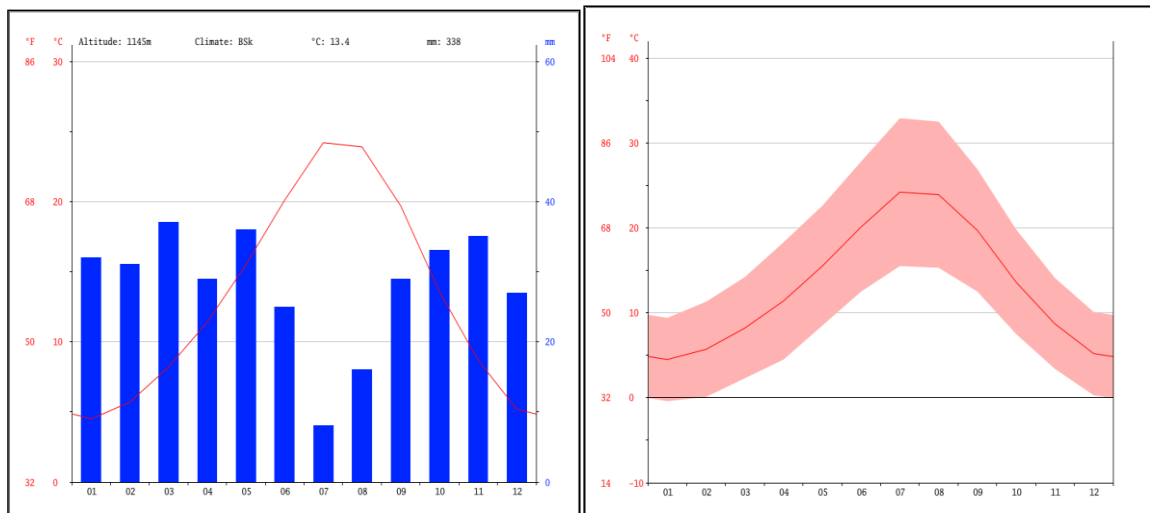


Figure 19 : Diagramme ombrothermique et variation de la température de la Wilaya de Djelfa

La variation des précipitations entre le mois le plus sec et le mois le plus humide est de 29 mm. Une différence de 19.7 °C existe entre la température la plus basse et la plus élevée sur toute l'année. Avec une température moyenne de 24.2 °C, le mois de Juillet est le plus chaud de l'année. Au mois de Janvier, la température moyenne est de 4.5 °C. Janvier est de ce fait le mois le plus froid de l'année.

VIII.4.4 Climat de la wilaya de Ghardaïa :

Le climat à Ghardaïa est dit désertique. Au cours de l'année, il n'y a pratiquement aucune précipitation en Ghardaïa. D'après Köppen et Geiger, le climat y est classé BWh. Sur l'année, la température moyenne à Ghardaïa est de 21.0 °C. Il tombe en moyenne 68 mm de pluie par an.

La différence de précipitations entre le mois le plus sec et le mois le plus humide est de 9 mm. Entre la température la plus basse et la plus élevée de l'année, la différence est de 23.3 °C. Le mois le plus chaud de l'année est celui de Juillet avec une température moyenne de 33.4 °C. Janvier est le mois le plus froid de l'année. La température moyenne est de 10.1 °C à cette période.

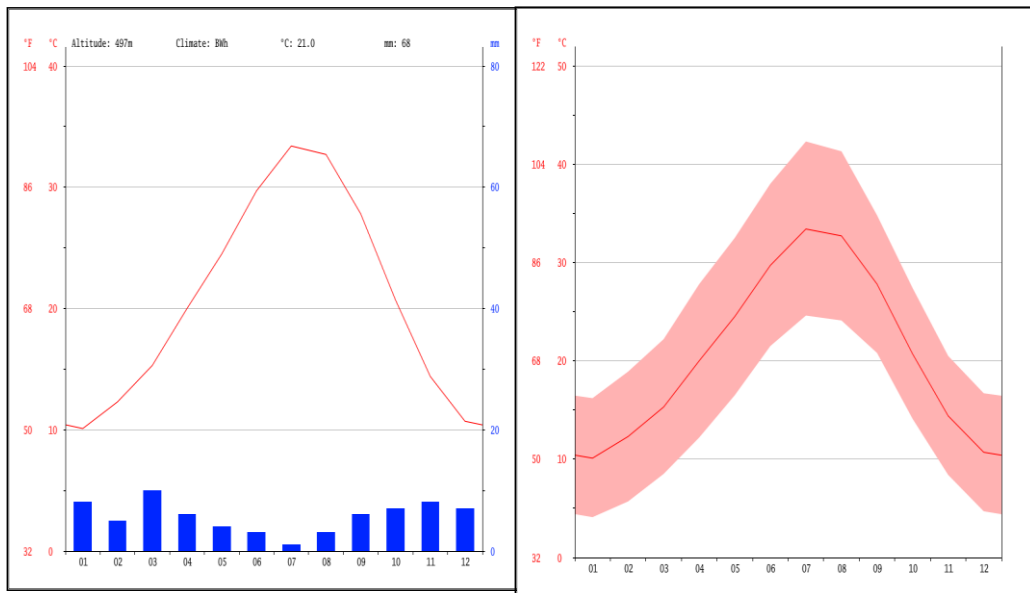


Figure 20 : Diagramme ombrothermique et variation de la température de la Wilaya de Ghardaia

VIII.4.5 Climat de la wilaya d’Ouargla :

Le climat dominant d’Ouargla est de type désertique. Au cours de l'année, il n'y a pratiquement aucune précipitation en Ouargla. Cet emplacement est classé comme BWh par Köppen et Geiger. En moyenne la température à Ouargla est de 22.3 °C. La moyenne des précipitations annuelles atteints 45 mm.

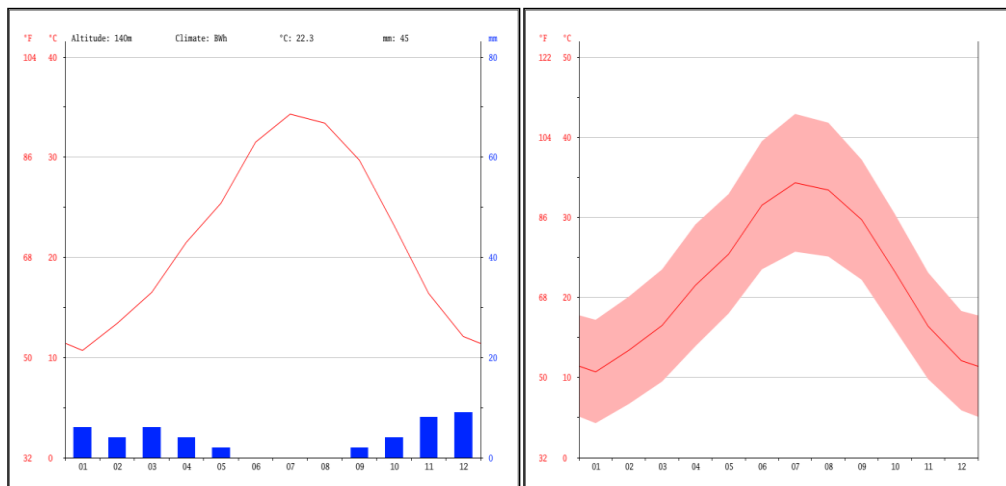


Figure 21: Diagramme ombrothermique et variation de la température de la Wilaya d’Ouargla

Entre le plus sec et le plus humide des mois, l'amplitude des précipitations est de 9 mm. Entre la température la plus basse et la plus élevée de l'année, la différence est de 23.6 °C. 34.3 °C font du mois de Juillet le plus chaud de l'année. Au mois de Janvier, la température moyenne est de 10.7 °C. Janvier est de ce fait le mois le plus froid de l'année.

CHAPITRE 2

MATERIELS ET METHODES

1. Objectif du travail :

Ce chapitre est consacré à la comparaison de deux méthodes de diagnostic de la cryptosporidiose et d'évaluer l'efficacité et la rentabilité de chacune d'elle entre la méthode d'examen direct (coloration de Ziehl Neelsen) et la méthode d'examen indirect (Test ELISA), sur les selles de 250 veaux des régions méridionales et septentrionales comprenant les 5 wilayas : Ouargla, Laghouat, El Bayadh, Djelfa et Ghardaïa.

2. Lieux de travail :

Ce travail a été effectué au niveau du Laboratoire Vétérinaire Régional, Laghouat (LVRL). Pour atteindre l'objectif de pouvoir évaluer l'efficacité des deux méthodes, Elisa et coloration dans le diagnostic de la cryptosporidiose, nous avons suivi les étapes décrites ci-dessous.

3. Méthodologie :

L'étude s'appuie sur un échantillonnage de selles de veaux non sevrés allaitants sains ou diarrhéique. Chaque prélèvement de fèces a été soumis aux deux tests de détection pour la *Cryptosporidium sp.*

a) Choix et Critères de sélection :

Procéder à l'identification de 05 fermes bovines de production laitière, cibler 10 veaux par exploitation, les veaux prélevés dans le cadre de l'étude sont des veaux diarrhéiques et de statut sains, l'ensemble des veaux collectés sont non traités et non sevré et sont âgés entre 1 semaine et 03 mois, ils sont de race exclusivement Holstein; l'élevage est à production laitière, tous les veaux prélevés dans les 5 wilayas sont élevés dans les mêmes conditions à savoir :

- Elevage : semi intensif
- Prophylaxie : désinfection à : l'Albendazol et ivermectine tous les 6 mois
- Mode de logement : des box
- Litière : paille

- Déjection : de type manuelle
- Intervalle de déjection : 1 fois par semaine
- Désinfection bâtiment : 1 fois par an
- les prélèvements reçus sont récoltés directement sur le terrain par les médecins vétérinaires
- Un questionnaire détaillé sur tous les critères nécessaires à cette étude a été remis aux vétérinaires du terrain

QUESTIONNAIRE

Wilaya :.....

Commune :.....

Lieu-dit :.....

Nom de l'exploitation :.....

Nom et prénom du propriétaire :.....

Coordonnées GPS de la ferme :.....

Type d'élevage :.....

Type de production :.....

Plan de prophylaxie parasitaire préconisé

- Produit utilisé :.....

- Période :.....

- Inexistant :.....

Mode de logement

- Libre :.....

- Entravé :.....

- Box :.....

Nature de litière

- Litière paillée :.....

- Sueur ou coupeaux :.....

- Caillebotis :.....

- Autre (préciser).....

Evacuation des déjections

- Curage de la litière au tracteur.....

- Evacuation manuelle.....

- Raclage mécanique.....

- Autre (préciser).....

Intervalle d'évacuation des déjections :

- Tout le jour :

- 1 fois/semaine :

- 1 fois/mois :

- Autre (préciser).....

Désinfection des bâtiments :

Oui ou non :

- Nombre de fois /an.....

- Autre (préciser).....

- Air d'exercice :

- existante ou non :

- Surface en m²/animal.....

