

2.4. Pathogénie des cryptosporidioses intestinales

En ce qui concerne l'infection à *C. parvum*, celle-ci intéresse essentiellement le jéjunum et l'iléon. Le parasite s'installe au niveau des cellules de la bordure en brosse des entérocytes où il met en place des vacuoles parasitophores formées avec la membrane plasmique des cellules des microvillosités de l'iléon. La multiplication des cryptosporidies est responsable de la destruction des cellules absorbantes des villosités intestinales. On a donc une atrophie des villosités et une réduction de la surface totale de la muqueuse intestinale (WYATT *et al.*, 2010).

Trois mécanismes principaux vont alors être responsables de l'apparition de la diarrhée :

- **L'augmentation de la perméabilité intestinale** en relation avec l'élévation du niveau d'interféron gamma d'où des **fuites d'eau** ;
- **La perturbation du transport des nutriments responsable d'une maldigestion/malabsorption** due à l'abrasion et à la fusion des villosités.
- Baisse d'activité enzymatique avec une inhibition de l'absorption du sodium, une sécrétion de Cl^- et de HCO_3^- due à une forte production de prostaglandines locales qui entraînent donc une **diarrhée par hypersécrétion et des pertes hydriques** (CHARTIER et PARAUD, 2010 ; WYATT *et al.*, 2010).

En outre, un déficit de l'activité lactasique du tube digestif a été démontré chez l'animal parasité et la digestion des matières grasses serait également diminuée en présence de Cryptosporidies expliquant la stéatorrhée parfois signalée chez les animaux malades (ROCQUES, 2006 ; SMITH, 2008 ; CHARTIER et PARAUD, 2010).

Contrairement à de nombreux entéropathogènes, la cytotoxicité directe intervient peu dans le pouvoir pathogène de *C. parvum*. Ainsi, il a même été montré que *C. parvum* rend les cellules-hôtes réfractaires à l'apoptose durant la première phase de l'infection, à savoir pendant le développement des trophozoïtes et des mérontes. Ceci permet au parasite de réaliser son cycle et de se propager (WYATT *et al.*, 2010).

Le fait de continuer à nourrir l'animal fait qu'il y a plus de nutriments présents dans l'intestin que ce que les villosités abimées peuvent absorber. Les nutriments excédentaires non digérés sont fermentés dans le gros intestin, permettant un surdéveloppement des bactéries et la formation d'acides organiques et d'autres composés délétères. Ceci crée un effet osmotique qui attire l'eau dans l'intestin et contribue à la diarrhée. Lors d'atteintes mixtes par *C. parvum* et par un Rotavirus ou un Coronavirus, ce phénomène est accentué par le fait qu'il s'opère une hyperplasie compensatrice des cellules des cryptes ; ces cellules ont des fonctions sécrétoires et leur multiplication mène donc à une augmentation des sécrétions (SMITH, 2008).

Les co-infections comme celle à Rotavirus-*C. parvum* peuvent être particulièrement débilitantes car agissant de façon synergique : le Rotavirus altère les capacités digestives et

absorbantes du jéjunum. Une compensation iléale peut atténuer les signes cliniques, à moins que l'iléon ne soit lui même endommagé par une infection à *C. parvum* (ROCQUES, 2006).

Au niveau de la santé de l'animal, la diarrhée est débilitante à cause des pertes de fluides et d'électrolytes. Tant que le nouveau-né peut compenser ces pertes, il va rester intègre et sera capable de s'alimenter. Mais si les pertes sont supérieures aux entrées, les effets systémiques de la déshydratation (pertes d'eau et de sodium) et de l'acidose vont se faire sentir. Les fluides vont être retirés préférentiellement du compartiment vasculaire d'où un effondrement possible de la fonction cardio-vasculaire. L'acidose a plusieurs causes, incluant les pertes fécales de bicarbonates, la synthèse endogène de L-acide lactique en réponse à la déshydratation et à la mauvaise perfusion des tissus, et la production de D-acide lactique par les fermentations bactériennes de lait non ou mal digéré. Elle contribue au mauvais état du veau (ou de l'agneau ou chevreau) en augmentant la résistance vasculaire et en altérant la fonction cardiaque par des effets directs et en inhibant l'action des catécholamines. Les fonctions œsophagiennes peuvent aussi être altérées à cause de l'acidose, promouvant le phénomène « ruminal drinker » ce qui entraîne à plus forte raison la production de D-acide lactique et une acidose ruminale.

Le nouveau-né devient alors très abattu, perd le réflexe de succion et s'affaiblit. Si la maladie progresse, un décubitus prolongé puis un coma peuvent survenir. On pense qu'une cause possible de mort est un arrêt cardiaque suite à un déséquilibre du potassium dans le myocarde par les effets combinés des pertes potassiques dans le tractus gastro-intestinal et la redistribution du potassium à partir des cellules vers les fluides extra-cellulaires à cause de l'acidose. L'hyperthermie elle aussi affecte la fonction cardiaque (SMITH, 2008).

La pathogénie de la cryptosporidiose est donc basée sur l'apparition d'une diarrhée mixte due notamment à la destruction de la structure de la muqueuse intestinale. Les conséquences de cette diarrhée peuvent ensuite expliquer les répercussions sur l'état général du malade.

2.5. Réponse immunitaire à l'infection à *Cryptosporidium*

L'immunité innée fait appel à l'action de cellules résidentes qui sécrètent des substances inhibant l'activité des parasites, par exemple des prostaglandines. La flore intestinale déjà présente dans les intestins des veaux après la naissance entre en compétition avec les sporozoïtes dans l'attachement aux cellules épithéliales intestinales. Les défensines, des substances anti-microbiennes ont été retrouvées en quantité importante chez des veaux infectés par *C. parvum*. Cependant, l'immunité innée à elle seule ne permet pas d'enrayer l'infection à *C. parvum*.

L'immunité acquise, spécifique au pathogène, à l'origine d'une mémoire immunitaire, et d'une durée plus importante, se développe ensuite rapidement. Elle comprend une réponse humorale et une réponse cellulaire.

Immunité humorale :

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

Le rôle de ces différents anticorps dans la résolution de l'infection n'est pas clairement établi mais on a remarqué que l'augmentation des taux d'anticorps dans les selles va de paire avec la diminution d'excrétion d'oocystes par les veaux et les agneaux (O'DONOGHUE, 1995).

Chez les jeunes animaux, la prise de colostrum intervient en diminuant la fréquence d'infection et la sévérité de l'infection. Par exemple, l'administration à des veaux de colostrum contenant des anticorps neutralisant l'antigène p23 de *C. parvum* a montré une protection contre les signes cliniques et une diminution de l'excrétion d'oocystes (WYATT *et al.*, 2010).

Cependant, les anticorps, qu'ils soient d'origine endogène ou exogène, s'ils peuvent agir sur les formes libres du parasite (sporozoïtes et mérozoïtes) en réduisant leur pouvoir infectieux, ne peuvent pas agir sur les stades intracellulaires. En outre, leur temps de survie court ne leur permet pas d'avoir un temps d'action optimal (O'DONOGHUE, 1995).

Immunité cellulaire :

Lors d'inoculations expérimentales, les veaux présentent une réponse à base de lymphocytes T CD4+ et CD8+ avec une production de cytokines de type interleukine-12 et interféron gamma (FAYER *et al.*, 1998).

Il a été montré que l'immunité acquise se met en place dans les intestins avant même l'apparition de la diarrhée. En effet, des lymphocytes T CD4+ et CD8+ et des cytokines (IL10) ont été mis en évidence à de nombreuses localisations avant la survenue des signes cliniques : au niveau des villosités, de la lamina propia, des plaques de Peyer dans l'iléon (WYATT *et al.*, 2010).

On note également une augmentation importante des taux de LT CD4+ et LT CD8+ dans la lamina propia et l'épithélium iléal pendant toute la durée des signes cliniques. Cette augmentation est accompagnée par une augmentation locale de la production d'interleukine 12 et d'interféron- γ (FAYER *et al.*, 1998).

Une fois la diarrhée finie, le nombre de LT CD4+ et CD8+ présents dans la lamina propia et dans l'épithélium de l'iléon reste élevé par rapport à des veaux n'ayant pas été infectés (WYATT *et al.*, 2010).

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

La réponse immunitaire dans le modèle murin :

La réponse immunitaire de l'hôte à l'infection à *C. parvum* dans le modèle murin est mieux connue car elle a été plus amplement étudiée. On peut supposer qu'elle possède de nombreuses similarités avec celle de ruminants, ainsi nous allons l'exposer ci-dessous pour comparaison:

Immunité innée : elle est conférée par les cellules intestinales épithéliales qui ont un rôle de barrière grâce à des facteurs physiques et biochimiques, par l'interféron gamma et les cellules *Natural Killer*, par les phagocytes et le monoxyde d'azote produit par les macrophages et les granulocytes neutrophiles, par les cellules dendritiques, par le complément.

