

1. Biologie des cryptosporidies

1.1. Historique

Le genre *Cryptosporidium* a été décrit et nommé pour la première fois en 1907 par Ernest Edward Tyzzer, un éminent parasitologue américain. Ce dernier avait observé le parasite dans les glandes gastriques de souris de laboratoire, et l'avait nommé *Cryptosporidium muris*. Il émit une première publication en 1910 avec le cycle évolutif détaillé de *Cryptosporidium*, nommé ainsi car il n'y avait pas de sporocystes dans les oocystes. Par la suite il observa des organismes similaires dans les intestins grêles de lapin puis en 1912 dans l'intestin de souris, qu'il nomma alors *Cryptosporidium parvum*. Il remarqua que les 2 espèces qu'il avait découvertes différaient par leur localisation, pour l'une stomacale et pour l'autre plutôt intestinale, et par la taille de leurs oocystes respectivement qualifiés de « gros » et « petits » (FAYER, 2004 ; TZIPORI et WIDMER, 2008 ; FAYER, 2010).

Dès 1955, la survenue de diarrhées à *Cryptosporidium meleagridis* chez des dindes commence à attirer l'attention du monde vétérinaire. Au cours des 20 années suivantes, on se rend compte petit à petit que *Cryptosporidium* est un agent infectieux largement répandu chez les animaux. C'est en 1971 que fut associée pour la première fois la présence de *Cryptosporidium* et de diarrhée chez un bovin (O'DONOGHUE, 1995 ; BONNIN et CAMERLYNCK, 1989 ; FAYER, 2004).

Par la suite, de nombreuses espèces furent identifiées et dénommées en fonction de l'hôte chez lequel elles avaient été trouvées, de la localisation des stades endogènes et/ou de la morphologie des différents stades du parasite ; par exemple, on nomma dans les années 1970 et 1980 de nombreuses espèces comme *Cryptosporidium agni* retrouvée chez l'agneau, *C. enteriditis*, *C. garnhami*... Mais cette façon de recenser les différentes espèces fut invalidée à la fin des années 1980 car il manquait de nombreuses données taxonomiques, notamment sur les plans morphologiques, biologiques et moléculaires, permettant de distinguer clairement les espèces les unes des autres. En outre, des études montrèrent que de nombreuses espèces de Cryptosporidies pouvaient se transmettre d'un hôte à l'autre, ce qui rendait dénuée de sens les appellations basées uniquement sur l'hôte. Toutes les espèces créées furent donc regroupées sous l'appellation *Cryptosporidium parvum*. Ainsi, jusqu'aux années 1970, on n'avait donc vraiment différencié chez les mammifères qu'une espèce, à « gros » oocystes, *C. muris*, qui parasitait les muqueuses gastriques, pendant qu'une autre, *C. parvum* à « petits » oocystes, parasitait les intestins (FAYER, 2004 ; FAYER, 2010).

La découverte des premiers cas humains de cryptosporidiose en 1976 puis le développement du SIDA (Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis) au début des années 1980 a par la suite attiré l'attention sur le parasite, notamment sur son pouvoir pathogène et sa qualité d'agent opportuniste (BONNIN et CAMERLYNCK, 1989 ; O'DONOGHUE, 1995 ; TZIPORI et WIDMER, 2008 ; GUYOT *et al.*, 2012). Il aura cependant fallu attendre 1993 et l'épidémie de Milwaukee dans le Wisconsin (États-Unis) ayant touché plus de 400 000 personnes pour que la cryptosporidiose soit reconnue comme un problème de santé publique à part entière et l'on porte plus d'attention à cette parasitose (FAYER, 2004).

Ce n'est qu'à la fin des années 1990 que l'on a mis en évidence grâce à des études moléculaires l'existence chez l'homme de 2 modes de transmission et de 2 génotypes associés : les transmissions d'humain à humain mettant en jeu un génotype « humain », qui fut admis en tant qu'espèce à part entière en 2002 et prit le nom de *Cryptosporidium hominis*, et les transmissions d'animal à humain d'un génotype « bovin » qui garda le nom d'espèce de *C. parvum*. D'autres espèces au pouvoir zoonotique font maintenant régulièrement l'objet de publication. (MORGAN-RYAN *et al.*, 2002 ; CAREY *et al.*, 2004 ; FAYER, 2010)

Depuis les années 1990 et l'avènement des techniques de biologie moléculaire, de nombreuses données biologiques et génétiques ont été regroupées pour différents génotypes, ce qui a permis de les reconnaître comme étant uniques et distincts et c'est ainsi que de nombreux génotypes ont pu être admis en tant qu'espèce ces dernières années. Ceci a permis à la fois de clarifier la situation, mais aussi de montrer la complexité qu'il existe ne serait-ce qu'en ce qui concerne la classification du genre (XIAO, 2010).