Identification des prélèvements des veaux :

N identification	âge

Figure 22 : questionnaire à remplir

b) Modalités de prélèvement et identification des échantillons :

- **Prélèvement** : Les matières fécales elles seront effectuées dès leur émission. Les matières fécales sont recueillies soit spontanément, soit après excitation de l'orifice anal des animaux (stimulation de la défécation), l'échantillon est récolté dans un pot transparent à usage unique et fermé hermétiquement. Une quantité minimale de 5g de selles est prélevée sur chaque veau.
- **Identification** : On attribue à pot un numéro d'identification allant de 01 à 50 pour chaque wilaya, suivie du code wilaya. Les échantillons sont ensuite transportés à température ambiante jusqu'au laboratoire (22-25C°).

c) Déroulement des analyses des matières fécales récoltées :

Les niveaux d'excrétion d'oocystes sont très élevés lors de cryptosporidiose clinique, il est donc facile de mettre en évidence leur présence. Le diagnostic laboratoire repose sur la mise en évidence d'oocystes de *Cryptosporidium sp.* sans les matières fécales par les deux techniques choisis pour cette étude.

Une description macroscopique des selles prélevées doit être réalisée en complément des autres examens. La description macroscopique permet ainsi d'apprécier la couleur, la consistance, et l'aspect des selles prélevées.

Les méthodes microscopiques permettent de détecter la présence d'oocystes dans les matières fécales prélevées. Les oocystes sont des structures rondes à ovalaires dont la taille varie selon l'espèce de cryptosporidies observée.

Tableau 4 : Taille des oocystes de *Cryptosporidium sp*

Espèces de cryptosporidium	Taille de l'oocyste
<i>C. parvum</i>	5,4 x 4,9 µm
<i>C. bovis</i>	4,9 x 4,6 µm
<i>C. ryanae</i>	3,7 x 3,2 µm
<i>C. andersoni</i>	7,5 x 5,5 µm

Après collecte des matières fécales chaque prélèvement est soumis à la coloration de Ziehl Neelsen et l'identification par microscope. L'échantillon est ensuite conservé à -20C° en

attendant la récolte de la totalité des prélèvements pour pouvoir faire le deuxième test, l'ELISA (manuel terrestre de l'OIE 2008).

La méthode de travail de cette étude est décrite dans la figure 3.

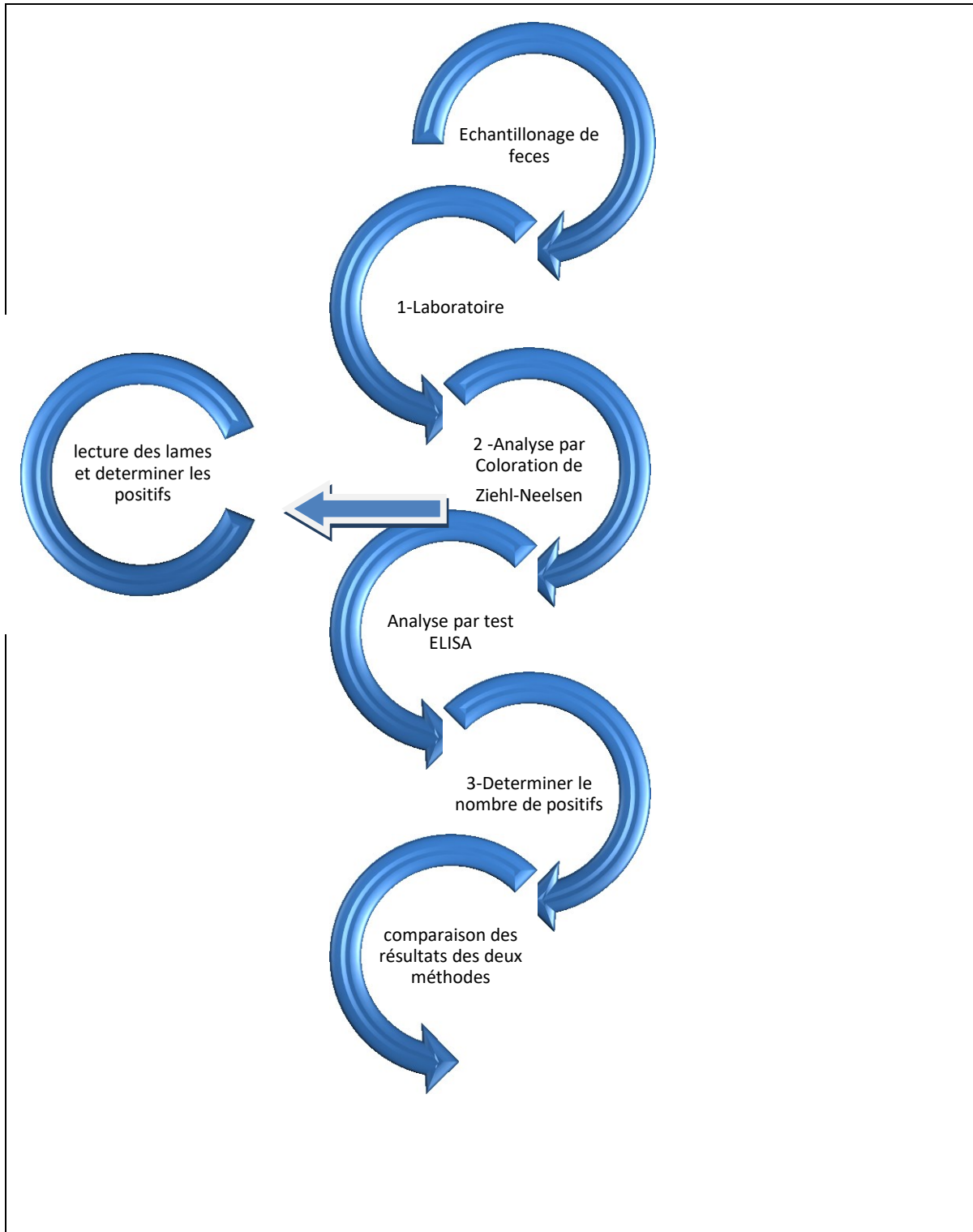


Figure 23 : Organigramme de la méthode de travail

1) Méthode d'examen direct : Méthodes microscopiques

- Recherche de la cryptosporidiose par la technique de la coloration de Ziehl-Neelsen : Nous avons traité les échantillons par wilaya,

- Nous avons préparé les échantillons : les échantillons conservé a 4c° sont mis sur la paillasse, une goutte d'eau physiologique est déposée sur chaque lame, on ajoute une petite portion de selles et bien mélanger pour obtenir une suspension uniforme qu'on étale sous forme de frottis. figure 4



Figure 24 : Etalement du frottis

- Ensuite nous avons :

- Fixé les frottis de chaque échantillon à l'éthanol absolu pendant au moins 5 minutes et sécher a l'air libre.



Figure 25 : Séchage des lames

- Immergé la lame dans la solution de fushine phénique et colorer pendant 15 mn



Figure 26 : coloration des lames à la fushine

- Rincé la lame sous un jet d'eau



Figure 27 : rinçage des lames

- Décoloré dans le méthanol acide à 1% pendant 10 à 15 secondes
- Rincé la lame sous un jet d'eau
- Contre coloré avec le vert malachite à 0.4% pendant 30 secondes



Figure 28 : coloration des lames au vert malachite

- Rincé la lame sous un jet d'eau
- Séché à l'air libre
- Examiné la lame sans lamelle couvre objet avec l'objectif x 40 au microscope optique

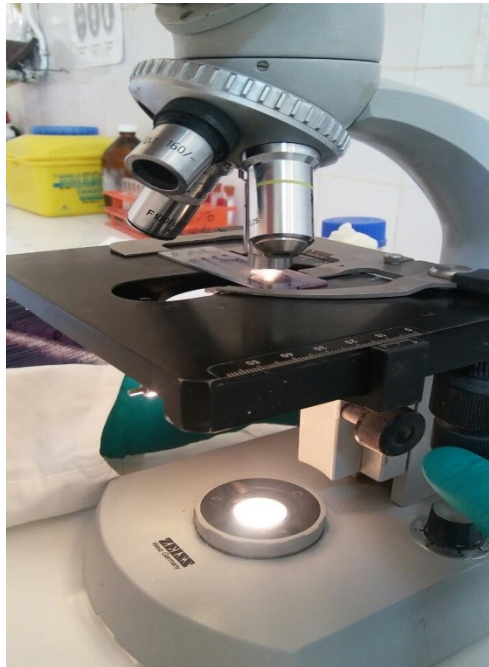


Figure 29 : Observation microscopique

- Examiné la lame à l'huile d'immersion à l'objectif x 100
- Repéré la forme et la dimension des éléments colorés en rouge. :

- **Observation au microscope de cryptosporidium sp :**

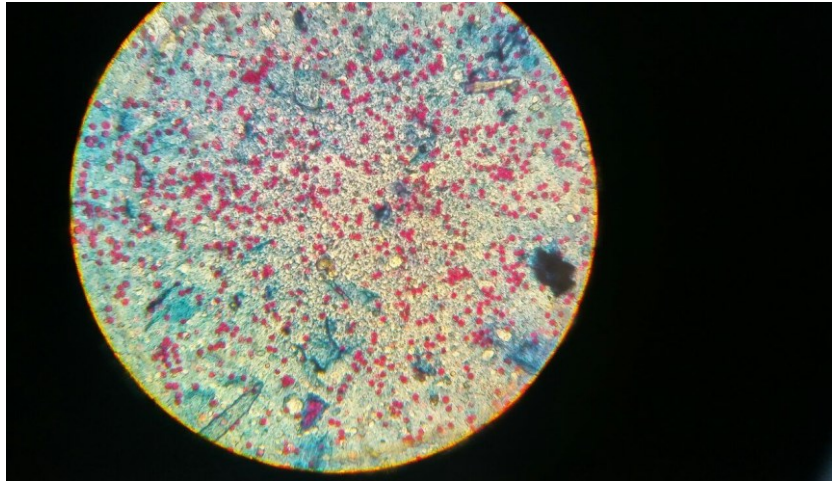


Figure 30 : Oocyste de *Cryptosporidium*. Sp après coloration de Ziehl Neelsen
(Grossiment X40 ; LVRL 2019)

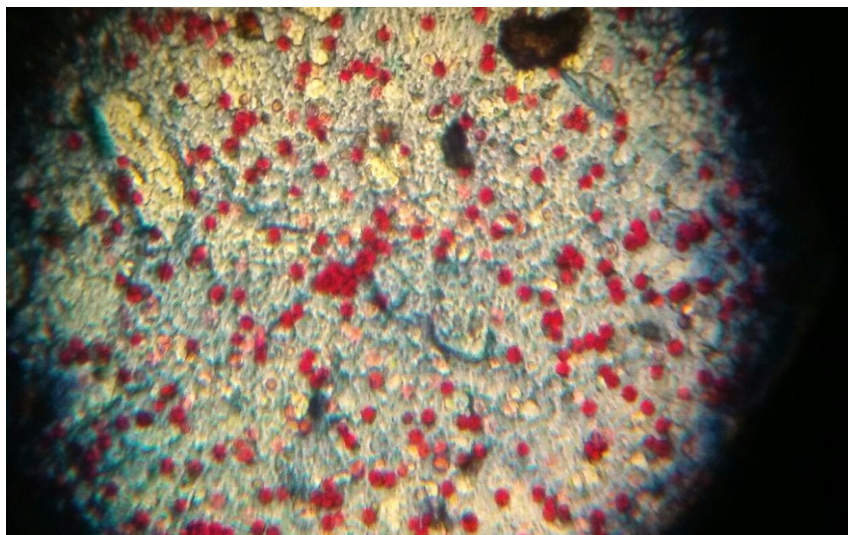


Figure 31 : Oocyste de *Cryptosporidium*. Sp après coloration de Ziehl Neelsen
(Grossiment X100 ; LVRL 2019)

. **Éléments diagnostiques des oocystes de cryptosporidies colorés par la méthode mZn :** Les oocystes de *Cryptosporidium* spp. sont colorés en rouge sur un fond vert pâle. Le degré et la proportion de couleur varient avec les oocystes. En outre, les structures internes prennent le colorant de façon variable. Certains peuvent apparaître vides alors que d'autres peuvent contenir les éléments en croissant caractéristiques des sprozoïtes. Les oocystes de *C. parvum* apparaissent sous la forme de disques de 4 à 6 μm de diamètre. Les levures et les débris fécaux se colorent en rouge terne. Certaines spores de bactéries peuvent également se colorer en rouge mais elles sont trop petites pour prêter à confusion.