Immunité acquise : elle est conférée par les lymphocytes T et plus particulièrement les LT helper qui sécrètent de nombreuses interleukines (IFN gamma, TNF-alpha, IL4, IL5, IL10, IL13 principalement), et dans une moindre mesure les LT CD8. Les cytokines, IFN- γ , TNF- α , IL12, IL18, IL4, IL5 jouent un rôle important en venant renforcer la réponse des lymphocytes ; elles permettent notamment de limiter l'extension de l'infection. Le rôle des immunoglobulines et des lymphocytes B reste à déterminer, car s'ils sont présents lors de l'infection, on sait qu'ils ne sont pas capables à eux seuls de l'éradiquer chez des personnes atteintes de façon chronique (PETRY *et al.*, 2010).

Des expériences menées sur des souris montrent l'importance de ces différents acteurs de la réponse immunitaire : des individus sans LT CD4+ (souris SCID) ayant développé une cryptosporidiose chronique guérissent si leur taux de LT CD4+ revient à la normale par exemple par le biais d'injection de LT CD4+ provenant d'individus immunocompétents. En plus, l'infection est plus sévère si les souris sont privées d'interféron gamma. En revanche, en ce qui concerne le LTCD8+, les mastocytes, les cellules *Natural Killer* et les IL-2, aucune différence notable sur la fréquence et la sévérité de l'infection n'a été mise en évidence chez des souris privées ou non de ces acteurs de l'immunité (O'DONOGHUE, 1995 ; MACDONALD, 2008).

La réponse immunitaire chez les ruminants infectés fait donc appel à la fois à l'immunité humorale, qui peut agir sur les formes libres du parasite, et sur l'immunité cellulaire par le biais des lymphocytes CD4+ et CD8+ et des cytokines qui eux agissent aussi sur les formes intracellulaires du parasite.

2.6. Symptômes

2.6.1. Chez le veau

Les premiers symptômes sont une phase de dépression et d'anorexie, suivie d'une phase de diarrhée aqueuse puis mucoïde jaunâtre intermittente, à l'odeur putride caractéristique, pouvant durer de 2 à 14 jours, associée à une atteinte de l'état général, à une faiblesse et à une perte de poids (figure 22). Des signes de colique peuvent également se manifester.

Figure 22: Veau à diarrhée aqueuse jaunâtre due à une infection à *C. parvum* (Source : Site internet de la COLORADO STATE UNIVERSITY).



L'infection peut-être détectée dès 5 jours avec une proportion et une intensité d'excrétion maximum entre 9 et 14 jours. Les valeurs coproscopiques sont très élevées entre la deuxième et la troisième semaine, avec des moyennes variant entre 1,6 et 7 millions d'oocystes/g et des valeurs individuelles pouvant atteindre 26 millions. Les comptages élevés d'oocystes sont concomitants avec la diarrhée.

L'évolution se fait vers la guérison ou vers la mort, sans passage à la chronicité. Après l'infection, les veaux sont résistants à une réinfection.

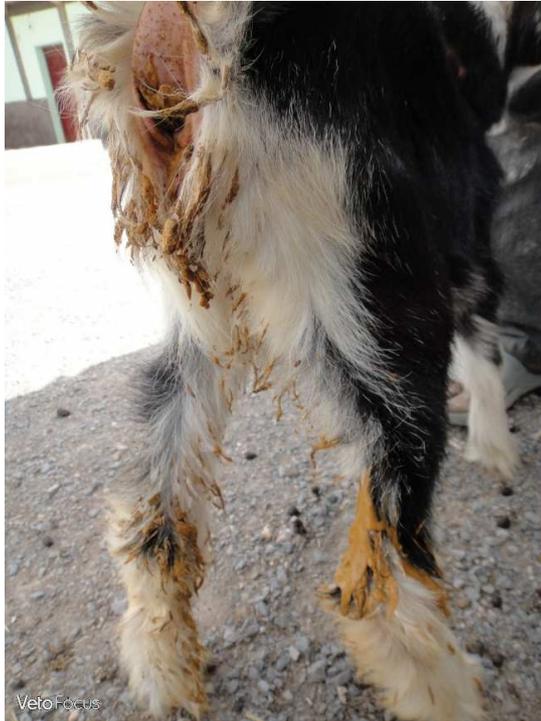
L'excrétion d'oocystes est moins commune et intermittente chez les bovins adultes, qui n'expriment aucun signe clinique (SMITH, 2008 ; CHARTIER et PARAUD, 2010).

2.6.2. Chez le chevreau

L'affection, lorsqu'elle est symptomatique, se traduit par un abattement, une anorexie, et une diarrhée aiguë aqueuse, blanche à jaunâtre et commençant à l'âge de 5-12 jours et durant 7 à 16 jours (figure 23). Cette diarrhée peut être intermittente ou continue, et

d'intensité et de durée très variable. Les symptômes qui en découlent, déshydratation et déséquilibres acido-basiques, sont donc dépendant de la diarrhée. Il y a aussi une perte de poids associée.

Figure 23: Arrière-train souillé d'un chevreau atteint de cryptosporidiose (Source : GHECHAM sur le site internet VETOFOCUS)



Le pic d'excrétion d'oocyste se situe à 7-15 jours et devient indétectable 20 à 25 jours plus tard. Les valeurs coproscopiques sont très élevées entre la deuxième et la troisième semaine, avec des moyennes de 15 millions d'oocystes/g et des valeurs individuelles pouvant atteindre 200 millions.

Chez les chevreaux les taux de morbidité moyens sont de 50-70% et peuvent atteindre 100% en cas de regroupement extrême des chevrotages par exemple ; les taux de mortalité sont de 30-50%.

Les animaux vont ensuite guérir ou mourir en fonction de l'atteinte. Il n'y a pas de passage à la chronicité.

Certaines formes cliniques ont été signalées chez des chèvres adultes de manière tout à fait exceptionnelle (ROCQUES, 2006 ; CHARTIER et PARAUD, 2010).

2.6.3. Chez l'agneau

Les animaux malades sont âgés de 4 à 20 jours ; ils présentent une diarrhée de la consistance et de la couleur d'une mayonnaise ; la maladie paraît contagieuse avec souvent plus de 30% de l'effectif touché. La diarrhée est souvent associée à un abattement, une

déshydratation et une douleur abdominale. L'infection peut cependant demeurer asymptomatique chez les agneaux (CHARTIER et PARAUD, 2010).

L'évolution se fait sur une dizaine de jours avec amaigrissement et relativement peu de mortalité s'il n'y a pas de complication infectieuse. Mais les complications sont relativement fréquentes et souvent accompagnées de mortalité (PONCELET, 2002).

CHARTIER et PARAUD (2010) rapportent que les descriptions de la maladie chez l'agneau sont rares et peu convergentes, allant de taux de mortalités élevés et comparables à ceux des chevreaux, à des diarrhées transitoires avec résolution et rétablissement des animaux en une dizaine de jours.

Ainsi, la maladie prend la forme d'une gastro-entérite néonatale chez les jeunes ruminants, avec une diarrhée assez peu caractéristique souvent corrélée à une forte excrétion ookystale. Les animaux peuvent être abattus, et présenter un amaigrissement rapide.

2.7. Lésions

Il est important de noter qu'il n'y a aucune lésion pathognomonique de cette infection sur le plan macroscopique.

La cryptosporidiose est une entérite sans lésion pariétale, souvent associée à des signes de déshydratation (énophtalmie, congestion médullaire rénale). On retrouve à l'autopsie un contenu intestinal anormalement liquide, jaunâtre, avec parfois une composante mucoïde. Les lésions que l'on pourra retrouver dues à *C. parvum* se trouvent dans l'intestin grêle et le gros intestin, mais plus particulièrement dans la partie terminale de l'iléon, ce qui correspond bien au fait que l'iléon est le lieu d'implantation majoritaire du parasite. On aura donc parfois des congestions et des inflammations hémorragiques dans le derniers tiers de l'iléon, associées à une hypertrophie des ganglions mésentériques. D'autre part, le côlon et le cæcum sont souvent distendus (CHARTIER, 2002).

A l'examen histologique, les lésions les plus sévères sont visibles dans le jéjunum postérieur et l'iléon, entre 3 et 7 jours après l'infection. On peut ainsi voir une atrophie, une fusion et une abrasion des villosités, une hyperplasie des cryptes. On peut observer des infiltrations de l'épithélium des villosités et de la lamina propia par des mononucléaires et des granulocytes neutrophiles. Les cryptosporidies sont visibles sur la bordure en brosse des entérocytes, notamment sur les villosités (KOUDELA et JIRI, 1997).