1.2. Taxonomie

1.2.1. Classification « historique » de *Cryptosporidium*

Les espèces de *Cryptosporidium* sont des parasites Apicomplexa qui infectent essentiellement les épithéliums gastro-intestinaux d'un nombre important d'hôtes vertébrés. Leurs principales caractéristiques morphologiques déclinées par rapports aux différents étages de leur classification sont décrites dans le tableau 1 présenté ci-dessous. Cette classification, si elle a été valable pendant de nombreuses années, est aujourd'hui en plein remodelage comme nous le montrerons par la suite.

Tableau 1: Classification taxonomique « historique » de *Cryptosporidium* spp (Adapté de SOARES, 2003 ; EUZEBY *et al.*, 2005 et EUZEBY, 2008).

Classification	Nom	Caractéristiques principales
Hyper-royaume	<i>Eucaryote</i>	Cellule dont le contenu est divisé en zones à fonction bien définie (notamment noyau et mitochondries).
Royaume	<i>Protiste</i>	Eucaryote unicellulaire.
Superphyllum	<i>Alveolata</i>	Présence d'un système d'espaces péribasaux sous-membranaires appelés alvéoles.
Phyllum	<i>Apicomplexa</i> = <i>Sporozoea</i> = <i>Sporozoaires</i>	- Organisme intracellulaire, parasite obligatoire; - Possède un germe infectieux de 4 à 20 microns muni d'un complexe apical particulier (intervenant dans la pénétration du parasite) ; - Absence d'organites locomoteurs, déplacements par glissements.
Classe	<i>Sporozoasida</i>	- Multiplication asexuée et reproduction sexuée ; - Formation d'oocystes.
Sous-classe	<i>Coccidia</i>	- Transmission par ingestion ; - Cycle de développement contenant des stades de schizogonie, gaméto gonie et sporogonie ; - Cycle généralement monoxène, parfois dixène ; - Reproduction de type gamétique, avec des gamontes de petite taille ; - Localisation intracellulaire à tous les stades sauf gamètes mâles libre ; - Présence d'un complexe apical complet ; - Pas de stades endo-érythrocytaires ; - Gamontes généralement non-sanguicoles.
Ordre	<i>Eucoccidiorida</i> = <i>Eucoccida</i>	- Multiplication par bipartition longitudinale ou par schizogonie ; - Reproduction par syngamie (parfois syzygie).

Sous-ordre	<i>Eimeriorina</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Développement indépendant des micro- et macrogamètes ; - Zygote non mobile ; - Multiplication par schyzogonie en diverses cellules ; - Gamétogonie dans les cellules épithéliales des organes creux ; - Gamontes mâles et femelles de taille subégale ; - Nombreux microgamètes flagellés renfermant un volumineux noyau, disposés à la périphérie de microgamonte qu'ils hérissent = corps chevelu ; - Macrogamète unique dans le microgamétocyte, à paroi constituée de granulations protéiques = corps granuleux ; - Pathogénie liée à l'action des schizontes ou plus rarement des gamétocytes ; - Schizontes de 2^{ème} génération doués de propriétés immunigènes ; - Chez les hôtes intermédiaires, pathogénicité liée aux mérozoïtes de type tachyzoïte.
Famille	<i>Cryptosporidiidae</i> = <i>Cryptosporiidae</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Oocyste de petite taille de 2 types : à paroi mince (demeurent dans le tube digestif et assurent une rétro-infection) et à paroi épaisse (rejetée dans les fèces, assurant la dispersion dans l'environnement et l'infection par ingestion) ; - Oocyste sporulé à 4 sporozoïtes libres sans sporocystes ; - Sporogonie endogène ; - Stades endogènes de développement comportant une organelle d'attachement ; - Développement intracellulaire extracytoplasmique sous la bordure en brosse des cellules épithéliales de l'intestin ; - Absence de spécificité pour certaines espèces ; - Cycle homoxène.
Genre	<i>Cryptosporidium</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Développement extracytoplasmique dans la bordure en brosse des cellules épithéliales ; - Microgamètes non flagellés ; - Très grande prolificité ; - Sporozoïtes colorables par la coloration de Ziehl-Neelsen, l'auramine, la safranine+bleu de méthylène ; - Existence possible d'oocystes atypiques ; - Pas de spécificité pour certaines espèces.

1.2.2. Une classification remise en cause

Le tableau 1 présenté ci-dessus expose une façon de classer la famille des *Cryptosporidiidae*, mais EUZEBY *et al.* (2005) évoquent l'émergence d'expériences, notamment celles de CARRENO *et al.* en 1999 puis celles d'HIJAWI *et al.* en 2002, faisant appel notamment à la biologie moléculaire, qui tendent à prouver que les *Cryptosporidiidae* sont plus proches des grégariens que des *Coccidia*. CARRENO *et al.* (1999) expliquent d'ailleurs que les analyses moléculaires réalisées par certains chercheurs avant 1999 montrent que les cryptosporidies forment un embranchement séparé des coccidies, contrairement à ce qui était auparavant admis sur la base de la similarité des cycles évolutifs de *Cryptosporidium* et des coccidies. L'appartenance des cryptosporidies aux coccidies *sensu stricto* est donc discutable, comme l'expliquent BARTA et THOMPSON (2006), et elles sont plutôt rattachées aux grégariens pour les raisons que nous allons développer ci-après.