2) Méthode d'examen indirect : Méthode immunologique l'ELISA



Figure 32 : Les constituants du kit ELISA

➤ Les constituants du kit ELISA:

- **Microplaque** : 2 microplaques de 96 puits. Les lignes A, C, E, G sont sensibilisées par l'anticorps spécifique des ookystes de *Cryptosporidium* et les lignes B, D, F, H par l'anticorps témoin (anticorps monoclonal non spécifique du parasite).
- **Solution de lavage (1 X 100 ml (20 X))** : 1 flacon de 100 ml de solution de lavage concentrée 20 fois. La solution cristallise spontanément à froid. En cas d'utilisation partielle de la solution, amener le flacon à 21°C +/- 3°C de façon à ce que tous les cristaux disparaissent; bien mélanger la solution et en prélever le volume nécessaire. Diluer 20 fois le tampon dans de l'eau distillée ou déminéralisée.

- **Tampon de dilution (1 X 50 ml (5 X))** : 1 flacon de 50 ml de tampon de dilution coloré, concentré 5 fois. En cas d'utilisation partielle, bien mélanger et en prélever le volume nécessaire. Diluer 5 fois le tampon dans de l'eau distillée ou déminéralisée. En cas d'apparition d'un dépôt dans le fond du récipient, filtrer la solution sur un filtre en papier de type Whatman.
- **Conjugué (1X 25 ml (1 X))** : 1 flacon de 25 ml de conjugué anti-ookystes de *Cryptosporidium* : (anticorps monoclonal anti-ookystes couplé à la peroxydase de raifort). Le réactif est prêt à l'emploi.
- **Contrôle positif : Antigène de contrôle (1 X 4 ml (1 X))** : 1 flacon de 4 ml. Le réactif est prêt à l'emploi.
- **Solution de TMB mono-composant (1 X 25 ml (1 X))**: 1 flacon de 25 ml de chromogène TMB (tétraméthylbenzidine). Ce réactif se conserve entre +2°C et +8°C à l'abri de la lumière. Il est prêt à l'emploi.
- **Solution d'arrêt (1 X 15 ml (1 X))** : 1 flacon de 15 ml de solution d'arrêt contenant de l'acide phosphorique 1 M.

➤ **Mode opératoire :**

- 1- Nous avons ramené tous les constituants à 21°C +/- 3°C avant utilisation.
- 2- Retiré la microplaque de son emballage.
- 3- Dilué au demi les matières fécales dans le tampon de dilution (tube à essai). Pour les échantillons consistant, rendant l'homogénéisation difficile, nous avons ajouté dans le récipient des billes de verre et délité la selle en agitant vigoureusement l'ensemble. Pas de centrifugation.
- 4- Distribué les échantillons dilués à raison de 100 µl par puits en respectant la disposition suivante : Echantillon 1 : puits A1-B1 ; Echantillon 2 : puits C1-D1, jusqu'à épuisement des prélèvements, puis nous avons procédé de la même manière pour le contrôle positif – 100 µl/puits (ex. G1-H1).
- 5- Nous avons couvert et incubé la plaque à 21°C +/- 3°C durant 1 heure.
- 6- Rincé la plaque à l'aide de la solution de lavage préparée. Pour ce faire, nous avons éliminé le contenu de la microplaque en la retournant vigoureusement au-dessus d'un récipient contenant un agent inactivant. Puis Egoutté la microplaque à l'envers sur une feuille de papier absorbant propre de manière à bien éliminer tout le liquide, ajouter 300 µl de la solution de lavage puis vidé à nouveau la plaque par retournement au-dessus du

réceptacle de confinement. Nous avons Répété deux fois toute l'opération en évitant tout particulièrement la formation de bulles dans les cupules. A l'issue de ces 3 lavages on passe au point suivant ;

- 7- Distribué le conjugué à raison de 100 µl par puits. Nous avons Couvert et incubé 1 heure à 21°C +/- 3°C.
- 8- Lavé la plaque comme décrit au point 6.
- 9- Distribué le révélateur sur la microplaque à raison de 100 µl par puits. La solution de révélateur doit être parfaitement incolore lors de la distribution sur la microplaque. Incubé 10 minutes à 21°C +/- 3°C sans couvrir et à l'obscurité.
- 10- Distribué 50 µl de solution d'arrêt par puits. La couleur passe de bleu à jaune.
- 11- Enregistré les densités optiques à l'aide d'un spectrophotomètre pour plaques en utilisant un filtre de 450 nm. Les résultats doivent être enregistrés le plus rapidement possible après l'application de la solution d'arrêt. En effet, en cas de signal élevé, le chromogène peut cristalliser et conduire à des mesures erronées.

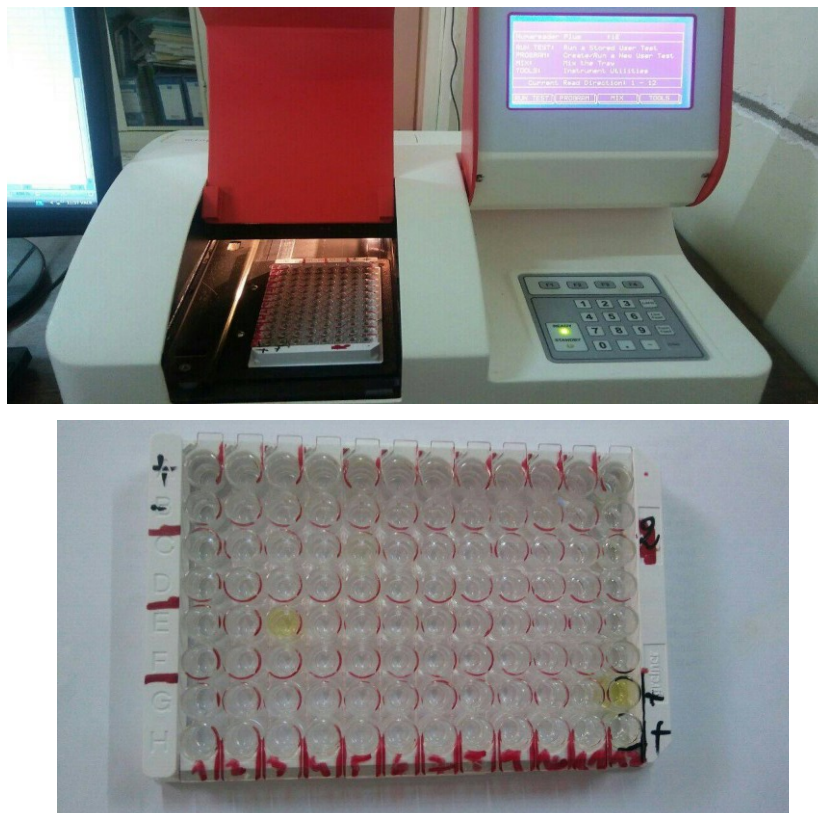


Figure 33 : Lecteur et plaque ELISA

CHAPITRE 3

RESULTAS ET DISCUSSION

Un suivi s'est effectué au cours de la période de janvier à mai 2019, nous a permis d'étudier un effectif total de 250 veaux au niveau des 5 wilayas

1- Rapport diarrhée et parasite :

▪ veaux diarrhéiques et veaux sains :

L'étude a été réalisée sur une population de 250 veaux allaitants non sevrés se composant de 4 veaux diarrhéiques et de 246 veaux sains.

Tableau 5 : Pourcentage des veaux sains et diarrhéique

Statut du veau	Veaux diarrhéique	Veaux sains
Nombre de veaux	04	246
Pourcentage	2%	98%

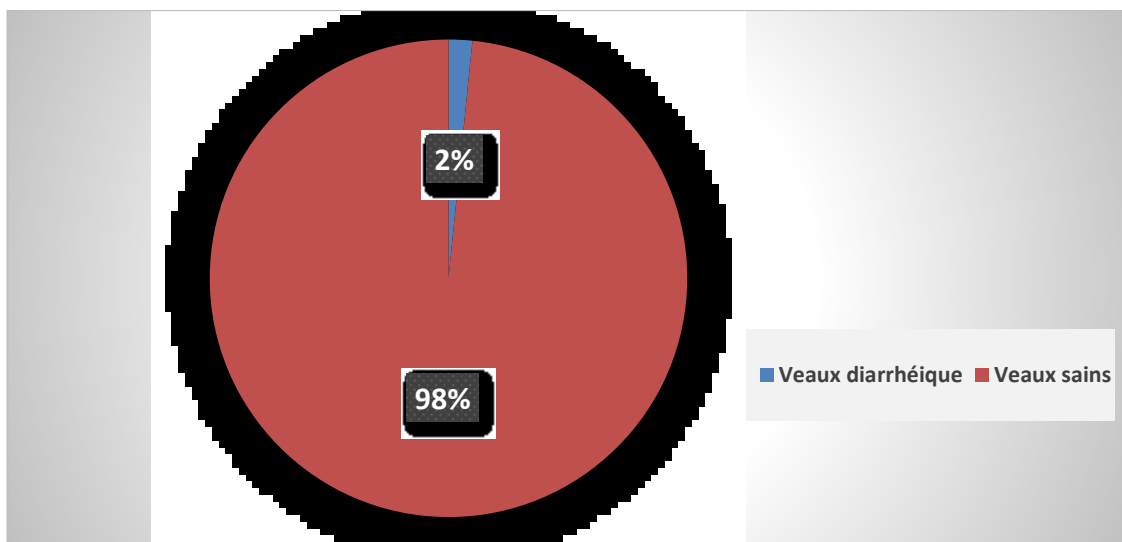


Figure34 : La répartition des veaux sains et diarrhéiques de l'étude

▪ Présence et absence du parasite au niveau des veaux sains et diarrhéiques :

Sur les 250 veaux récoltés, on note que les veaux diarrhéiques positifs au parasite à au moins un des deux tests étudiés représentent une population de 2%.