2.8. Diagnostic

2.8.1. Diagnostic clinique et épidémiologique

Il n'existe que des critères de suspicion pouvant amener à penser que l'on a à faire à une cryptosporidiose. Ces critères sont l'apparition d'une diarrhée survenant entre 5 et 15 jours d'âge, avec une prévalence plus importante au fur et à mesure que la saison des mises bas avance, une inefficacité des thérapeutiques habituelles et enfin, dans les exploitations mixtes, la constatation que les agneaux sont plus touchés que les veaux, eux-mêmes plus atteints que les agneaux (CHARTIER et PARAUD, 2010).

2.8.2. Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel comprend l'ensemble des causes présentes dans le complexe des gastro-entérites néonatales des agneaux, des chevreaux et des veaux :

- des viroses: coronavirose, rotavirose, virus BVD/MM, torovirus, parvovirus... ;
- des atteintes bactériennes : colibacilloses, salmonelloses, toxi-infections à *Clostridium perfringens B*, campylobactériose ;
- des parasitoses: giardiose, coccidiose, toxocarose, strongyloïdose ;
- des causes non infectieuses, à savoir alimentaires ou dues au stress.

Voici les caractéristiques des principales maladies entrant dans le diagnostic différentiel des diarrhées néonatales chez les jeunes ruminants domestiques:

- Coronavirose : Elles apparaissent entre 3 jours et 3 mois d'âge, et sont à l'origine d'une diarrhée pâteuse à liquide et fétide, d'un abattement important et d'une hyperthermie. Une atteinte respiratoire est possible chez les jeunes, et une atteinte digestive chez les adultes également (dysenterie hivernale).
- Rotavirose : La morbidité est élevée, la mortalité faible. La diarrhée est pâteuse à liquide, fétide ; les animaux sont abattus, l'hyperthermie est modérée. Les animaux sont principalement atteints entre 6 et 10 jours de vie. La guérison est spontanée sauf en cas d'association avec d'autres pathogènes ce qui est fréquent.
- Colibacillose : Elle peut toucher des animaux très jeunes selon la souche bactérienne. L'animal est apathique, très déshydraté, hypotherme ; il présente une diarrhée aqueuse jaune paille parfois mucoïde avec du sang non digéré.
- Salmonellose : Elle est d'aspect enzootique. Chez les veaux, elle peut prendre plusieurs formes, notamment septicémique avec des morts subites, entéritique avec une anorexie marquée, une diarrhée nécrotique parfois hémorragique et une hyperthermie importante, et respiratoire. Des animaux de tous âges peuvent être

atteints, avec notamment des avortements chez les adultes. Les lésions sont des lésions d'entérite nécrosante.

- Entérotoxémie = toxi-infection à *Clostridium perfringens* type B ou C: cette affection est rencontrée dans un contexte d'alimentation intensive, particulièrement chez les ovins. Les ovins et les caprins sont plus sensibles que les bovins. L'apparition de l'affection est brutale et d'aspect enzootique. Souvent, ce sont les animaux les plus beaux qui sont touchés. La létalité est quasiment de 100%. On observe chez les animaux de moins de 3 semaines soit un abattement, un refus de téter, une hyperthermie prononcée, une diarrhée jaunâtre puis brunâtre et une mort en 2-3 jours après une phase de coma ou de convulsion. Chez les animaux de 3 semaines à 3 mois, on peut observer une mort subite ou une phase d'anorexie, des symptômes nerveux, une diarrhée verdâtre, un jetage mousseux puis la mort. Les lésions, notamment rénales, sont assez caractéristiques.
- Giardiose : Se déclare chez des animaux de plus de une semaine, et provoque une diarrhée avec amaigrissement et passage à la chronicité.
- Coccidiose : Apparaît en général après 3 semaines d'âge et entraîne une diarrhée noirâtre sanguinolente.
- BVD/MM : Les diarrhées néonatales dues au virus BVD/MM sont rares. Souvent, il y a une atteinte mixte avec une atteinte digestive (diarrhée profuse), une forte hyperthermie, un ptyalisme, des ulcères et des signes oculaires et cutanés. (CHARTIER, 2002 ; MAILLARD et DOUART, 2004 ; ROCQUES, 2006).

Les tableaux 4 et 5 ci-dessous présentent des éléments d'orientation du diagnostic différentiel des causes les plus fréquentes de diarrhée néonatale respectivement chez les veaux et chez les petits ruminants.

Tableau 4: Diagnostic différentiel des diarrhées néonatales (d'après MAILLARD et DOUART, 2004).

Cause de la diarrhée	Âge d'apparition	Aspect de la diarrhée	Signes cliniques pouvant accompagner la diarrhée	Modalités du diagnostic
Colibacilles entérotoxigènes	<4 jours	Aqueuse profuse jaunâtre à jaune paille.	Dépression, déshydratation, hypothermie.	Fèces : recherche de facteurs d'attachement F5
Colibacilles attachant-effaçant	>4 jours	Mucoïde, sang non digéré, fausses membranes.	Anémie, Déshydratation, hypothermie.	Clinique et nécropsique : typhlocolite Fèces : recherche d'antigènes colibacillaires et de toxines
Colibacilles septicémiques	>6 jours	Parfois absente.	Abattement, hypothermie rapide, décubitus, localisations articulaires, hépatique...	Epidémioclinique Recherche sur matières fécales Sang : recherche de bactériémie (plusieurs prélèvements par animal)
Salmonelles	Tous âges	Tous types, sang, fausses membranes (nécrose).	Forte hyperthermie, abattement, anorexie. Atteinte respiratoire possible. Avortements chez les adultes.	Fèces, coproculture
Rotavirus	6-10 jours	Liquide à pâteux, fétide (malabsorption). Rarement hémorragique.	Abattement, anorexie, hyperthermie modérée.	Fèces : kits immunoenzymatiques ELISA, tests d'agglutination de particules de latex
Coronavirus	5 à 10 jours. Possible de 3 jours à 3 mois	Liquide à pâteux (malabsorption). Parfois présence de sang.	Abattement, anorexie, forte déshydratation. Hyperthermie. Signes respiratoires sur veaux, atteinte digestive sur adultes (type dysenterie hivernale).	Fèces : ELISA Organes : immunofluorescence sur coupes (congélation du prélèvement possible)
Virus BVD/MD	Tous âges	Profuse. Parfois hémorragique.	Hyperthermie, ptyalisme, ulcères buccaux, signes oculaires et cutanés.	Recherche virale sur cadavres, recherche d'antigènes <i>in vivo</i> (Infectés Permanents Immunotolérants). Attention à la sensibilité

				des tests et à la persistance des anticorps colostraux. Sérologie chez animaux sentinelles (mères, veaux > 6 mois)
Autres virus (torovirus, astrovirus, parvovirus)	>3 jours	Tous types.	Similaires à l'atteinte par le rotavirus.	Fèces : microscopie électronique. Pas de recherche en routine. Inoculation de cultures cellulaires, immunofluorescence
Cryptosporidies	5 à 15 jours (2 mois)	Liquide puis mucoïde, odeur putride.	Atteinte de l'état général, faiblesse.	Fèces : recherche des oocystes par coprologie
<i>Giardia</i> sp	>1 semaine (passage à la chronicité)	Mucoïde.	Amaigrissement.	Fèces : visualisation des protozoaires (kystes) (examen direct)
Coccidies vraies <i>Eimeria bovis</i> , <i>Eimeria Zuernii</i>	>2 à 3 semaines	Profuse hémorragique, noirâtre (flux de sang).	Troubles nerveux (éventuellement sans signes digestifs). Atteinte rapide de l'état général et forte déshydratation. Ténésme.	Fèces : visualisation des oocystes. Nombreux animaux faux-négatifs pendant les phases aiguës
<i>Candida</i> sp	>2 semaines	Mucoïde non hémorragique	Parfois lésions buccales (muguet) et œsophagiennes visibles à l'œil nu	Epidémioclinique : antécédent de traitement antibiotique prolongé Fèces : examen direct et culture
D-lactacidémie	7 à 12 jours	Absente ou discrète. Mucoïde.	Gastro-entérite paralysante, veau « mou », parésie postérieure, démarche ébrieuse, œdèmes palpébraux, létalité faible, déshydratation modérée.	Fèces : recherche des colibacilles possédant le facteur d'attachement CS31A. Mesure pH sanguin et D-lactacidémie
Hypersensibilité aux protéines végétales			Diarrhée profuse et malabsorption.	Epidémioclinique : veaux nourris aux lactoreplaceurs contenant du soja ou du pois

Tableau 5: Principales causes de diarrhée néonatale chez les chevreaux et les agneaux (d'après MILLEMAN *et al.*, 2003).