1.2.2.1. Points communs et différences entre *Cryptosporidium* et les coccidies

Les cycles évolutifs des coccidies et des cryptosporidies sont très similaires, et c'est cet élément qui est une des bases du rapprochement qui est fait entre les 2 familles. (CARRENO *et al.*, 1999 ; CHARTIER, 2002 ; ROCQUES, 2006) (Voir Annexe 1 pour le cycle des coccidies, à comparer avec le cycle de *Cryptosporidium* présenté à la figure 4)

En revanche, les différences notables sont la localisation intracellulaire et extra-cytoplasmique des cryptosporidies, la présence d'une organelle d'attachement, et la structure de l'oocyste dans laquelle des structures morphologiques ne sont pas retrouvées, telles que des sporocystes, un micropyle, et des granules polaires présentes chez les coccidies. En outre, les cryptosporidies sont résistantes à tous les agents anti-coccidiens connus (EUZEBY, 2008).

Toutes ces caractéristiques ont été confirmées par les résultats des études moléculaires, qui mettent systématiquement *Cryptosporidium* dans un groupe différents des coccidies (ROSALES *et al.*, 2005).

De plus, il a récemment été démontré que *C. parvum* est capable de se développer dans un milieu sans cellule hôte, ce que les coccidies sont incapables de réaliser, leur développement nécessitant obligatoirement l'internalisation dans une cellule hôte (HIJJAWI *et al.*, 2004).

Un tableau récapitulatif des différences existant entre les cryptosporidies et les coccidies a été établi par BARTA et THOMPSON (2006). Ce tableau est traduit dans le tableau 2 qui suit :

Tableau 2: Différence entre *Cryptosporidium* et les Coccidies (Adapté de BARTA et THOMPSON, 2006)

Propriétés	<i>Cryptosporidium</i>	Coccidia
Localisation dans la cellule hôte	Intracellulaire mais extra-cytoplasmique	Complètement intracellulaire
Attachement ou organelle de nutrition	Présent	Absent
Type d'oocystes	2 types : à paroi fine et à paroi épaisse	Seulement à paroi épaisse
Taille des oocystes	Petits (5-7,4 X 4,5-5,6 µm)	Grands (9-38 X 7-39 µm)
Sporocystes, micropyle et granules polaires dans l'oocyste	Absent	Présent
Développement extracellulaire	Présent	Absent
Stades extracellulaires pratiquant la syzygie	Présents	Absents
Apicoplaste	Perdu	Présent
Complexité des voies de biosynthèse	Simplifié ; mise à profit des procédés de biosynthèse de l'hôte	Plus complexe
Sensibilité aux molécules anticoccidiennes	Insensibilité	Sensibilité
Spécificité vis-à-vis d'un hôte	Faible	Importante
Pathogénèse	Non comprise pour le moment	Presque entièrement comprise

1.2.2.2. Points communs et différences entre *Cryptosporidium* et les grégarines :

D'après BOROWSKY *et al.* (2008) des analyses phylogénétiques montrent que les espèces de *Cryptosporidium* sont étroitement liées aux grégarines.

Des caractéristiques notables des grégarines sont listées dans l'encadré ci-dessous :

Les Grégarinidia sont une sous-classe de protozoaires apicomplexa primitifs, habituellement considérés comme des parasites d'invertébrés, ayant pour caractéristiques :