Tableau 6 : La répartition des veaux selon leurs parasitismes

	Effectif	Pourcentage
Veaux diarrhéiques positif	4	2%
Veaux diarrhéiques négatif	0	0%
Veaux sains positif	76	30%
Veaux sains négatif	170	68%
Total	250	100%

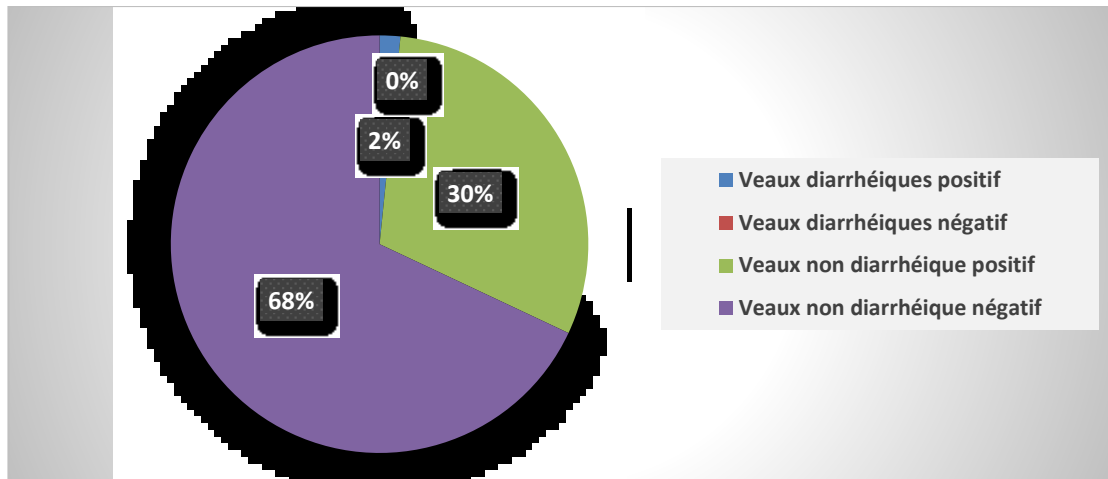


Figure 35 : Répartition des veaux selon leurs parasitismes.

2. Analyse descriptive :

- Age des veaux :

Tableau 7 : Les effectifs des veaux selon la tranche d'âge

	Nombre d'individu	Pourcentage
Veaux de 0-1 mois	148	59%
Veaux de 2-3 mois	102	41%
Total	250	100%

L'étude porte sur un effectif total de 250 veaux âgé entre 1 semaine et 3 mois. Au sein de cette population on dénombre 148 individus de un mois et ceux qui ont un âge entre 2 et 3 mois présente un effectif de 102 individus.

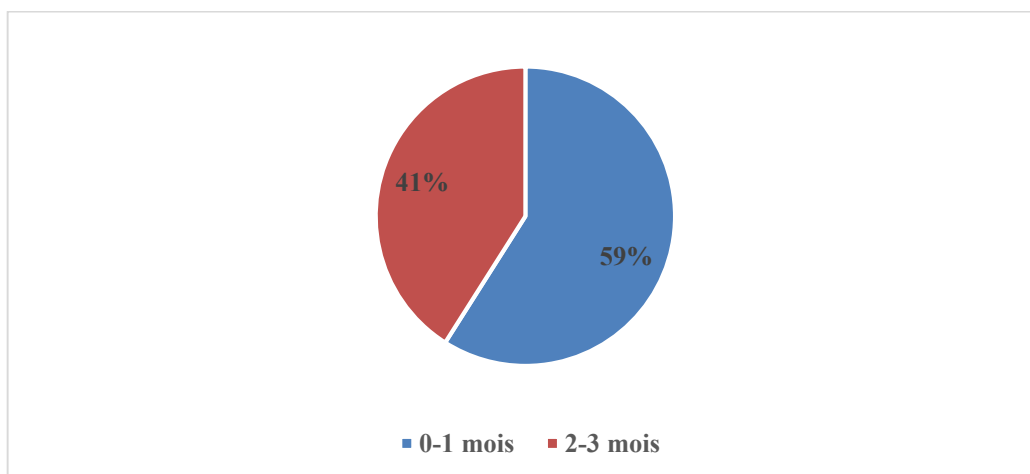


Figure 36 : Pourcentage des effectifs en fonction de l'âge

3- Résultats de comparaison des deux tests étudiés :

Un test est évalué sur certains critères, le but de ce travail est d'évaluer l'efficacité technique et la rentabilité financière et une rapidité de résultats pour cela ; Nous étudierons d'abord la prévalence par wilayas ensuite nous l'étudierons de façon globale.

a) El Bayadh :

- Les veaux récoltés par tranche d'âge :

Tableau 8: les tranches d'âge des veaux prélevés au niveau de la wilaya d'El Bayadh

	Nombre	Pourcentage
0-1 mois	31	62%
2-3 mois	19	38%
Total	50	100%

Les veaux représentant la plus jeune tranche d'âge 0-1 mois représentent 62% du total.

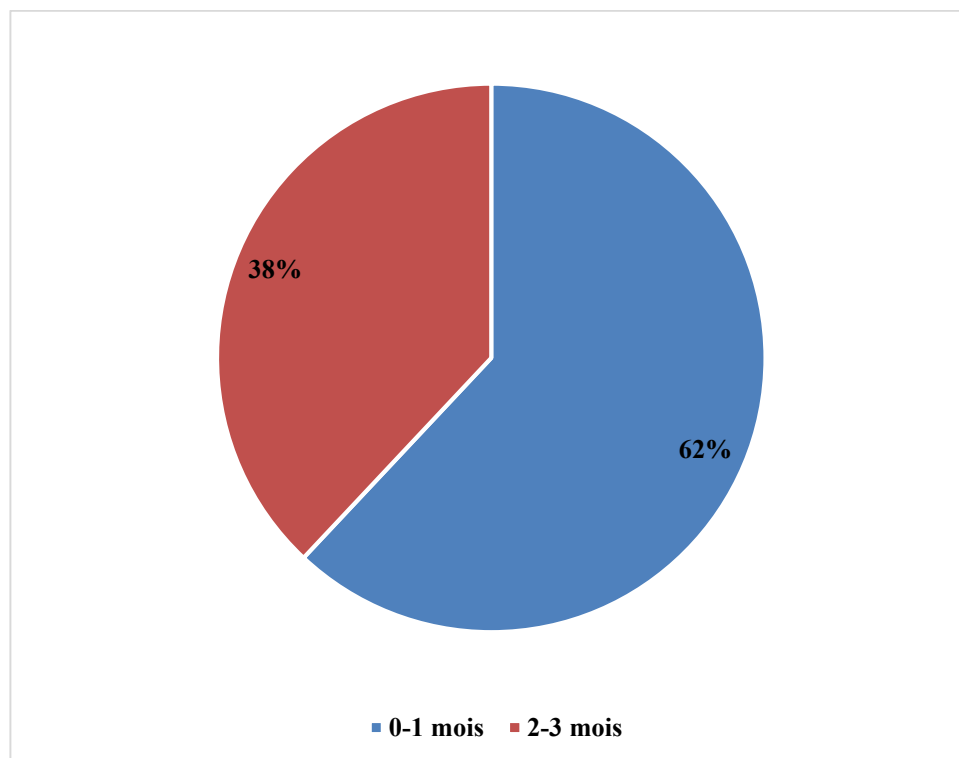


Figure 37: Tranches d'âges des veaux prélevés au niveau de la wilaya d'El Bayadh.

- Les veaux positifs aux deux tests par tranche d'âge :

Tableau 9 : les veaux positifs par tranche d'âge au niveau de la wilaya d'El Bayadh

	Effectif	Microscope	ELISA
0-1 mois	31	18	23
2-3 mois	19	8	11
Total	50	26	34

Les veaux récoltés positifs par rapport à la tranche d'âge : Sur un total de 50 veaux prélevés au niveau de la wilaya d'El Bayadh 26 se révèlent positifs en microscope et 34 en test ELISA soit une augmentation de 16% en diagnostic de la cryptosporidiose chez les deux tranches d'âge.

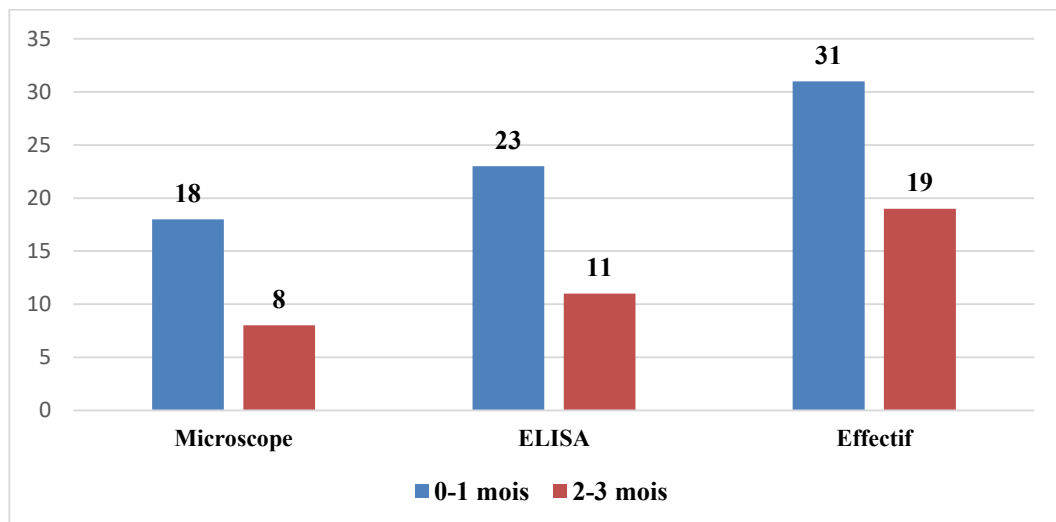


Figure 38 : Les veaux positifs par rapport à la tranche d'âge au niveau de la wilaya d'El Bayadh.

b) Ghardaïa :

- Les veaux récoltés par tranche d'âge :

Tableau 10 : répartition des veaux par tranche d'âge au niveau de la wilaya de Ghardaïa

	Nombre	Pourcentage
0-1 mois	42	84%
2-3 mois	8	16%

La population de veaux prélevés entre 0-1 mois représente une prévalence de 84%, contre 16% de veaux entre 2-3 mois.

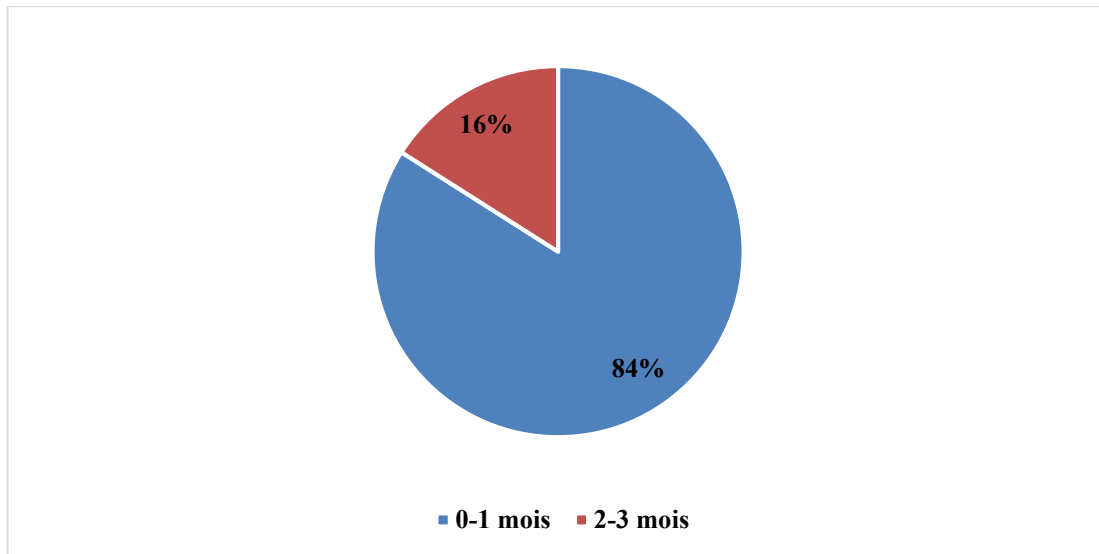


Figure 39 : la prévalence du *Cryptosporidium.sp* selon les tranches d'âge au niveau de la wilaya de Ghardaïa.