Causes	Âge de survenue	Aspects cliniques	Éléments épidémiologiques
“Digestive” (nutritionnelle)	Tous âges	Animal généralement peu affecté, pas d’hyperthermie (mais risque de torsion mésentérique chez le chevreau)	Souvent un seul animal atteint (ou quelques-uns)
<i>Escherichia coli</i> (ETEC)	Avant 10 jours	Animal généralement très affecté, diarrhée jaune, déshydratation rapide	Plusieurs animaux touchés, plutôt en milieu ou en fin de saison de mise bas
Clostridies	Avant 3 semaines	Maladie grave, diarrhée parfois hémorragique, signes nerveux, mort subite fréquente	Plusieurs animaux affectés, en bon état d’entretien, élevage intensif
<i>Salmonella</i> spp.	Tous âges	Animal très affecté, diarrhée verdâtre parfois hémorragique, déshydratation rapide, mort subite possible chez les caprins	Plusieurs animaux touchés, plutôt en fin de saison de mise bas. Aspect épizootique sur animaux de tous âges
Rotavirus, coronavirus	Première semaine et jusqu’à 3 mois pour coronavirus	Diarrhée liquide, déshydratation, guérison spontanée possible	Plusieurs animaux touchés, plutôt en fin de saison de mise bas
<i>Cryptosporidium</i> spp.	5 jours à 3 semaines	Diarrhée jaunâtre apyrétique, déshydratation faible, apyrexie	Plusieurs animaux touchés, plutôt en milieu ou en fin de saison de mise bas

2.8.3. Diagnostic de laboratoire

Le diagnostic de laboratoire, essentiel pour être sûr qu'on a bien à faire à une cryptosporidiose, est le plus souvent basé sur la mise en évidence des oocystes dans les matières fécales, ou dans un échantillon de l'élément supposé contaminé (eau, alimentation...).

Les excréments peuvent être prélevées sur le sol ou à même le rectum (CHARTIER et PARAUD, 2010).

2.8.3.1. Microscopie conventionnelle

L'observation simple de l'échantillon au microscope est réalisable mais il existe peu de caractères morphologiques pour identifier *Cryptosporidium*, et l'indentification à la lumière du microscope peut se révéler très fastidieuse si elle n'est pas accompagnée d'autres méthodes, notamment de coloration et/ou de concentration. En effet, les échantillons peuvent parfois s'avérer très faiblement contaminés et il faut alors pouvoir concentrer les oocystes avant de pouvoir les observer. La coloration permet quand à elle d'aider à différencier les oocystes de *Cryptosporidium* d'autres protistes ou de débris multiples contenus dans l'échantillon (JEX *et al.*, 2008).

2.8.3.1.1. Méthodes de purification

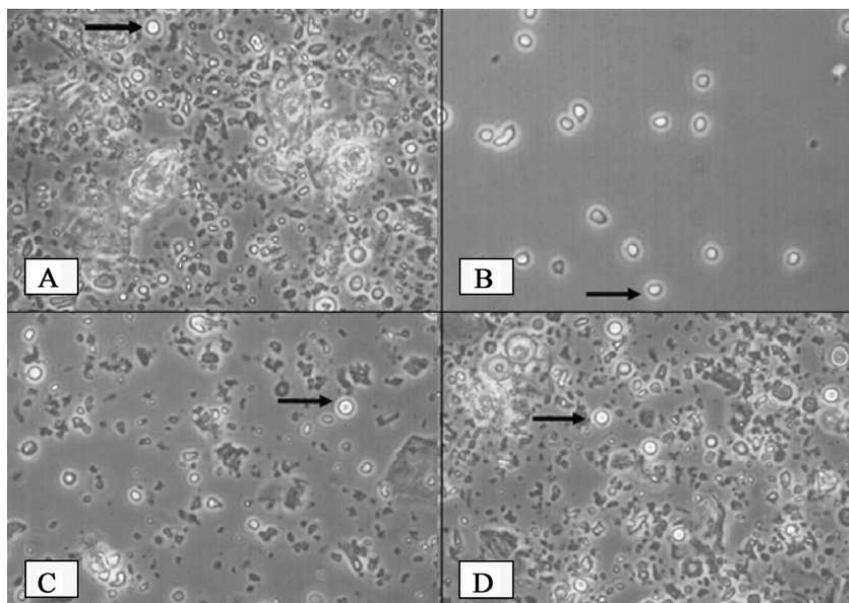
Il existe différentes méthodes de purification. Le but de ces méthodes est de concentrer les oocystes, qui sont parfois présents dans des quantités très faibles dans les échantillons prélevés (fèces, eau...) (O'DONOGHUE, 1995).

On peut citer par exemple la centrifugation au gradient de Percoll®, la flottation au chlorure de sodium saturé (NaCl), la flottation au saccharose aussi appelée flottation au sucrose, ainsi que des filtrations à travers du polypropylène tissé ou des filtres en polycarbonate, ces dernières étant plutôt réservées aux échantillons d'eau comme nous le verrons plus tard (KAR *et al.*, 2011 ; O'DONOGHUE, 1995).

Il semblerait que les meilleures techniques de flottation soient celles utilisant des solutions de densité élevée, en veillant à examiner l'échantillon très rapidement après l'avoir préparé, afin de ne pas avoir d'altération des oocystes (O'DONOGHUE, 1995).

Les efficacités de la centrifugation au gradient de Percoll®, de la flottation au chlorure de sodium saturé, et de la flottation au saccharose été comparées par KAR *et al.* (2011), qui ont conclu à une meilleure efficacité de la solution au NaCl par rapport aux 2 autres méthodes car elle permettait de recruter 71% des oocystes tout en ayant peu de débris, et en sélectionnant moins d'oocystes non viables que les autres méthodes (figure 24), (KAR *et al.*, 2011).

Figure 24: Images obtenues au microscope à contraste de phase de fèces contenant la même quantité d’oocystes (flèches) avant purification (A), après purification par la technique de flottation au NaCl (B), après purification par la technique de flottation au saccharose (C) et après purification par la technique de centrifugation au Percoll® (D) (Source : KAR *et al.*, 2011)



La technique de flottation au saccharose telle qu’elle peut aisément être réalisée dans un cabinet vétérinaire est décrite ci-dessous, avec des avantages et des inconvénients par rapport aux méthodes de coloration et d’immuno-marquage.

➤ **Technique de flottation au sucrose** (d’après CHARTIER et PARAUD, 2010)

Préparer la solution de saccharose :

Dissoudre 250 g de saccharose dans 160 mL d’eau déminéralisée tiédie. On peut également utiliser du sirop de canne liquide.

Opérations préliminaires :

Déposer une goutte de fèces sur une lame. Ajouter une goutte de solution de saccharose. Mélanger. Recouvrir d’une lamelle en appuyant légèrement.

Lecture :

Observer immédiatement au microscope au grossissement X200. Les oocystes font entre 4-6 μm et apparaissent légèrement rosés contrairement aux levures qui n’ont pas de coloration. Au grossissement X400, ils perdent leur coloration, mais on peut observer une à quatre granulations qui correspondent aux sporozoïtes contenus dans les oocystes biréfringents.

Sensibilité: 89% / Spécificité: 94%

Avantages:

- meilleure sensibilité que celle des colorations en cas de faible positivité ;
- coût réduit et simplicité qui en font une des méthodes de choix sur le terrain, après les kits diagnostiques ;
- peut aussi donner des résultats quantitatifs (quantité de fèces et d'eau pesées et comptage d'oocystes en cellule de Thoma).

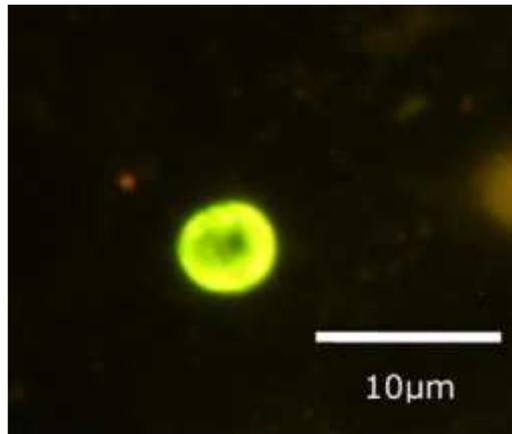
Inconvénients :

- nécessite une certaine expérience au niveau de la lecture, qui doit en outre être réalisée rapidement ;
- la présence d'un oocyste ne garantit pas que les cryptosporidies soient responsables des signes cliniques (nécessité de procéder à des comptages).

2.8.3.1.2. Méthodes de coloration

Il existe de nombreuses techniques de coloration : coloration au Diméthyle Sulfoxyde-fuch sine phéniquée (Carbol-fuch sine ou coloration de Heine), Kinyoun, Safranine-bleu de méthylène, Ziehl-Neelsen modifié... Les oocystes seront alors colorés en rouge alors que les levures, bactéries et débris ne prendront pas la coloration. D'autres techniques, par exemple utilisant comme colorant l'auramine-rhodamine ou l'auramine-phénol (figure 25) s'avèrent très sensibles mais coûteuses. (O'DONOGHUE, 1995 ; FAYER *et al.*, 2000 ; JEX *et al.*, 2008)

Figure 25: Coloration de *Cryptosporidium* à l'Auramine-Phénol (Source : ELWIN *et al.*, 2012).