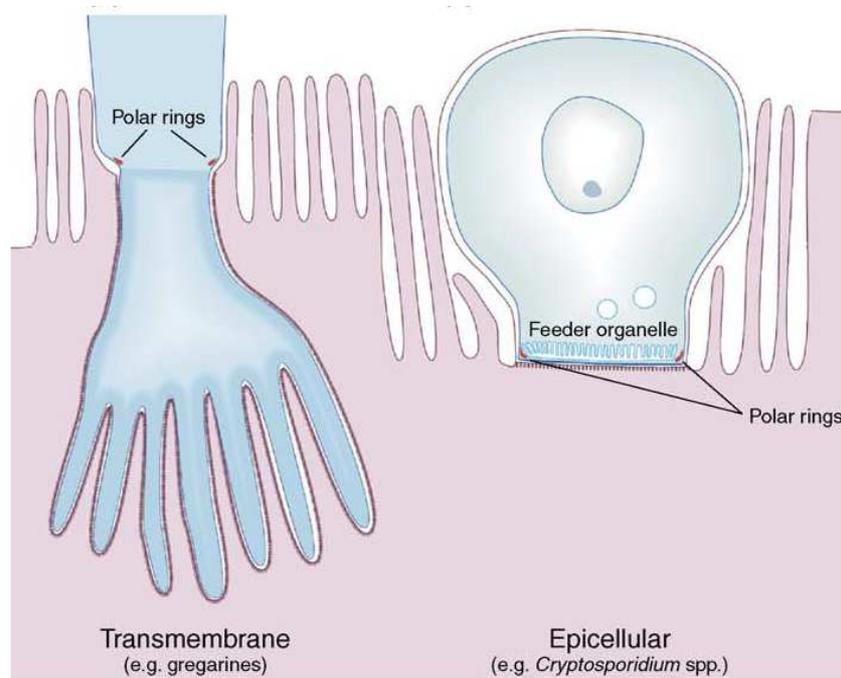
- *Mobililité par mouvements de reptation assurés par la formation de plis épicytaires ;*
- *Localisation d'abord intracellulaire (cellules épithéliales de l'intestin) puis extracellulaire ; accollement aux cellules hôtes par un épimérite et alimentation par mésocytose ;*
- *Existence ou non d'une multiplication asexuée par schizogonie (synonyme : mérogonie) avec, dans ce cas de nombreuses schizogonies et un pouvoir*

pathogène élevé. En l'absence de schizogonies, les trophozoïtes donnent directement des gamétocytes ;

- Reproduction par syzygie.

Les cryptosporidies montrent bien de nombreuses similarités avec les grégarines en ce qui concerne plusieurs caractéristiques citées ci-dessus, notamment elles possèdent une localisation extra-cytoplasmique avec une connexion à la cellule-hôte par un mécanisme de nutrition, via l'organelle d'attachement, qui permettrait une nutrition semblable à la mésocytose présente chez les grégarines mais en plus évolué. La différence entre ces deux modes d'alimentation est que *Cryptosporidium* a développé une façon d'inciter la cellule hôte à le recouvrir de sa membrane apicale comme on peut le voir sur la figure 1 (BARDA et THOMPSON, 2006 ; BOROWSKY *et al.*, 2008).

Figure 1 : Schéma comparatif de l'interaction cellule-hôte/parasite chez les grégarines et les cryptosporidies (Source : BARTA et THOMPSON, 2006)



De plus, il existe bien une forme de reproduction asexuée par mérogonie dans le genre *Cryptosporidium* (voir le cycle de *Cryptosporidium* à la figure 4). Quant à la syzygie, elle a récemment été observée chez deux espèces de *Cryptosporidium*, à savoir *C. parvum* (ROSALES *et al.*, 2005, voir figure 2) et *C. andersoni* (HIJAWI *et al.*, 2002).

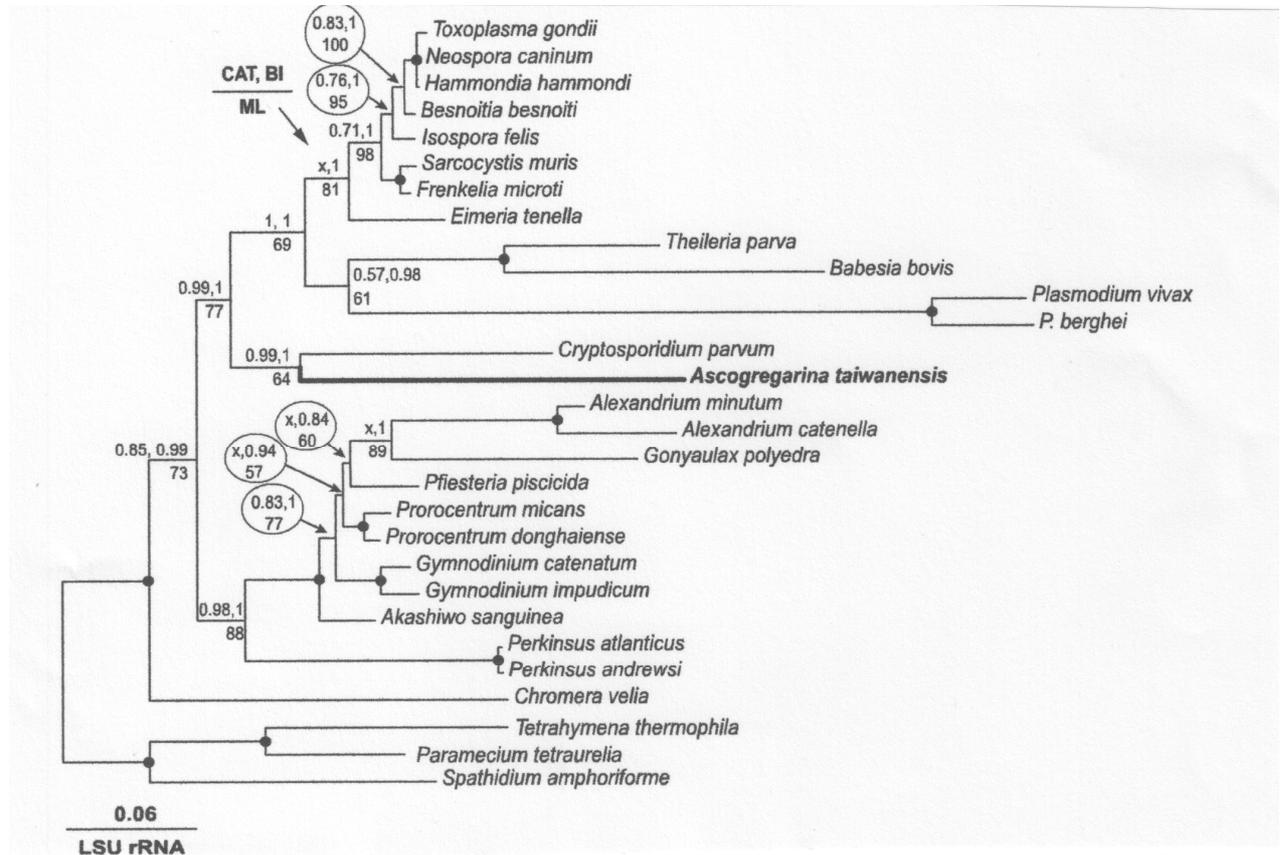
Figure 2: Image au microscope électronique à transmission d'un stade évolutif extracellulaire de *C. parvum* en syzygie dans une éprouve de culture *in vitro*; « f » correspond à la zone de fusion (Source : ROSALES *et al.*, 2005).