- Les veaux récoltés positifs par rapport à la tranche d'âge :

Tableau 11: les veaux positifs par tranche d'âge au niveau de la wilaya de Ghardaïa

	Effectif	Microscope	ELISA
0-1 mois	42	13	15
2-3 mois	8	0	1

Sur un total de 50 veaux prélevés au niveau de la wilaya de Ghardaïa 13 se révèlent positifs en microscope et 16 en test ELISA soit une augmentation de 6% en diagnostic de la cryptosporidiose chez les deux tranches d'âge.

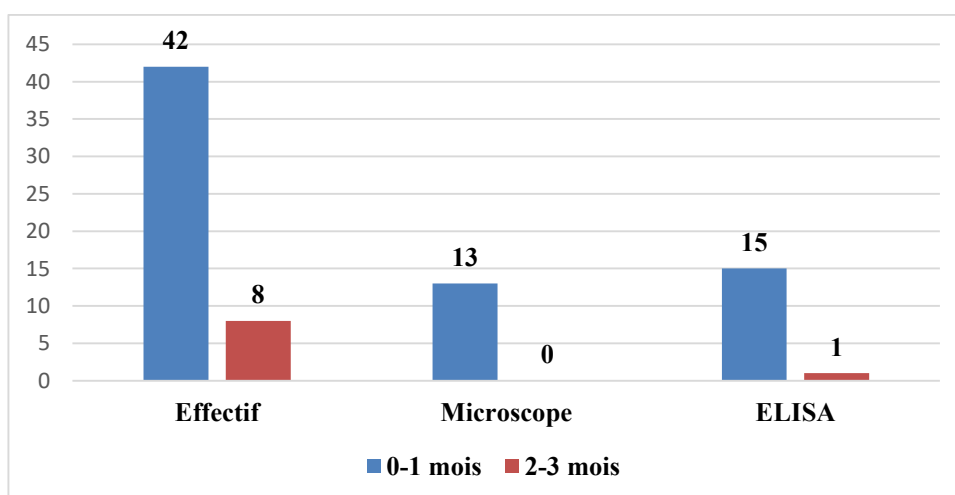


Figure 40 : Le nombre des veaux positifs par rapport à la tranche d'âge au niveau de la wilaya de Ghardaïa.

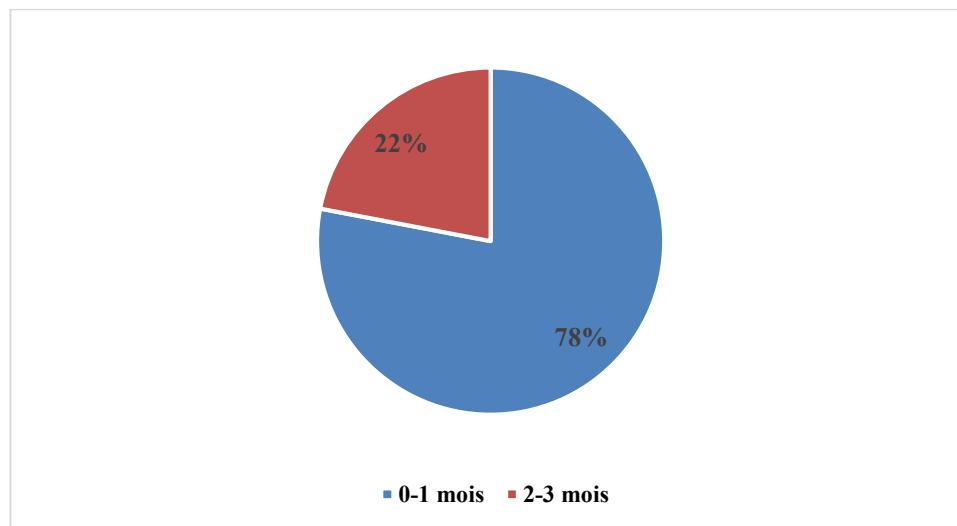
c) Djelfa :

- Les veaux récoltés par tranche d'âge :

Tableau 12 : Répartition des effectifs par tranche d'âge au niveau de la wilaya de Djelfa

	Nombre	Pourcentage
0-1 mois	39	78%
2-3 mois	11	22%

La population de veaux prélevés entre 0-1 mois représente un effectif de 78%, contre 22% de veaux entre 2-3 mois.

**Figure 41** : Les tranches d'âge au niveau de la wilaya de Djelfa

- Les veaux récoltés positifs par rapport à la tranche d'âge :

Tableau 13 : les veaux positifs par rapport à la tranche d'âge au niveau de la wilaya de Djelfa

	Effectif	Microscope	ELISA
0-1	39	2	3
2-3	11	2	2

Sur un total de 50 veaux prélevés au niveau de la wilaya de Djelfa 4 se révèlent positifs en microscope et 5 en test ELISA soit une augmentation de 2% en diagnostic de la cryptosporidiose chez les deux tranches d'âge

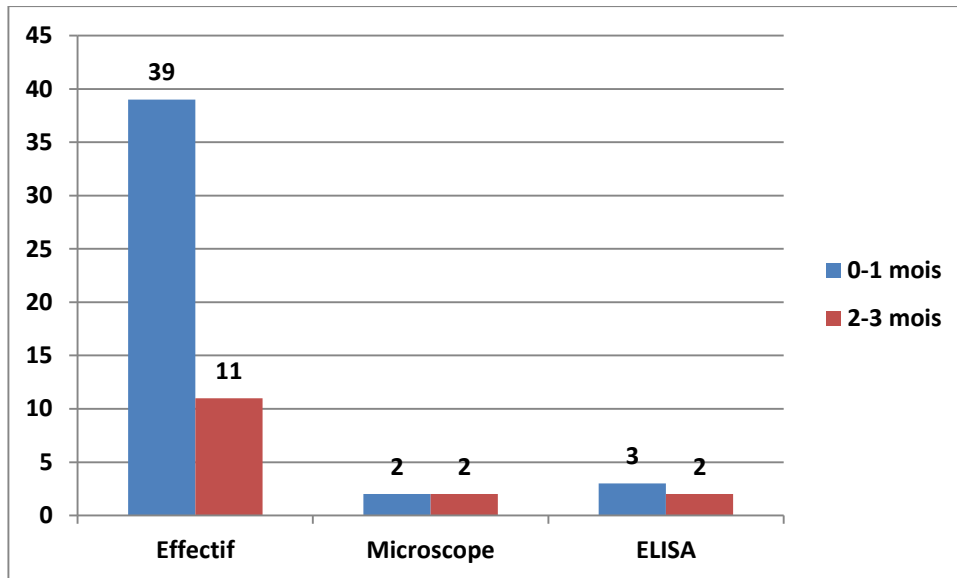


Figure 42 : Le nombre des veaux positifs par rapport à la tranche d’âge au niveau de la wilaya de Djelfa.

d) Laghouat :

- Les veaux récoltés par tranche d’âge :

Tableau 14: Répartition des effectifs par tranche d’âge au niveau de la wilaya de Laghouat

	Nombre	Pourcentage
0-1	26	52%
2-3	24	48%

La population de veaux prélevés entre 0-1 mois représente un effectif de 52%, contre 48% de veaux entre 2-3 mois.

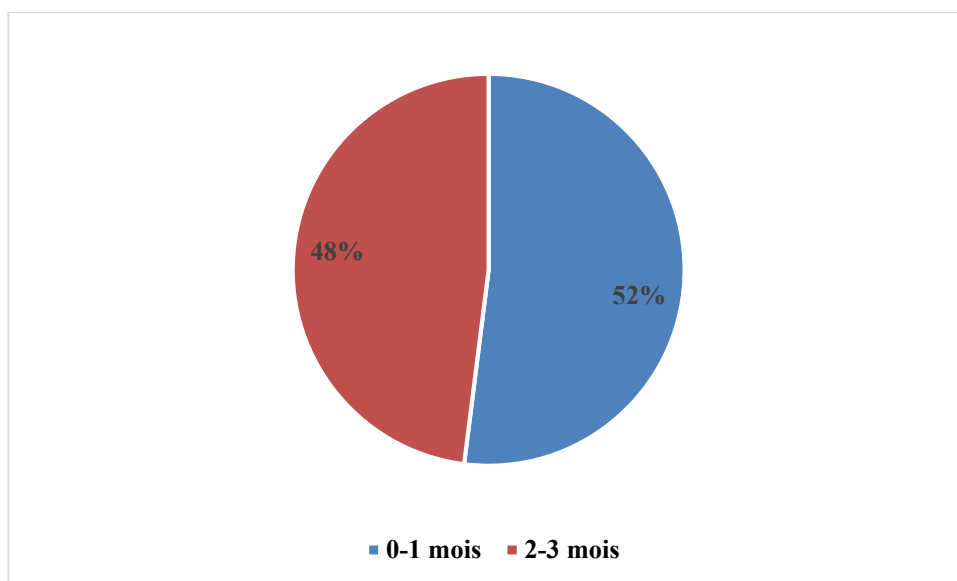


Figure 43 : Répartition des veaux par tranches d’âges au niveau de la wilaya de Laghouat

- Les veaux récoltés positifs par rapport à la tranche d'âge :

Tableau 15 : les veaux positifs par rapport à la tranche d'âge au niveau de la wilaya de Laghouat

	Effectif	Microscope	ELISA
0-1 mois	26	4	4
2-3 mois	24	4	5

Au niveau de la deuxième tranche d'âge, sur 4 veaux récoltés positifs au microscope, 5 sont positif à l'ELISA soit une augmentation de 2%.

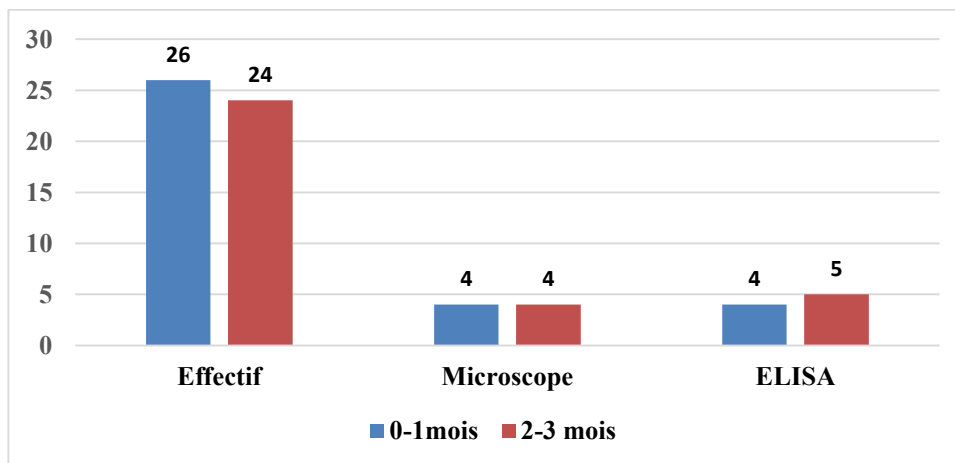


Figure 44 : Les veaux positifs par rapport à la tranche d'âge au niveau de la wilaya de Laghouat.

e) Ouargla :

- Les veaux récoltés par tranche d'âge :

Tableau 16 : la Répartition des veaux par tranches d'âge au niveau de la wilaya de Laghouat

	Nombre	Pourcentage
0-1 mois	40	80%
2-3 mois	10	20%

La population de veaux prélevés entre 0-1 mois représente un effectif de 80%, contre 20 % de veaux entre 2-3 mois.