Le colorant de choix pour de nombreux laboratoires est la coloration acidophile, avec de la fuch sine basique par exemple (O'DONOGHUE, 1995 ; FAYER *et al.*, 2000).

Il est recommandé de travailler sur un échantillon de matières fécales fixé avec un fixateur comme du formol à 10% ou du Sodium acide-formol d'acétate-acétique (O'DONOGHUE, 1995 ; FAYER *et al.*, 2000).

Bien qu'utiles et peu coûteuses, les techniques de coloration souffrent d'un manque de spécificité et/ou sensibilité, surtout lorsque l'échantillon contient peu d'oocystes. En effet, les méthodes de coloration utilisées seules ne permettent pas de concentrer l'échantillon. Ainsi, si on a à faire avec un échantillon très peu concentré, il y a des chances de passer à côté des oocystes présents (JEX *et al.*, 2008).

L'un des problèmes soulevé pour ces méthodes est le fait qu'elles peuvent être chronophages et nécessitent quelqu'un d'expérimenté pour les observations microscopiques (O'DONOGHUE, 1995 ; FAYER *et al.*, 2000).

En plus de ces méthodes de coloration directes, on peut faire des colorations « négatives », comme le vert de malachite ou le vert de merbromine, qui vont colorer l'arrière-plan et pas les cryptosporidies. Ces méthodes sont cependant assez longues à réaliser et nécessitent également une personne expérimentée à l'observation au microscope (JEX *et al.*, 2008).

Les 2 méthodes décrites ci-dessous sont couramment utilisées et ont montré une homogénéité dans leurs résultats (KAR *et al.*, 2011).

➤ *Coloration de Ziehl-Neelsen modifiée/ Technique de coloration à la fuschine*
(d'après CHARTIER et PARAUD, 2010)

Réactifs utilisés :

Ethanol à 95% ; Fuchsine de Ziehl ; solution Méthanol-acide à 1% (mélange 20 mL d'HCl 37% (GPR) avec 1980 mL de méthanol absolu), solution Vert de malachite (mélanger 0,25 g de vert de malachite avec 75 mL d'eau déminéralisée) ; huile à immersion.

Opérations préliminaires :

Etaler le plus finement possible une goutte de fèces sur une lame. Sécher à l'air. Fixer à l'éthanol à 95% pendant 5 min puis flamber la lame. Recouvrir la lame encore chaude à la fuchsine de Ziehl et laisser agir 5 min. Rincer à l'eau du robinet jusqu'à élimination de la fuchsine excédentaire. Asperger la lame avec une ou deux giclées de solution de méthanol-acide à 1% (en brefs contacts séparés d'un court rinçage à l'eau du robinet). Rincer à l'eau. Recouvrir la lame de vert de malachite à 0,25% pendant 30 secondes (ou avec du bleu de méthylène de 0,1 à 0,3%). Rincer, sécher.

Lecture :

Observer au grossissement X400 et sous huile à immersion au grossissement X1000. Les oocystes de cryptosporidie apparaissent de rose à rouge vif sur un fond vert (ou bleu si contre coloration au bleu de méthylène). (Figure 26).

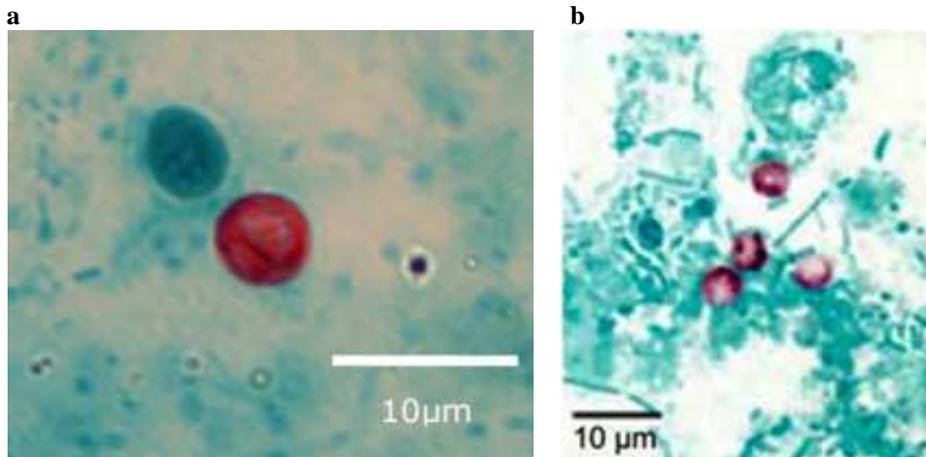
Avantages :

- repérage facilité des oocystes par rapport à une méthode sans coloration ;
- oocystes facilement différenciables des spores de levures.

Inconvénients :

- technique assez longue ;
- risque de confondre certains éléments avec des oocystes (globules gras, éléments bactériens, dépôts de fuchsine...).

Figure 26: Oocyste de *Cryptosporidium* en coloration Ziehl-Neelsen modifiée (Source : ELWIN *et al.*, 2012 (a) et le site internet VIH Web Study (b)).



- **Coloration de Heine (Carbol fuchsin stain)** (d'après ROCQUES, 2006 ; CHARTIER et PARAUD, 2010)

La méthode de Heine est une méthode utilisée classiquement en laboratoire d'analyse.

Coloration avec la fuchsine :

Mettre une goutte de fèces et une goutte de fuchsine sur une lamelle. Faire un étalement. Laisser sécher. Dès que le prélèvement est sec (d'aspect mat), mettre l'huile à immersion puis une lamelle.

Lecture :

Regarder la lame aux grossissements 40 puis 100. Seuls les oocystes de cryptosporidies ne prennent pas le colorant. Ils apparaissent brillants sur un fond rouge et plus sombre (figure 27).

Avantages :

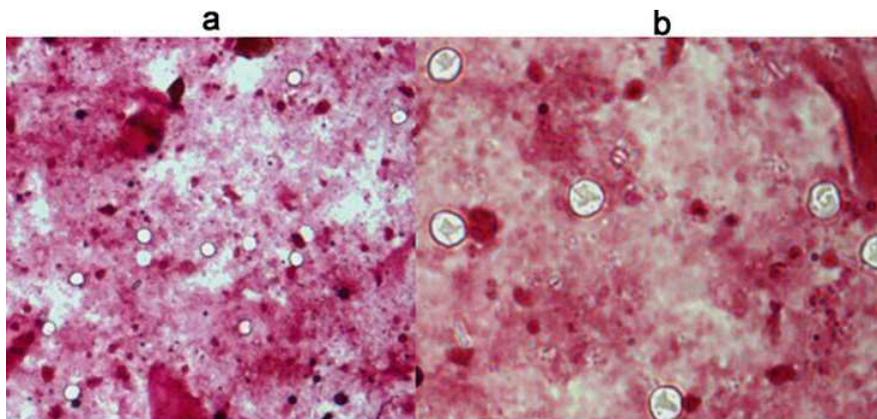
- très rapide, peu coûteux
- la méthode peut apporter des informations semi-quantitatives. Le comptage des oocystes permet d'obtenir un score : une + correspond à « moins d'un oocyste par champ à l'objectif x 40 » et 4 + à plus de « 20 oocystes par champ » avec le même objectif. (DELAFOSSÉ et al. 2003)

Inconvénients :

- nécessite une certaine expérience au niveau de la lecture ; les oocystes ne doivent pas être confondus avec des bulles d'air, réfringentes également, mais sans structures internes ;
- la présence d'un oocyste ne garantit pas que les cryptosporidies soient responsables des signes cliniques (nécessité de procéder à des comptages) ;
- les lames doivent être lues rapidement (dans les 15 minutes), la réfringence s'atténue et disparaît ensuite. ;

- la lecture est nettement plus facile en microscopie à contraste de phase. Ce matériel n'est pas toujours très répandu ce qui constitue une des limites d'utilisation de la méthode.

Figure 27: Oocystes de *C. parvum* en coloration de Heine au microscope optique X400 (a) et X1000 (b) (Source : REN *et al.*, 2012).