L'existence d'un stade adapté à la vie extracellulaire ressemblant à un stade similaire trouvé chez les grégarines a été prouvée par HIJAWI *et al.* (2002). Cela a été confirmé par les recherches de ROSALES *et al.* en 2005, qui ont mis en évidence des stades évolutifs extracellulaires ressemblant aux gamontes des grégarines, ainsi que des zygotes et des oocystes avec 8 sporozoïtes. L'existence de ces stades, en plus de remettre en cause la classification actuelle, porte à croire que le cycle évolutif du parasite comme présenté habituellement, n'est peut-être pas complet.

HIJAWI *et al.* (2002) rapportent que des chercheurs ont montré par comparaison de séquences génétiques de petites sous-unités d'ARN ribosomal de grégarines que ces dernières formaient un embranchement monophylétique proche de *Cryptosporidium* spp et séparé des autres apicomplexa dont les coccidies. Ils ont trouvé une proximité phylogénétique plus grande entre *Cryptosporidium* spp et les *Gregarinasina* qu'entre *Cryptosporidium* spp et l'embranchement contenant les *Coccidia*, les *Piroplasma*, les *Adeleorina* et les *Haemosporidia*. Ceci les a donc également amenés à remettre en cause la classification présentée ci-dessus dans le tableau 1. Des analyses phylogénétiques menées par TEMPLETON *et al.* (2010) sur la base d'analyses de protéines ou d'unités d'ARN ont également montré une forte proximité de grégarines et de *Cryptosporidium* illustrée sur la figure 3. De la même façon, ROSALES *et al.* (2005) rapportent que des chercheurs ont mené le même genre d'expériences basées ici sur la comparaison de petites sous-unités d'ADN ribosomal et de séquences de bêta-tubuline et sont arrivés à des conclusions semblables à celles citées précédemment, à savoir que les grégarines formaient un embranchement proche de *Cryptosporidium* spp, et que ce dernier était plus proche des grégarines que des coccidies.

Figure 3: Proximité phylogénétique de *Cryptosporidium* et d'une grégarine, *Ascogregarina taiwanensis* déduite sur la base de l'analyse du gène d'une grande sous-unité d'ARN ribosomal. Les 8 espèces figurant en haut de l'arbre phylogénétique sont des coccidies au sens large du terme (Source : TEMPLETON *et al.*, 2010).



Cela étant, malgré la proximité phylogénétique prouvée par de nombreuses études entre les grégarines et *Cryptosporidium* spp, il existe aussi des différences soulevées par TEMPLETON *et al.*, 2010; par exemple, les grégarines sont capables de générer de l'énergie via une chaîne de mécanismes oxydatifs complète, alors que les cryptosporidies ne font appel qu'à la glycolyse.

Ainsi, de nombreux points soutenus notamment par les avancées de la biologie moléculaire portent actuellement à penser que le genre *Cryptosporidium* est apparenté aux *Gregarinidia* comme le suggèrent de nombreux auteurs.