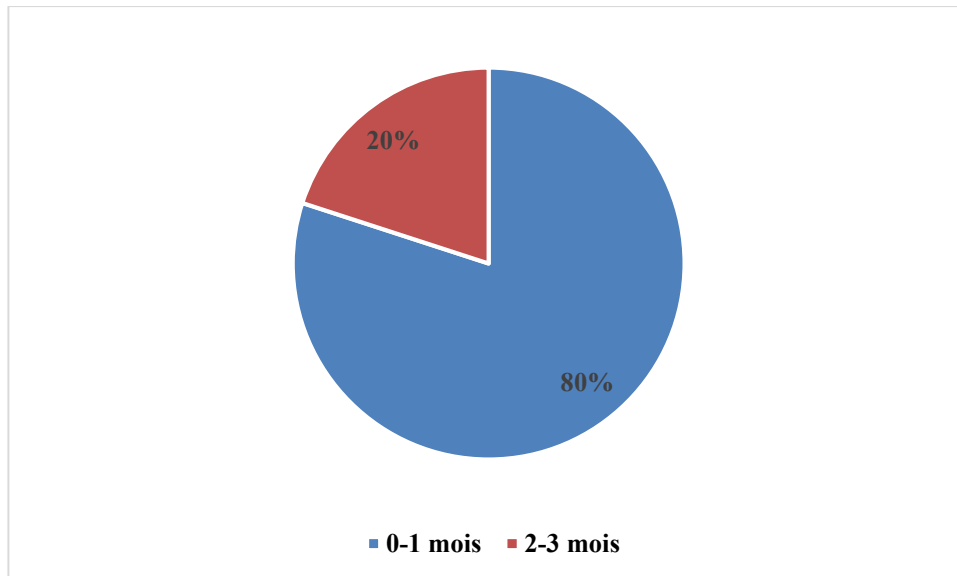


Figure 45 : la Répartition des veaux par tranches d'âge au niveau de la wilaya de Laghouat

- Les veaux récoltés positifs par rapport à la tranche d'âge :

Tableau 17 : Les veaux positifs par rapport à la tranche d'âge au niveau de la wilaya d'Ouargla

	Effectif	Microscope	ELISA
0-1 mois	40	5	8
2-3 mois	10	4	4

Au niveau de la première tranche d'âge, sur 5 veaux récoltés positifs au microscope, 8 sont positif à l'ELISA soit une augmentation de 6%, pour la deuxième tranche d'âge le résultat reste le même.

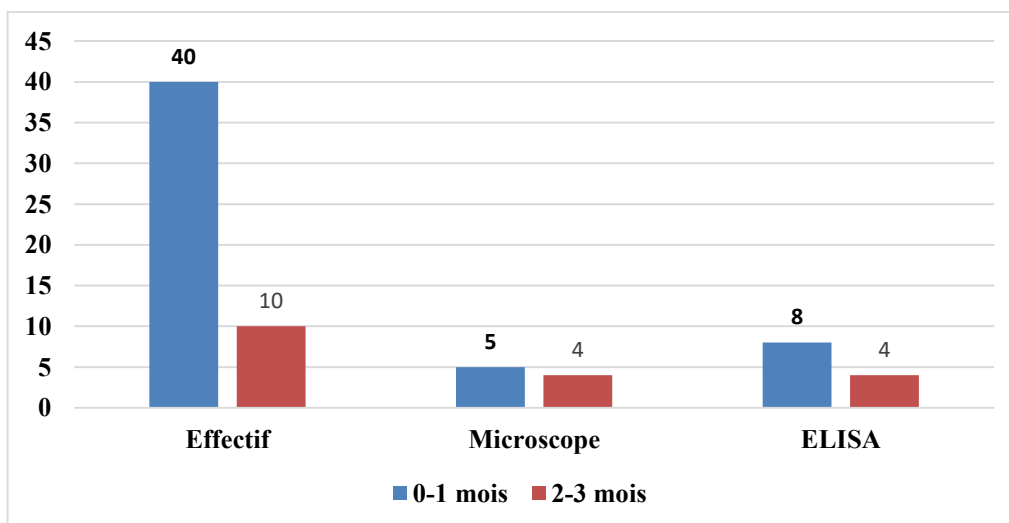


Figure 46: Le nombre de veaux positifs par rapport à la tranche d'âge au niveau de la wilaya d'Ouargla

4- Etude comparatif entre les différentes régions :

1) Le nombre de veaux atteint par wilaya:

Tableau 18 : le taux d'atteinte au *Cryptosporidium sp* tout tests confondus

	Positifs à la crypto	Négatifs à la crypto	Date de prélèvement
El Bayadh	34	16	01-31 janvier
Ghardaïa	15	35	01-28 Février
Djelfa	5	45	01-31 mai
Laghouat	9	41	01-30 Avril
Ouargla	12	38	01-28 Février
Total	75	175	

Dans cette partie nous ne prendrons en compte la prévalence du *Cryptosporidium sp* dans les deux tests confondus. La wilaya d'El Bayadh représente le plus grand taux d'atteinte a la cryptosporidiose avec 34 veaux atteints sur 50, suivi de Ghardaïa et Ouargla 15 et 12 veaux atteints récoltés.

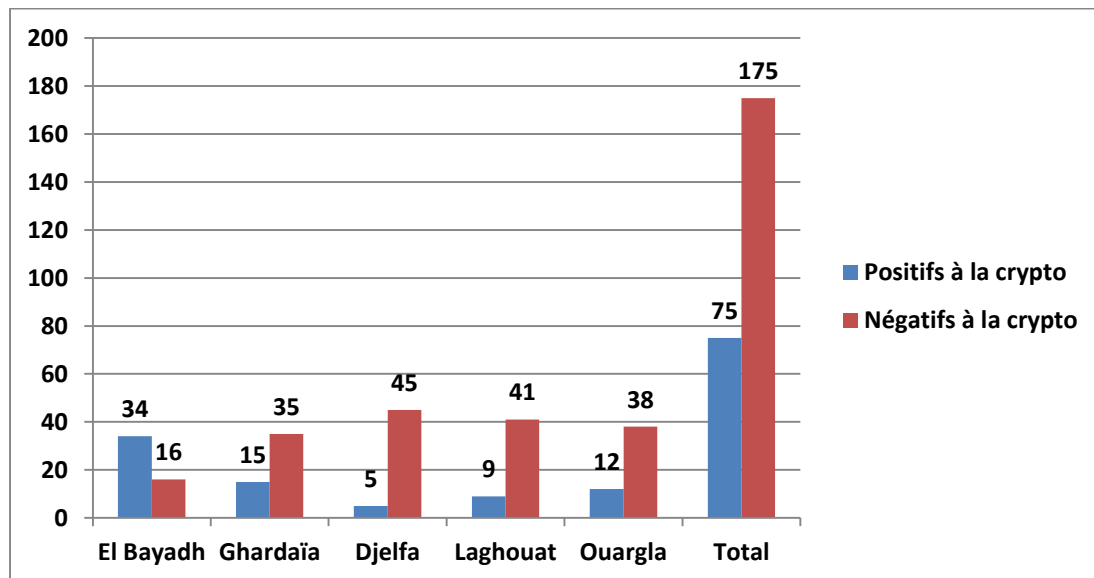


Figure 47 : Le nombre de veaux atteint au *Cryptosporidium sp* tous tests confondus.

2) La prévalence d'atteinte à la cryptosporidiose par wilayas:

Tableau 19 : taux d'atteinte de la cryptosporidiose tout tests confondus :

	Pourcentage de positivité	Date d'échantillonnage
El Bayadh	13.6%	01-31 janvier
Ghardaïa	6%	01-28 Février
Djelfa	2%	01-31 mai
Laghouat	3.6%	01-31 Avril
Ouargla	4.8%	01-28 Février
Total	30%	

Les wilayas d'El Bayadh est atteinte de la cryptosporidiose avec une prévalence de 18.4%, Djelfa arrive en dernier lieu avec 2%.

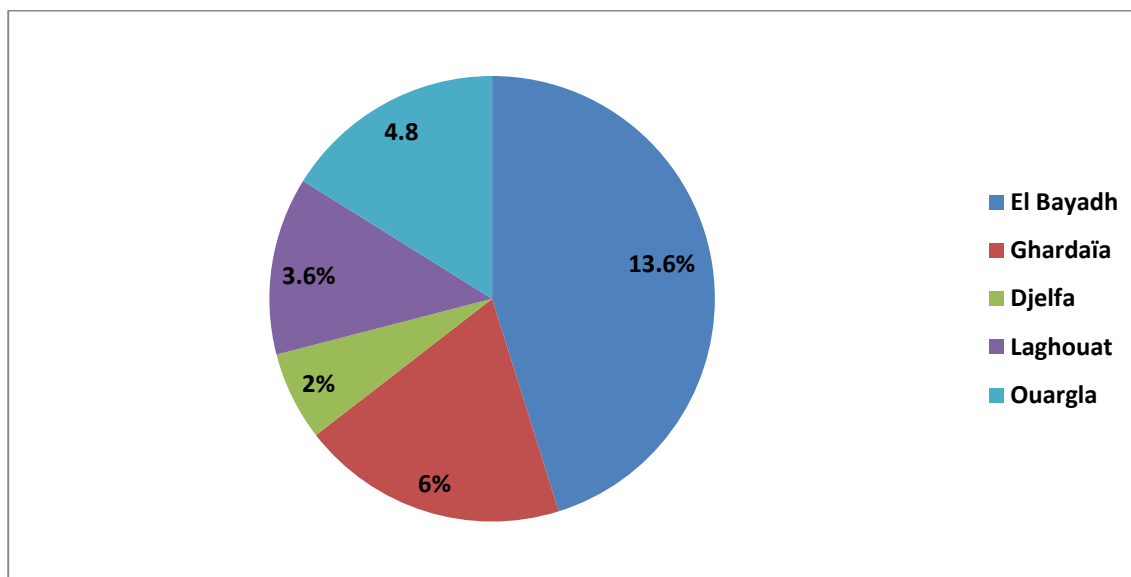


Figure 48 : La prévalence du *Cryptosporidium sp* tous tests confondus.

3) Résultat de la Prévalence totale des deux tests utilisés à travers les 5 Wilays

Tableau 20 : prévalence total des deux tests à travers les 5 wilayas :

	Nombre total de prélèvement	Positif en Microscope	Positif en ELISA	Prévalence Microscope	Prévalence du positif ELISA	Différence en Pourcentage
El Bayadh	50	26	34	52%	68%	16%
Ghardaïa	50	13	16	26%	32%	6%
Djelfa	50	4	5	8%	10%	2%
Laghouat	50	8	9	16%	18%	2%
Ouargla	50	9	12	18%	24%	6%
Total	250	60	76	24%	30.4%	6.4%

Sur un total de prélèvement de 250 veaux récoltés le nombre de prélèvement par Wilaya est le même, il est de 50 veaux non sevrés, la wilaya d'El Bayadh présente la plus grande prévalence.