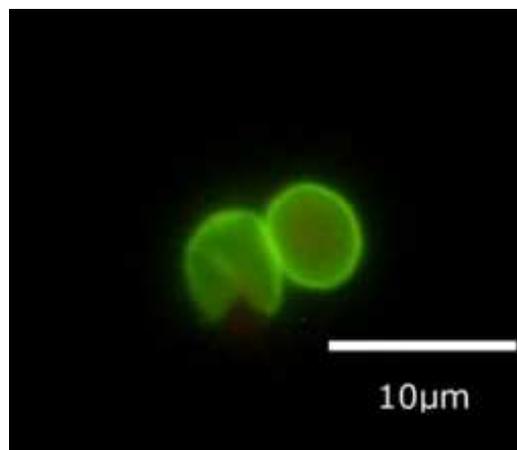


2.8.3.2. Méthodes d'immuno-marquage

Les méthodes de marquage immunologique peuvent offrir de nombreux avantages par rapport aux méthodes basées sur la microscopie traditionnelle.

Par exemple, la microscopie en fluorescence (figure 28) associée à l'utilisation d'anticorps fluorescents (*fluorescein-isothiocyanate-conjugated anti-Cryptosporidium monoclonal antibody FITC-C-mAb*) reconnaissant des épitopes de surface d'un oocyste peut atteindre une sensibilité et une spécificité très satisfaisante dans la détection d'oocystes de *Cryptosporidium* dans des échantillons de matières fécales et de l'environnement: 96-100% et 98,5-100% respectivement. Ce genre de test est commercialisé et utilisé en routine par les laboratoires pour détecter et dénombrer des oocystes dans l'environnement ou dans des selles. Il existe une importante variabilité dans la sensibilité et la spécificité des tests de fluorescence directe, notamment en fonction de l'anticorps monoclonal utilisé (JEX *et al.*, 2008).

Figure 28: Image de *Cryptosporidium* en microscopie à fluorescence utilisant la FITC-C-mAb (Source : ELWIN *et al.*, 2012).



La détection de coproantigènes de *Cryptosporidium* par des tests ELISA et des méthodes immuno-chromatographiques sont aussi utilisées. La spécificité de ce genre de test est bonne (98-100%) mais la sensibilité est souvent moins bonne qu'avec les techniques microscopiques. L'avantage est que l'on peut détecter des animaux qui n'excrètent pas encore d'oocystes, et que l'on peut rapidement, et pour un faible coût, tester un grand nombre d'échantillons de fèces (JEX *et al.*, 2008).

Dans les laboratoires français, ce sont des tests ELISA qui sont réalisés en routine pour la recherche de *Cryptosporidium* dans les selles. C'est un test peu coûteux et facile à mettre en œuvre (RADOSTITS *et al.*, 2007).

Toutes ces techniques sont très intéressantes pour détecter des oocystes ou antigènes de *Cryptosporidium*, notamment lorsque ceux-ci sont peu nombreux parmi de grandes quantités de débris, mais elles ne permettent pas forcément de faire le distinguo entre les espèces et génotypes de *Cryptosporidium*, ce qui pose problème notamment lorsque l'on recherche l'origine d'une épidémie (O'DONOGHUE, 1995).

De nombreux kits de diagnostic utilisant des méthodes d'immuno-marquage sont disponibles et commercialisés dans des pays du monde entier (O'DONOGHUE, 1995).

Ci-dessous quelques caractéristiques de certains kits de diagnostic rapide actuellement commercialisés en France :

- *Bandelette immunoréactives/ Kit diagnostic : "SPEED V-DIAR"® de BTV (figure 29) et "Tetrastrips"® et "Tigettes Bio K155"® de Bio X (d'après CHARTIER et PARAUD, 2010)*

Le principe général de ces tests est une identification des antigènes des pathogènes par immunochromatographie.

Sensibilité : 78% / Spécificité : 93%

Avantages :

- se réalise en une quinzaine de minutes. Utilisation facile et possible au chevet du malade;
- permet un diagnostic étiologique rapide des diarrhées des jeunes ruminants (cryptosporidiose, *Escherichia coli* K99 +/- CS31A, rotavirus et coronavirus). Le traitement et la prophylaxie n'en sont que plus efficaces car prescrits sans retard, ce qui permet de sauver de nombreux animaux.

Inconvénients :

- moins bonne sensibilité et spécificité que la technique de flottation au saccharose (à relativiser car ici il n'est pas nécessaire d'être expérimenté).

Figure 29: Kit de diagnostic rapide des diarrhées néonatales commercialisé en France.



Une méthode indirecte de détection d’ocyste de *C. parvum* a été testée par KNIEL *et al.* (2004). Elle consistait à mettre en évidence non pas les oocystes de *C. parvum*, mais un virus symbionte de *C. parvum*, le CPV, présent de façon constante dans ses oocystes, grâce à des anticorps immuno-fluorescents dirigés contre lui. Les résultats ont montré un excellent taux de détection des oocystes ; le défaut de cette méthode résidait dans le fait que le CPV restait présents dans des échantillons longtemps après la perte de viabilité des oocystes (KNIEL *et al.*, 2004).

Une étude a entrepris de comparer les performances de 2 techniques de diagnostic de cryptosporidiose à savoir l’association d’une méthode d’immunochromatographie (IC) et d’une méthode d’immunofluorescence (IF) à la PCR en temps réel dans une population où la prévalence était faible. La PCR, utilisée comme référence, s’est montré plus sensible que les 2 autres méthodes associées. Cependant, les auteurs ont souligné les bons résultats obtenus avec l’IC et l’IF, nécessitant du personnel moins « entraîné » que pour l’utilisation de la PCR, et pour un prix beaucoup moins élevé (CALDERARO *et al.*, 2011).

2.8.3.3. Cytométrie de flux

La cytométrie de flux est associée à une technique d’immunofluorescence. Ici encore, on marque des oocystes avec des anticorps fluorescents, et on fait ensuite passer l’échantillon liquide dans un cytomètre de flux. Les échantillons nécessitent d’être préalablement filtrés et centrifugés. Les premiers résultats de ce genre de technique ont été encourageants avec la détection de faibles quantités d’ocystes (jusqu’à 1000 oocystes par litre). D’autres études basées sur la détection d’ocystes dans des échantillons de fèces, ont remis en cause cette efficacité, avec un taux de récupération des oocystes de 45%, alors que des taux de récupération de 98% avaient été trouvés précédemment, et une « sensibilité » de 1000 oocystes par mL et 50000 oocystes par gramme selon les auteurs. De nombreux aménagements de ces techniques, en utilisant des doubles colorations par exemple, sont régulièrement mises en œuvre pour améliorer les résultats de la cytométrie de flux (JEX *et al.*, 2008).

D'après O'DONOGHUE (1995), les techniques utilisant la cytométrie de flux montreraient une meilleure sensibilité par rapport à la microscopie conventionnelle accompagnée de mesures de concentration et de colorations.

2.8.4. Diagnostic plus approfondi : les méthodes basées sur les acides nucléiques

Comme le rappelle DE WAELE *et al.* (2011) dans leur article, la sensibilité et la spécificité des tests d'examen microscopique, même en faisant appel en parallèle à des techniques d'immunofluorescence laissent à désirer. En effet, ils ne permettent bien souvent de détecter que des individus très atteints, et excrétaient un grand nombre d'oocystes ou des échantillons contenant beaucoup d'oocystes. De plus, les méthodes citées précédemment ne permettent pas de déterminer l'espèce de cryptosporidie incriminée.

Pour un éleveur ou même un vétérinaire, le diagnostic vise à incriminer le genre *Cryptosporidium*, et dans les cas les plus courants, il n'y a pas d'intérêt à savoir précisément à quelle espèce ou génotype est responsable.

En revanche, il peut être intéressant de savoir qu'une infection à *Cryptosporidium* est présente même si un élevage n'est pas en plein « boom » de l'épidémie, afin de pouvoir mettre en place des mesures prophylactiques. De plus, si des cas humains sont suspectés d'être en lien avec des cas animaux, alors il devient vraiment intéressant de pousser plus loin le diagnostic afin de confirmer ou d'infirmer la présence d'un lien épidémiologique entre animaux et humains, en déterminant l'espèce, le génotype et le sous-génotype responsable de l'infection.

L'amélioration des connaissances en matière de cryptosporidiose et notamment en ce qui concerne l'évaluation des risques zoonotiques passe forcément par une meilleure connaissance des espèces et sous-génotypes impliqués lors de cryptosporidiose et ce quelque soit l'hôte incriminé.

Ainsi, on dispose d'outils de plus en plus sophistiqués pour identifier les souches de manière précise.