1.3. Espèces de cryptosporidies

1.3.1. La notion d'espèce chez les cryptosporidies

On dénombre actuellement 23 espèces de cryptosporidies parasitant les amphibiens, les reptiles, les oiseaux et les mammifères, auxquelles s'ajoutent 3 autres espèces dont les hôtes sont les poissons (Annexe 2). En plus de ces espèces reconnues et nommées, plus de 60 génotypes de *Cryptosporidium* spp dont la séquence génétique a été établie ont été recensés dans la littérature scientifique, et sont considérés comme des génotypes en attendant de voir s'ils posséderont les caractéristiques suffisantes pour être considérés comme des espèces à part entière par l'*International Code for Zoological Nomenclature* (ICZN) (FAYER, 2010 ; ELWIN *et al.*, 2012 ; SLAPETA, 2012).

En effet, il est difficile pour un genre tel que *Cryptosporidium* d'établir la notion d'espèce et d'obtenir un consensus international quand à ce qui peut officiellement être accepté comme tel. La morphologie du parasite et celle de l'oocyste ne sont en tous cas pas des critères suffisants pour différencier des espèces (XIAO *et al.*, 2004 ; FAYER, 2010).

Ainsi, les espèces acceptées comme telles doivent avoir été décrites précisément sur différents plans :

- **le plan morphologique** : en particulier, la morphologie, à savoir taille, forme et structure de l'oocyste, doivent être précisées ;
- **le plan biologique** : des précisions sur les hôtes naturellement et expérimentalement sensibles, le site de prédilection, les durées des périodes patentes et pré-patentes, et éventuellement sur le degré du pouvoir infectieux et l'intensité d'excrétion des oocystes doivent être apportés ;
- **au niveau de l'information génétique** : les différences dans les séquences de nucléotides de gènes bien connus, codant pour de l'ARNr, ou pour des protéines structurales ou fonctionnelles par exemple doivent être établies ; des séquences d'ADN doivent être déposées dans un musée ou une institution académique (XIAO *et al.*, 2000 ; FAYER, 2010).

Des différences biochimiques peuvent également aider dans la différenciation des espèces mais cela implique des méthodes coûteuses et difficiles à réaliser (XIAO *et al.*, 2004).

1.3.2. Espèces affectant les Mammifères

Une liste de 152 Mammifères chez qui une infection à *C. parvum* a pu être détectée a été dressée. Il s'agit en réalité de *C. parvum* au sens large, à savoir toutes les espèces de *Cryptosporidium* ayant des petits oocystes puisqu'aucune analyse génétique n'a été réalisée pour déterminer précisément l'espèce à laquelle on avait à faire. De nombreuses espèces que nous côtoyons telles que le cheval, la souris, le chien, le chat, le porc, la vache, le mouton peuvent être atteintes de cryptosporidiose (FAYER, 2004 et voir Annexe 2 et Annexe 3).

Nous allons décliner dans le tableau 3 qui suit les différentes espèces intéressant les mammifères actuellement recensée par l'ICZN, les hôtes principaux et certains des hôtes mineurs possiblement infectés par l'espèce en question, ainsi la localisation primaire du parasite chez l'hôte.

Tableau 3: Espèces de cryptosporidies recensées chez les Mammifères (Adapté de XIAO *et al.*, 2004 ; FAYER et SANTIN, 2009 ; FAYER, 2010 ; ROBINSON *et al.*, 2010 ; REN *et al.*, 2012 ; FAYER *et al.*, 2010 ; ELWIN *et al.*, 2012 ; SLAPETA, 2012).

Espèce	Hôtes majeurs	Hôtes mineurs	Localisation primaire chez l'hôte
<i>Cryptosporidium muris</i>	Rongeurs, dromadaires	Homme, daman du Cap, chèvre des montagnes	Gastrique
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Bovins, ovins, caprins, Homme	Biche, souris, cochon, cheval...	Intestinal
<i>Cryptosporidium wrairi</i>	Cochon d'Inde	-	Intestinal
<i>Cryptosporidium felis</i>	Chat	Homme, bovins	Intestinal
<i>Cryptosporidium andersoni</i>	Bovins, dromadaires	Moutons, humains	Gastrique (abomasum)
<i>Cryptosporidium canis</i>	Chien	Homme	Intestinal
<i>Cryptosporidium hominis</i>	Homme, singes	Dugong, moutons	Intestinal
<i>Cryptosporidium suis</i>	Cochon	Homme, bovins	Intestinal
<i>Cryptosporidium bovis</i>	Bovins	-	Non connu
<i>Cryptosporidium fayeri</i>	Kangourou	-	Non connu
<i>Cryptosporidium ryanae</i>	Bovin	Homme	Non connu
<i>Cryptosporidium macropodum</i>	Kangourou	-	Non connu
<i>Cryptosporidium xiaoi</i>	Mouton	Chèvre, yack, Homme	Non connu
<i>Cryptosporidium ubiquitum</i>	Ruminant, rongeurs, carnivores, primates dont l' Homme	-	Intestinal
<i>Cryptosporidium cuniculus</i>	Lapin	Homme	Intestinal
<i>Cryptosporidium viatorum</i>	Homme	-	Intestinal