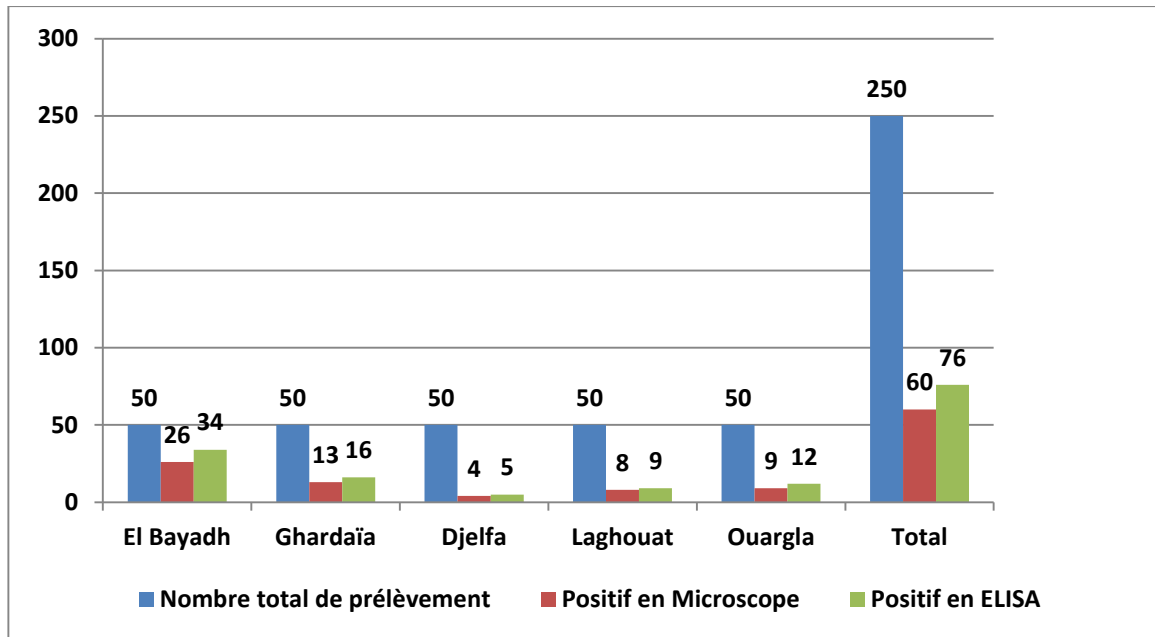


Figure 49 : la Prévalence totale du *Cryptosporidium sp* des deux tests utilisés à travers les cinq Wilayas

Discussion :**1- L'échantillonnage :**

Les études de la prévalence du *Cryptosporidium sp* présentent des échantillons de tailles diverses, ils peuvent être de grande taille comme dans l'étude (Delafosse et al, 2015), ou l'effectif étudié était de 968 veaux non sevrés, ou contrairement de taille plus petite (TOMAZIC et al, 2013) ou l'échantillon était de 250 veaux.

Notre étude porte sur un effectif moyen de 250 veaux non sevrés issus de 25 exploitations repartis sur 5 wilayas, ces exploitations sont à vocation laitière en élevage semi intensif, ce qui peut nous donner un aperçu sur la prévalence du *Cryptosporidium sp* en fonction de l'âge et de la période d'échantillonnage.

Comme pour l'étude de (ICHIKAWA-SEKI et al, 2015), notre étude porte sur un nombre défini d'exploitation au sens du quel un nombre donné de prélèvement est réalisé sur des veaux répondant à un choix et des critères de sélection, pendant une de 5 mois , Au final l'échantillon de cette étude reste peu classique, car la longue période de collecte allant de janvier où les températures variées entre -7°C et 14°C, et le mois de mai dont les températures variées entre 21°C et 29°C, a favorisée une grande diversité dans les résultats.

En période froide les wilayas d'El Bayadh et de Ghardaïa ont enregistré 34 et 15 cas atteint respectivement, au fur et à mesure de l'augmentation des températures nous avons une diminution des cas positifs ; ce qui rend cette étude peu classique aussi c'est le choix des sites de prélèvement, nous avons voulu tester les différentes région El Bayadh qui est une wilaya de transhumance de première intention ce qui expliquera le taux élevé de positivité , Ghardaïa est une wilaya a production laitière et Ouargla a un cheptel Bovins faible ce qui laissé supposer que la maladie serait faible mais au contraire elle arrive en 3ème position, Djelfa présente le plus faible taux qui pourrait s'expliquer par la fermeture des marché bestiaux a cette période de l'année ainsi que l'augmentation de la température.

2- Choix de la méthode :

Les deux méthodes utilisés su cours de cette étude ont d'abord était choisis pour leurs facilités d'utilisation, la disponibilité des tests ainsi que pour leurs rapidité.

Le test de coloration de Ziehl Neelsen, est un test rapide d'utilisation, avec une interprétation simple pour tout manipulateur débutant.

La méthode est peu décrite en littérature scientifique mais elle reste une méthode pratique et simple d'utilisation et a un faible coût financier, cependant des défauts de

sensibilités par absence de coloration de certains oocystes sont possible, comme signalé dans les études de (FAYER et al, 1993).

D'autre part pour le test ELISA les techniques de marquage immunologiques s'appuient sur la recherche d'anticorps monoclonaux conjugués à des marqueurs fluorescents, Les deux techniques comparées par plusieurs auteurs (ROBERT et al, 1990). Selon (Mc CLUSKEY et al, 1995) la technique ELISA permet de détecter plus de fèces positives, pour cet auteur, cette meilleure sensibilité pourrait être en rapport avec l'aptitude de l'ELISA de détecter des fragments d'oocystes, que ne peut pas la technique de coloration.

Nos propres données ont montré d'abord dans un résultat global des 5 wilayas réunies une augmentation de 6.4% dans le diagnostic de la cryptosporidiose en comparaison avec la méthode classique de coloration de Ziehl Neelsen, ensuite dans un résultat individuel en région endémique d'EL Bayadh une augmentation de 16% dans le diagnostic de la maladie, ce test présente l'inconvénient d'être coûteux, pour un kit réalisant 94 échantillons le cout est de 65000 dinars algérien contre 2000 da pour le teste classique.

Il est vrai que le test ELISA est beaucoup plus coûteux mais il permet de tester un nombre élevé d'échantillon en une courte période intéressant pour les effectifs élevés d'élevages diagnostic plus précis surtout en région endémique.

3- Importance de l'âge :

Les plus jeunes veaux de l'étude sont dans une tranche d'âge entre 0 et 1 mois, et représentent le plus haut taux d'infection comparé à la deuxième tranche d'âge qui est de 2- 3 mois.

Des publications rapportent des excréctions du *Cryptosporidium* sp chez des veaux de 4 jours (RIEUX et al, 2013) (SILVERLES et al, 2010), cette excrétion précoces s'explique où bien par une contamination au vêlage (allaitement ou litière), ou bien par une infection naturelle.

En ce qui concerne l'âge des veaux positifs a la cryptosporidiose, on observe distribution des veaux positifs non loin de celle décrite dans la littérature scientifique, le *Cryptosporidium* infecte préférentiellement les veaux nouveaux née jusqu'à un mois d'âge, qui décroît rapidement avec l'âge.

(ROBERTSON et al ,2014) (SANTIN et al, 2008) , dans notre étude le plus jeune veaux atteint est âgé d'une semaine et le plus vieux est âgé de 3 mois.

CONCLUSION

Conclusion

La cryptosporidiose est une protozoose à répartition mondiale, les bovins sont des réservoirs potentiels de cette maladie et peuvent être à l'origine de contaminations humaines. La cryptosporidiose peut être asymptomatique ou à l'origine d'un épisode diarrhéique, cette maladie est considérée comme une des causes majeures de la diarrhée, ayant un impact économique important pour les éleveurs.

Notre étude a été réalisée sur 5 wilayas, sur des élevages semi-intensifs à vocation laitière, la prévalence de la cryptosporidiose est de 24% pour le test microscopique, et de 30.4% pour le test immunologique ELISA, nous avons mis en évidence une augmentation de 6.4% dans la détection de la maladie, encore plus en région endémique où nous sommes arrivés à une augmentation de 16% dans la wilaya d'El Bayadh.

La présence de cryptosporidiose a été mise en évidence aussi chez tous les veaux diarrhéiques de l'étude 4 en l'occurrence.

Notre étude se rapproche des principales publications traitant de la comparaison des méthodes de diagnostics de la cryptosporidiose.

Nous pensons qu'en région endémique l'idéal est d'utiliser le test ELISA dans le diagnostic de la cryptosporidiose, ce test est coûteux mais il permet d'augmenter la détection des cas positifs, mais en région saine l'utilisation de la méthode classique de coloration de Ziehl-Neelsen est préférable pour sa facilité d'accès et son coût bas.

Les deux tests se complètent et sont montrés faciles et rapides d'utilisation, mais en période d'épizootie et en zone endémique, il serait préférable d'avoir recours à une technique moléculaire, plus sensible que les techniques de coloration (Ziehl-Neelsen), permettant ainsi une identification des espèces surtout en cas d'existence de risque de transmission à l'homme.