2.8.4.1. L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH : *Fluorescent in situ hybridization*)

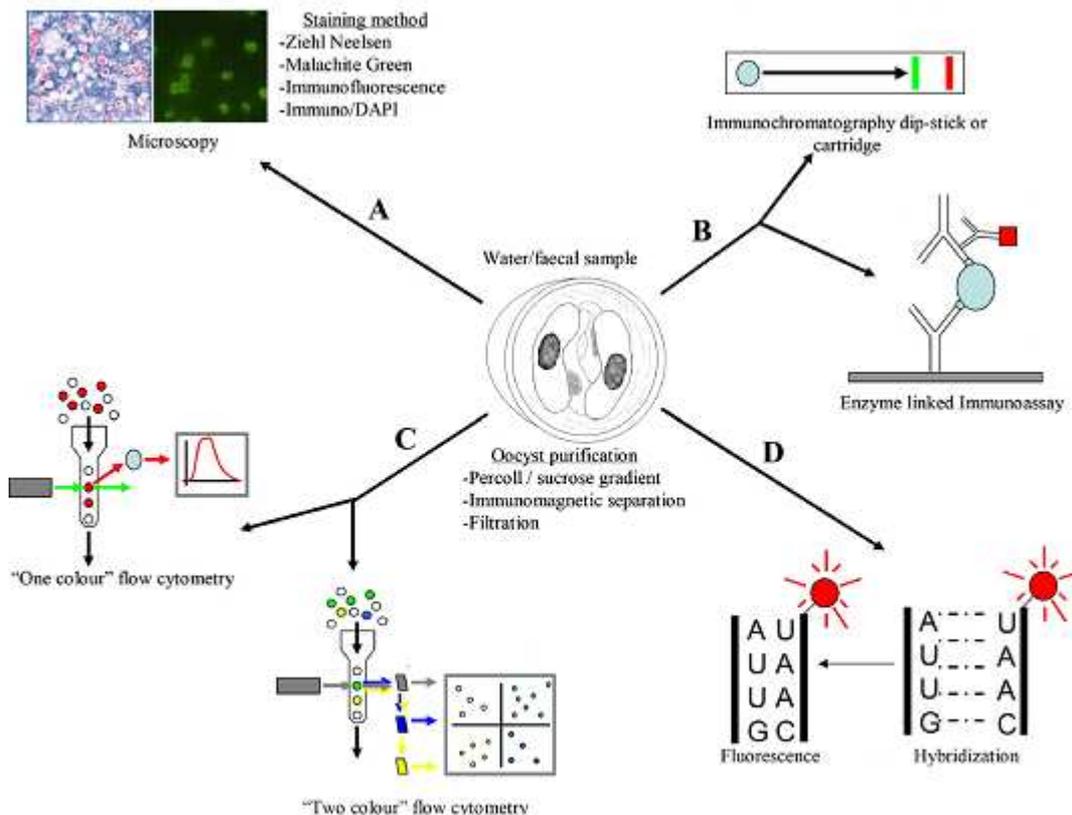
Les techniques de FISH utilisent principalement des oligo-nucléotides marqués par fluorescence, qui ciblent de façon très spécifique des séquences d'ADN ou d'ARN ; le plus souvent il s'agit de petites sous unités d'ARN nucléaire ribosomal, présentes en un nombre de copies importantes dans la cellule. En principe, seuls les oocystes viables sont mis en évidence par cette méthode puisque l'ARN se trouve dégradé lorsque la cellule meurt. Cette affirmation est cependant remise en cause, ce qui remet en cause une partie de l'intérêt de cette méthode (JEX *et al.*, 2008).

Des tests plus rapides et moins chers basés sur la FISH et permettant de différencier les espèces sans passer par la PCR voient actuellement le jour. Ainsi, un test d'hybridation *in situ* en fluorescence basé sur la petite sous-unité 18S rRNA permettant de préciser si on est en

présence d'un échantillon contenant *C. parvum* ou non a été développé récemment et donnerait des résultats satisfaisants (ALAGAPPAN *et al.*, 2008).

Les techniques que nous avons décrites sont illustrées sur la figure 30 ci-dessous :

Figure 30: Schéma récapitulatif des méthodes utilisables dans la détection des oocystes de *Cryptosporidium* (sauf PCR) (Source : JEX *et al.*, 2008).



2.8.4.2. La Réaction de Polymérisation en Chaîne (*Polymerase Chain Reaction* : PCR)

L'amplification par PCR de régions d'ADN polymorphes permet de travailler sur des échantillons contenant peu de *Cryptosporidies*. De nombreuses régions variables, codantes ou non codantes, uniques ou répétées dans le génome, ont été caractérisées. Après amplification par PCR ou par PCR nichée, la variabilité interne de ces régions est révélée par RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), ou par séquençage de l'ADN, directement ou après clonage (Rapport AFSSA, 2002).

L'utilisation de la PCR associée au séquençage d'ADN ou au RFLP s'est avéré être la méthode la plus prometteuse en ce qui concerne l'identification d'espèces et la distinction de génotypes. Sa supériorité en termes de sensibilité et de spécificité par rapport à des techniques

« classiques » d'examen microscopique à été démontrée à de nombreuses reprises (DE WAELE *et al.*, 2011 ; KAR *et al.*, 2011).

De nombreuses méthodes et protocoles ont vu le jour depuis plusieurs années : amplification aléatoire d'ADN polymorphe (*Random Amplification of Polymorphic DNA = RAPD*), PCR Nichée (*Nested PCR*), polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (*Amplified Fragment Length Polymorphism = AFLP*), analyse des séquences satellites de l'ADN, PCR associée au polymorphisme de longueur des fragments de restriction (*Restriction Fragment Length Polymorphism = PCR-RFLP*), PCR en temps réel (rtPCR)... Ces méthodes peuvent être couplées à une analyse électrophorétique pour détecter des mutations, par exemple avec l'utilisation du polymorphisme de conformation des simples brins (*Single Strand Conformation Polymorphism = SSCP*) (JEX *et al.*, 2008).

La méthode actuellement la plus utilisée est PCR-RFLP sur des petites sous-unités d'ARN ribosomal (CAREY *et al.*, 2004 ; TZIPORI et WIDMER, 2008).

XIAO rapporte en 2010 que dans 100 publications sur 116 (soit 86%) des 3 dernières années, le génotypage de *Cryptosporidium* avait fait appel à l'utilisation de SSU rRNA (*Small Subunit of ribosomal RNA*). En particulier, la PCR-RFLP prenant pour cible un fragment de 830 paires de bases, le gène 18S rRNA, est utilisée dans 70% des publications. Les fragments fréquemment utilisés pour le séquençage sont le 18S rRNA comme dit précédemment, ainsi que le gène COWP (*oocyst wall protein gene*), le gène de la protéine de choc thermique HSP-70 et le gène de l'actine (WYATT *et al.*, 2010).

Le Cryptodiag, un test permettant de différencier *C. parvum*, *C. hominis* et *Cryptosporidium spp.*, basé sur la PCR et un test ELISA a récemment été mis en vente sur le marché. Il donne des résultats similaires à ceux des méthodes usuelles dans 85% des cas et son utilisation est plus simple (SAVIN *et al.*, 2008).

L'analyse des sous-types des différentes espèces de *Cryptosporidium* permet ensuite de retrouver précisément l'origine d'une contamination, notamment dans des enquêtes épidémiologiques et pour les études de génétique des populations de *Cryptosporidies*. La plupart des études emploie pour ce faire l'analyse de la séquence du gène GP-60, ou les microsatellites locus 1 (ML1) et locus 2 (ML2) (JEX *et al.*, 2008 ; XIAO, 2010 ; WYATT *et al.*, 2010).

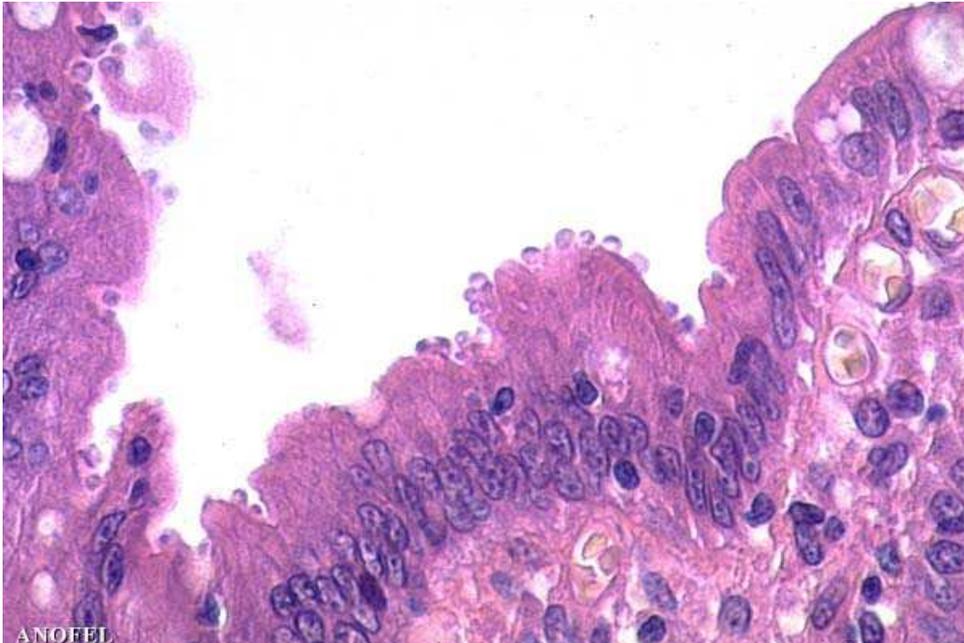
Cependant la présence d'oocystes en très faible quantités ou de mélanges d'espèces restent des problèmes même lorsqu'on utilise des techniques fines comme la PCR. La limite actuelle de détection de *Cryptosporidium* est de l'ordre de 1 oocyste pour 100 litres d'eau. Ainsi les techniques basées sur la PCR vont certainement faire l'objet d'améliorations dans les années à venir (Rapport AFSSA, 2002 ; SMITH et NICHOLS, 2010).