Un point important que l'on connaît désormais, est la relative spécificité d'hôte présente dans les espèces de *Cryptosporidium*. Ainsi, bien souvent, une espèce de *Cryptosporidium* est présente très majoritairement chez une espèce donnée et peut donc sembler spécifique, mais en réalité cette spécificité n'est pas stricte, comme l'illustre notre tableau. C'est notamment à cause de cette spécificité relative, que l'on arrive à des situations de transmission zoonotique. Notons que parmi les espèces citées, c'est *C. ubiquitum* qui semble présenter le moins de spécificité, avec des hôtes comme les rongeurs, les primates, les ruminants sauvages et domestique, les carnivores et certainement encore d'autres mammifères. Une espèce telle que *C. canis* paraît déjà plus spécifique avec pour uniques hôtes connus la chien, et plus rarement l'homme.

1.3.3. Espèces affectant les ruminants domestiques

Dans le tableau 2 exposé ci-avant, 7 espèces sont connues pour infecter fréquemment des ruminants domestiques de façon naturelle : *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. ryanae*, *C. hominis*, *C. xiaoi* et *C. ubiquitum*. Les caractéristiques principales de ces espèces seront détaillées afin de voir lesquelles seront plus particulièrement intéressantes par la suite.

A l'exception de *C. bovis*, l'ensemble de ces espèces ou génotypes peuvent infecter l'homme (CHARTIER et PARAUD, 2010).

D'autres espèces ou génotypes ont déjà été retrouvés chez des ruminants mais de façon exceptionnelle et ne seront donc pas évoqués ici.

C. parvum : c'est la première espèce décrite dès 1912. Elle est présente principalement chez les jeunes animaux avant sevrage, et est responsable de signes cliniques parfois importants, notamment de diarrhée. Les bovins, ovins et caprins sont concernés par la maladie. Cette appellation a pendant longtemps regroupé toutes les espèces à « petits oocystes », d'où le fait qu'on ait dit l'avoir retrouvée chez plus de 152 hôtes. La taille moyenne des oocystes de *C. parvum* est comprise entre 4,5 et 5,4 µm pour la longueur et comprise entre 4,2 et 5,2 µm pour la largeur (CAREY *et al.*, 2004). Certaines espèces ont pu récemment être individualisées et différenciées de *C. parvum* grâce aux outils de la biotechnologie. Ainsi, de nombreuses publications antérieures à l'année 2000, parlent de *C. parvum*, sans que l'on puisse savoir s'il s'agissait de *C. parvum* ou d'espèces alors confondues, à savoir *C. bovis*, *C. ryanae*, *C. hominis*, *C. xiaoi* et *C. ubiquitum*. Cette espèce étant zoonotique, elle sera la principale étudiée lors de cette thèse (FAYER, 2010 ; XIAO, 2010).

C. andersoni : décrite en 2000, cette espèce possède des oocystes de grande taille (la longueur est comprise en moyenne entre 6,6 et 8,1 µm et la largeur entre 5,0 et 6,5 µm ; CAREY *et al.* 2004), et infecte l'abomasum des bovins. De façon plus anecdotique, elle a été retrouvée chez des ovins. Elle est très peu présente chez les veaux de moins de 2 mois et plus fréquente chez les animaux plus âgés. Elle n'est pas responsable de signes cliniques chez les animaux infectés mais plutôt de retards de croissance ou de diminutions de la production laitière. Les cas humains sont très rares. Ainsi, cette espèce sera peu abordée par la suite, étant donné son pouvoir zoonotique faible et l'absence de signes cliniques chez les animaux infectés (LINDSAY *et al.*, 2000 ; XIAO, 2010).

C. hominis : individualisée officiellement en 2002, cette espèce était auparavant connue sous le nom de *C. parvum* génotype 1 ou H ou génotype humain. Elle infecte principalement les humains chez qui elle est principalement responsable d'une atteinte digestive avec diarrhée et les cas connus chez des ruminants domestiques sont très rares. La taille moyenne des oocystes de *C. hominis* est comprise entre 4,4 et 5,4 µm pour la longueur et comprise entre 4,4 et 5,9 µm pour la largeur (CAREY *et al.*, 2004). Nous nous intéresserons donc peu à cette espèce dans la partie concernant les ruminants, mais elle sera plus amplement évoquée lorsque sera abordée la cryptosporidiose chez les humains (MORGAN-RYAN *et al.*, 2002).