D'autre part l'étendue de la zone étudiée d'une superficie de 468.397 km² demanderait une plus longue période d'étude pour mieux cerner la prévalence de la cryptosporidiose.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) Pierre-Charles Lefèvre, Jean Blancou, René Chermette, coordonnateurs ; 2003 Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail (Europe et régions chaudes) — Editions TEC et DOC et Editions Médicales internationales, LAVOISIER,— pages : 1559 – 1566
- 2) Karthala, 2006 ; Santé animale – partie 2 : principales maladies ; édition Quae, CTA.
- 3) COPRO-PARASITOLOGIE PRATIQUE, Intérêt et méthodologie, Notions sur les parasites du tube digestif ; Editions ESTEM, 1993.
- 4) Monica Florin-Christensen, Leonhard Schnittger; 2012; E-book : Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets; publié par SLAPETA,
- 5) Manuel terrestre de l'OIE 2008
- 6) Guide d'utilisation du guide Bio-X Diagnostics Lab 2012
- 7) Recueil des méthodes Standardisées en Parasitologie de l'institut National de la Médecine Vétérinaire- Laboratoire Vétérinaire Régional, Laghouat.
- 8) Anaïs Rieux, Poitiers : Université de Poitiers, 2013. « *Cryptosporidiose chez les ruminants domestiques en France : épidémiologie moléculaire et potentiel zoonotique* ». Biotechnologies agroalimentaires, sciences de l'aliment.
- 9) VETAGRO SUP CAMPUS VETERINAIRE DE LYON, Année 2015. « *DETECTION ET CARACTERISATION MOLECULAIRE DE CRYPTOSPORIDIUM LORS DE DIARRHEES CHEZ LE VEAU NON SEVRE DANS UNE CLIENTELE ALLAITANTE* »
- 10) Khelef Djamel, 2007 ; Thèse de doctorat d'état en sciences : « enquêtes épidémiologiques sur les diarrhées néonatales du veau dans certains élevages du centre et de l'est de l'Algérie et essai de prophylaxie »,.
- 11) Thèse : « DIVERSITE GENETIQUE DE L'ESPECE CRYPTOSPORIDIUM PARVUM »,2000.
- 12) Mémoire de magister *sciences de la nature et de la vie Spécialité : écologie et environnement* : « *Etude préliminaire sur le parasitisme gastro-intestinal Chez les bovins dans la région basse Kabylie* », Moussouni Lotfi, 2013-2014.
- 13) MESSAND Elodie, VETAGRO SUP CAMPUS VETERINAIRE DE LYON Année 2018 - Thèse n°091 : « GASTROENTERITE NEONATALE DU VEAU : DETERMINATION DE FACTEURS PRONOSTIQUES A LA SURVIE A 15 JOURS A L'AIDE D'UNE ENQUÊTE AUPRES DE VETERINAIRES PRATICIENS.
- 14) Mourier Vincent, 2007 ; Mémoire de diplôme d'étude spécialisé « apport d'une PCR en temps réel par technique F.R.E.T dans le diagnostic et l'épidémiologie des Cryptosporidiose humaines.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 15) CHANUDET, 2012 ;Mémoire : “Endoparasites of the digestive tracts of sheep of the race Rumbi ...
- 16) TBEUGNET et al, 2004 ; LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DES PARASITOSE DIGESTIVES DES ÉQUIDÉS » - Synthèse bibliographique et conclusions de la réunion d’experts organisée par l’AVEF à Reims le 8 octobre 200 Alfort
- 17) MAKOSCHEY et al., 2012 : Fabreguettes, Tristan ; Thèse : « PRATIQUES SANITAIRES ET USAGES D’ANTIBIOTIQUES AU SEIN DE DIFFERENTES FILIERES BOVINES ALLAITANTES AVEYRONNAISES ». Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2017,56 p.
- 18) Cour parasitologie : POLYCOPIE NATIONAL, Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie ANOFEL, Université Médicale Virtuelle Francophone, 2014.
- 19) Cours : « Cryptosporidiose » - université en ligne : Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie ANOFEL, Université Médicale Virtuelle Francophone, 2016.
- 20) DELAFOSSEA.,CHARTIERC, DUPUYM.C., DUMOULINM., PORSI., PARAUDC (2015). *Cryptosporidium Parvum* infection and associated risk factors in dairyc alves in western France. *Prev Vet Med.*, **118**, 406---412.
- 21) ICHIKAWA---SEKIM,AITAJ, MASATANIT, SUZUKIM, NITTAY, TAMAYOSEG, ISOT, SUGANUMAK, FUJIWARAT, MATSUYAMAK, NIIKURAT, YOKOYAMAN, SUZUKIH, YAMAKAWAK, INOKUMAH, ITAGAKIT, ZAKIMIS, NISHIKAWAY; (2015); Molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* from two different Japanese prefectures,OkinawaAnd Hokkaido.*ParasitolInt.*,**64**(2),161---166.
- 22) ROBERTSON LJ, BJORKMANC, AXENC, FAYERR. Cryptosporidiosis in Farmed Animals. In: CACCIO SM, WIDMERG (2014), *Cryptosporidium : parasite and disease*. Springer.
- 23) SILVERLASC,NASLUNDK,BJORKMANC,MATTSSONJG(2010b).Molecularcharacteri sation of *Cryptosporidium* isolates from Swedish dairy cattle in relationtoage, diarrhea and region. *Vet Parasitol.*, **169**,289–295.
- 24) TOMAZICML, MAIDANAJ, DOMINGUEZM, URIARTEL, GALARZAR, GARROC, FLORIN-CHRISTENSENM, SCHITTGERL (2013). Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from Calves in Argentina. *Vet Parasitol.*, 198 (3---4),382---386.
- 25) SOPHIE ROYER., (2015). Détection et caractérisation moléculaire de *Cryptosporidium* lors de diarrhées chez le veau non sèvre dans une clientèle allaitante ;, 159

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 26) RIEUXA, PARAUD, PORSI, CHARTIER (2013). Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pre-weaned calves in western France in relation to age. *Vet Parasitol.*, **197**(1-2), 7-12.
- 27) BLANCHARD PC (2012). Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, (28), 443-464.
- 28) SANTIN M, TROUT JM, FAYERR (2008). A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Vet Parasitol.*, **155**, 15-23.
- 29) AMELLAL R. La filière lait en Algérie : entre l'objectif de la sécurité alimentaire et la réalité de la dépendance. In : Allaya M. (ed.). Les agricultures maghrébines à l'aube de l'an 2000. Montpellier : CIHEAM, 1995. p. 229-238 (Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches; n. 14)
- 30) Dre Louise Houle, 28 novembre 2013; Présentation power point : « Néonatalogie bovine ou comment s'arranger pour que le veau soit le plus en santé possible », , Journée sur la Santé Animale.
- 31) Karine Thivierge, 2014 ; cahier de stage : « Méthodes de laboratoire en parasitologie intestinale ».
- 32) Ghenim H. ; 17 Déc. 2002 ; Rapport de l'atelier Cryptosporidiose, Laboratoire Centrale Vétérinaire,
- 33) Rapport AFSSA « *Appui scientifique et technique* de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif aux risques sanitaires liés à l'utilisation d'adoucisseurs et de préparateurs collectifs et individuels d'eau chaude lors d'une contamination du réseau par *Cryptosporidium* », Maisons-Alfort, le 19 août 2009
- 34) ELWIN et al., 2012 ; UNA RYAN1, RONALD FAYER and LIHUA XIAO; 2014.
Article de revue : « *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs »;
- 35) PARAUD et CHARTIER, 2012 ; Article: « Cryptosporidiosis in small ruminants » Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'environnement et du travail - École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'alimentation Nantes – Atlantique ;
- 36) D. KHELEFI, M. Z. SAÏBI, A. AKAM2, 3, R. KAIDI2, V. CHIRILA4, V. COZMA5 et K. T. ADJOU ; 2007 ; Revue : Épidémiologie de la cryptosporidiose chez les bovins en Algérie - *Revue Méd. Vét.*, 260-264.
- 37) Muriel NACIRI ; 1992 ; Article : « La Cryptosporidiose. Importance de la contamination de l'eau » ; INRA Station de Pathologie Aviaire et de Parasitologie 37380 Nouzilly,

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 38) A. Vallet Article ; 1994: Les risques de transmission de maladies infectieuses ou parasitaires par les effluents d'élevage de ruminants; Docteur-Vétérinaire, Institut de l'Elevage, 149, rue de Bercy, F-75595 Paris cedex 12. *Fourrages* 140, 431-442 Travail présenté aux Journées d'information de l'A.F.P.F., «Valorisation des engrais de ferme par les prairies», les 29 et 30 mars 1994.
- 39) Karine Sonzogni-Desautels, 2009 ; Revue : « L'importance de la Cryptosporidiose chez le veau », DMV, Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire Saint Hyacinthe – CRAAQ, Congrès du bœuf .
- 40) Article : « Protozoaires entériques dans l'eau potable : Giardia et Cryptosporidium », Document de consultation publique Préparé par le Comité fédéral-provincial-territorial sur l'eau potable La période de consultation se termine le 9 janvier 2017 ; santé Canada
- 41) DUMOULIN A.****, GUYOT K.*, LELIÈVRE E.*, DEI-CASE.*** & CAILLIEZ J.C.* 2000 ; Article : « CRYPTOSPORIDIUM ET FAUNE SAUVAGE : UN RISQUE POUR L'HOMME » ; Article available at <http://www.parasite-journal.org> or <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2000073167> - Parasite, , 167-172
- 42) FAYER, 2004 ; Article de revue: «Cryptosporidium: a water-borne zoonotic parasite», Vet Parasitol.
- 43) TZIPORI et WIDMER ; 2008 ; Article de revue: «A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis», - École de médecine vétérinaire Tufts Cummings, Division des maladies infectieuses, North Grafton, MA 01536, États-Unis. saul.tzipori@tufts.edu , saul.tzipori@tufts.edu , .
- 44) O'DONOGHUE ; 1995 ; Article de revue et aide à la recherche, autres que les États-Unis : « Cryptosporidium and cryptosporidiosis in man and animals », , Section de parasitologie, VETLAB, Département des industries primaires, Adélaïde, Australie, .
- 45) XIAO ; 2010 ; Article de revue : « Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update». Exp. Parasitol. 124, 80-89 -, publication médicale: Centers for Disease Control and Prevention, .
- 46) O'Donoghue, P.J. (1995); Article et support de recherche: "Prevalence of Cryptosporidial Oocysts in Soil of Recreational Parks in Abuja, Nigeria » Cryptosporidium and Cryptosporidiosis in Man and Animals. International Journal of Parasitology, 25, 139-195. [http://dx.doi.org/10.1016/0020-7519\(94\)E0059-V](http://dx.doi.org/10.1016/0020-7519(94)E0059-V) - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- 47) WYATT et al, 2010 ; Article: "Cryptosporidiosis in Neonatal Calves"; *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice* 26(1):89-103, table of contents · March 2010;

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 48) LECONTE, 2013 ; Site internet : « Bilan des autopsies et causes de mortalité des ovins dans la ferme » ; <https://bu.umc.edu.dz/theses/veterinaire/SID6505.pdf>
- 49) SMITH, 2008 ; Site internet : Publication universitaire : « Etude préliminaire sur la mortalité de veaux âgés de 0 à 90 jours en région de Tiaret Algérie Ouest » ; *Laboratoire de Reproduction des animaux de la ferme, Institut des Sciences Vétérinaires, Université Ibn Khaldoun, Tiaret-14000-Algérie Si_ameur@yahoo.fr* - : <http://www.lrrd.org>
- 50) WYATT et al,2010; Site internet science direct : “Species of *Cryptosporidium* detected in weaned cattle on cow–calf operations in the United States” ; <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.040>
- 51) Site internet: “CDC:Centers for Disease Control and Prevention”; <http://www.cdc.gov>

ملخص

الكريبتوسبورديوسيس هو مرض حيواني المنشأ له تأثير على الصحة العامة والحيوانية بسبب مشاركته في تلوث المياه وحيوانات المزرعة؛ قادنا ذلك إلى مقارنة طريقتين تحليليتين على البراز من 250 عجلاً من 5 ولايات: البيض، الأغواط، ورقلة، غرداية، وجلفة. حصلنا على معدل إيجابي عام قدره 27.2% مع تقنية تلوين زيل نيلسن الكلاسيكية مقارنة مع التقنية المناعية إليزا 36.8%، بزيادة قدرها 7.6% في تشخيص داء الكريبتوسبورديوسيس؛ وجدنا أيضاً أن الزيادة ملحوظة في المناطق الموبوءة ويصبح الفرق بين الطريقتين أكثر أهمية.

الكلمات المفتاحية: الكريبتوسبورديوسيس، العجول، تلوين زيل نيلسن، إليزا،

Résumé

La cryptosporidiose est une zoonose ayant un impacte de santé publique et économique de part son implication dans la contamination des eaux et des animaux d'élevages. Ceci nous a conduit à comparer deux techniques d'analyses sur des selles de 250 veaux issus de 5 wilayas : El Bayadh, Laghouat, Ouargla, Ghardaïa, et Djelfa.

Nous avons obtenu un taux de positivité générale de 27.2% avec la technique classique de coloration de ziehl Neelsen contre un taux de 36.8% en technique ELISA, soit une augmentation de 7.6% dans le diagnostic de la cryptosporidiose. Nous avons constaté par ailleurs qu'en zone endémique l'augmentation est plus marquée et la différence entre les deux méthodes devient plus importante.

Les mots clés: Cryptosporidiose, Veaux, Coloration Ziehl Neelsen, ELISA,

Abstract

Cryptosporidiosis is a zoonosis with a public health and economic impact due to its involvement in the contamination of water and farm animals. This led us to compare two analysis techniques on stool of 250 calves from 5 wilayas : El Bayadh, Laghouat, Ouargla, Ghardaia, and Djelfa.

We obtained a general positivity rate of 27.2% with the classic ziehl Neelsen staining technique compared to a 36.8% ELISA technique, an increase of 7.6% in the diagnosis of cryptosporidiosis. We also found that in endemic areas the increase is more marked and the difference between the two methods becomes more important;

Key words: Cryptosporidiosis, Calves, Ziehl Neelsen staining, ELISA.