2.8.5. Diagnostic histologique

On a vu précédemment qu'il n'y avait pas de lésions macroscopiques pathognomoniques de la maladie. En revanche, les coupes histologiques d'iléon d'un animal infecté peuvent permettre de mettre en évidence les différents stades parasitaires au niveau de la muqueuse intestinale, ainsi que l'atrophie et la fusion des villosités et l'abrasion des

microvillosités induites par le parasite (figure 31). On pourra également voir la présence de nombreuses cellules inflammatoires infiltrées dans la muqueuse intestinale.

Figure 31: Coupe histologique colorée à l'Hémalin-Eosine-Safran d'un intestin parasité par *Cryptosporidium parvum* (Source : réseau ANOFEL, France).

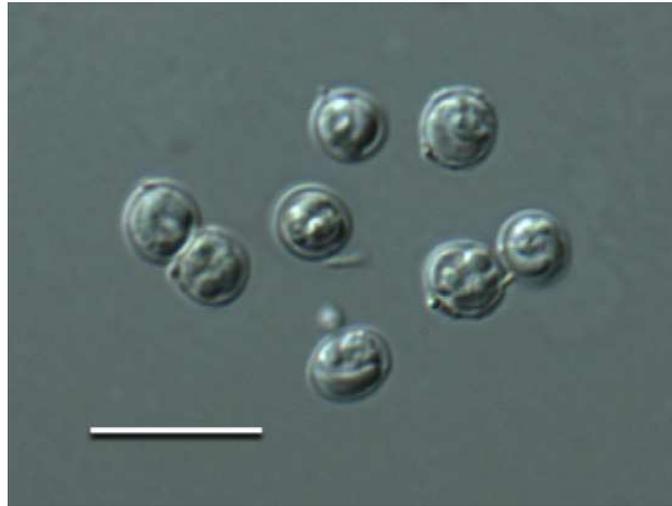


2.8.6. Détection de *Cryptosporidium* sp dans l'eau et les aliments

2.8.6.1. Détection dans l'eau

Un problème fréquemment rencontré est le faible nombre d'oocystes rencontré dans certains échantillons, notamment les échantillons d'eau. Ainsi, dans ce cas il est nécessaire de coupler différentes méthodes, à savoir des méthodes de filtration, par exemple par des filtres de propylène tissé ou des filtres en polycarbonate, de purification par séparation immuno-magnétique (*Principe : des anticorps spécifiques de Cryptosporidium sont attachés sur des particules magnétiques et mélangés à l'échantillon de manière à ce qu'ils entrent en contact avec les oocystes ; les particules magnétiques sont ensuite séparées des autres débris ; cette technique est cependant sensible à la spécificité des anticorps et à la turbidité de l'eau*) puis de détection avec des méthodes de fluorescence directe utilisant des anticorps ou de la microscopie à contraste interférentiel (méthode de Nomarski ; figure 32). Différentes variantes existent dans ce genre de protocole. Elles visent à améliorer les taux de détection des oocystes. Dans certains pays comme en Grande-Bretagne, ces protocoles opératoires sont standardisés (JEX *et al.*, 2008 ; SMITH et NICHOLS, 2010 ; KAR *et al.*, 2011).

Figure 32: Image obtenue par la technique de microscopie à contraste interférentiel (Source : REN *et al.*, 2012).



En théorie, toutes les techniques de diagnostic présentées ci-dessus peuvent être utilisées concernant les échantillons d'eau. En pratique, la PCR est l'outil le mieux adapté étant donné sa sensibilité et sa spécificité. L'association avec le RFLP ou un séquençage est préconisée afin de pouvoir connaître le sous-génotype incriminé.

En France, il existe une norme qui concerne la détection des oocystes dans l'eau: la norme NF T 90-455 qui impose des techniques de concentration par filtration sur cartouche, de reconcentration par la technique de séparation immunomagnétique et d'identification et dénombrement des oocystes par des méthodes d'immunodétection particulières. Les techniques d'échantillonnage, l'appareillage nécessaire, les réactifs nécessaires, les modes opératoires sont expliqués dans le recueil commercialisé par l'AFNOR (Rapport AFSSA, 2002 ; site internet de l'AFNOR).

SMITH et NICHOLS (2010) soulèvent néanmoins le problème de la reconnaissance et de la concentration de toutes les espèces, génotypes et sous-génotypes de *Cryptosporidium* par les techniques de séparation par immunomagnétisme qui ne serait pas forcément égal selon eux en fonctions des espèces et du matériau.

En France, la constitution d'un réseau de laboratoires spécialisés a été préconisée par l'AFSSA en 2002: des laboratoires pouvant assurer la recherche de cryptosporidies dans les selles, des laboratoires pouvant effectuer la recherche de cryptosporidies dans l'environnement, des laboratoires pouvant effectuer une identification spécifique et des laboratoires pouvant mener des tests de viabilité et infectiosité des oocystes. Les 4 types de laboratoires cités devraient donc posséder des niveaux de compétence et d'équipement différents. La création de ce réseau visait à l'amélioration des conditions de diagnostic, d'analyse épidémiologique et d'estimation du risque lié à la cryptosporidiose en France.

Un réseau national d'étude de la cryptosporidiose, sous l'égide de l'association Française des Enseignants et Praticiens Hospitaliers Titulaires de Parasitologie et Mycologie Médicale (ANOFEL), en partenariat scientifique avec l'AFSSA (désormais nommée ANSES, agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail) et l'Institut de veille sanitaire (InVS) a donc été créé en 2004 pour répondre à ce besoin.

« Fonctionnel depuis janvier 2006, le réseau associe à ce jour 39 laboratoires hospitaliers ou hospitalo-universitaires de parasitologie de France métropolitaine et des départements d'Outre-mer, soit la presque totalité des laboratoires hospitalo-universitaires français de parasitologie. Tous ont la compétence pour le diagnostic parasitologique de la cryptosporidiose chez l'homme, 8 ont la compétence pour l'identification des cryptosporidies dans l'eau, dans l'environnement ou les aliments, 12 peuvent effectuer une identification spécifique ou sub-spécifique par biologie moléculaire et 3 peuvent déterminer la viabilité/infectiosité des cryptosporidies dans des modèles expérimentaux.

Ses principales missions portent sur le diagnostic et l'épidémiologie de la cryptosporidiose humaine:

- Identifier et fédérer des laboratoires référents pour le diagnostic et la surveillance de la cryptosporidiose chez l'homme ;
- Assurer la surveillance de la cryptosporidiose humaine, en estimer la prévalence et l'incidence ;
- Contribuer à l'investigation d'épidémies de gastro-entérite (coordonnée ou menée en lien avec l'InVS/Cire) pour la recherche de cryptosporidies et autres protozoaires dans les échantillons clinique ou alimentaires ;
- Constituer une banque biologique d'isolats de *Cryptosporidium* spp., caractériser les génotypes des isolats humains de *Cryptosporidium* spp. et, dans la mesure du possible, des isolats animaux et environnementaux ;
- Développer et coordonner des actions de recherche sur la cryptosporidiose (aspects épidémiologiques, physiopathologiques, diagnostiques et thérapeutiques) » (Site internet ANOFEL).

En ce qui concerne le Réseau ANOFEL Crypto, il est composé en grande majorité de médecin, mais également de 2 vétérinaires, K. ADJOU et C. PARAUD, travaillant respectivement pour l'Unité Mixte de Recherche Biologie Moléculaire et Immunologie Parasitaires et Fongiques (UMR bipar) de l'ANSES-ENVA et pour la station caprine de Niort.

2.8.6.2. Détection dans les aliments

En ce qui concerne l'échantillonnage et l'analyse sur des aliments, la tâche est plus difficile. Il y a actuellement peu de méthodes standardisées pour détecter les oocystes de *Cryptosporidium* dans les aliments, la variété des produits à analyser rendant difficile la création de techniques standard dans ce cas de figure. Des méthodes ont quand même fait l'objet de publication, avec des efficacités de récupération des oocystes entre 1 et 79%. L'une d'elle, citée par SMITH et NICHOLS (2010) semble avoir une efficacité acceptable pour de la laitue et des framboises.