C. bovis : nommée en 2005, cette espèce faisait partie de *C. parvum* au sens large puis de *C. parvum* génotype Bovin B. Elle infecte des animaux plus âgés, notamment la prévalence est beaucoup plus importante chez des animaux sevrés d'âge compris entre 3 et 11 mois (55%) que chez des animaux non sevrés de moins de 2 mois (9%) (SANTIN *et al.*, 2004). Les bovins sont les hôtes principaux et les ovins des hôtes mineurs ; les caprins sont très rarement atteints (XIAO, 2010). La taille moyenne des ookystes de *C. bovis* est comprise entre 4,76 et 5,35 μm pour la longueur et comprise entre 4,17 et 4,76 μm pour la largeur avec une moyenne de 4,89 μm X 4,63 μm . Les animaux atteints ne présentent pas de signes cliniques lors d'infection par *C. bovis* et *C. bovis* n'étant pas zoonotique, cette espèce ne sera abordée que très peu (FAYER *et al.*, 2005).

C. ryanae : nommée en 2008 et anciennement connue sous le nom de *Cryptosporidium* génotype « deer-like », cette espèce, tout comme *C. bovis*, est plus présente chez des animaux âgés ; chez des bovins de 3 à 11 mois, la prévalence est de 31% contre 5% chez des veaux non sevrés dans l'étude de SANTIN *et al.* (2004). L'hôte unique est le bovin. La taille moyenne des ookystes de *C. ryanae* est comprise entre 2,94 et 4,41 μm pour la longueur et comprise entre 2,94 et 3,68 μm pour la largeur avec une moyenne de 3,16 μm X 3,73 μm (FAYER *et al.*, 2008). N'étant pas associée à des signes cliniques importants, et son pouvoir zoonotique étant faible, cette espèce sera peu abordée (FAYER *et al.*, 2008 ; CHARTIER et PARAUD, 2010).

C. xiaoi : anciennement *Cryptosporidium* génotype « bovis-like », cette espèce nommée en 2009 dont l'hôte naturel est le mouton, semble être présente chez des animaux d'âges variés. La taille moyenne des ookystes de *C. ryanae* est comprise entre 2,94 et 4,41 μm pour la longueur et comprise entre 2,94 et 4,41 μm pour la largeur avec une moyenne de 3,94 μm X 3,44 μm (FAYER et SANTIN, 2009). Elle atteint très rarement les humains et n'est a priori pas responsable de signes cliniques marqués chez les animaux infectés d'après FAYER et SANTIN (2009). La plupart des études concernant *C. xiaoi* n'ont pas mis en évidence de signes cliniques chez les animaux porteurs d'oocystes, mais selon une étude récente de DIAZ *et al.* (2010), cette espèce pourrait être responsable de diarrhée chez des agneaux. Le pouvoir pathogène de cette espèce est donc à confirmer ou infirmer dans les années à venir.

C. ubiquitum : cette espèce a été nommée en 2010 et était avant citée sous le nom *Cryptosporidium* cervine-genotype. La taille moyenne des ookystes de *C. ryanae* est comprise entre 4,71 et 5,32 μm pour la longueur et comprise entre 4,33 et 4,98 μm pour la largeur avec une moyenne de 5,04 μm X 4,66 μm (FAYER *et al.*, 2010). Elle a été détectée dans des fèces de ruminants domestiques et sauvages à travers le monde, chez des humains et dans de nombreuses autres espèces, notamment de rongeurs, de carnivores et de primates. Chez l'homme, elle a été retrouvée dans de nombreux pays : Canada, Nouvelle Zélande, Slovaquie, Grande-Bretagne, États-Unis, Pérou. Des études récentes menées notamment en Australie, en Grande-Bretagne et aux États-Unis ont montré que cette espèce était prédominante avec *C. bovis* chez les moutons, et que *C. parvum* était largement absente. Ceci a récemment été remis en cause dans des études en Espagne et Grande-Bretagne où *C. parvum* s'est montré être le pathogène dominant chez des agneaux (XIAO et FAYER, 2008 ; XIAO, 2010).

Ainsi, nous nous intéresserons par la suite principalement à l'espèce *C. parvum* qui est l'espèce d'intérêt en médecine vétérinaire. En effet, on sait que *C. parvum* est responsable de signes cliniques importants chez les jeunes animaux porteurs, principalement de la diarrhée. Pour les autres espèces, soit leur pouvoir pathogène est faible, soit les connaissances amassées

jusque là sont peu importantes et n'ont pas encore permis d'en savoir beaucoup sur leur pouvoir pathogène ou sur le risque zoonotique qu'elles peuvent représenter.

Ce que l'on peut d'ores et déjà remarquer, c'est que pendant longtemps, avant l'utilisation des méthodes de séquençage notamment, tout oocyste de petite taille était considéré comme appartenant à *C. parvum*. Ainsi, de très nombreux cas de cryptosporidiose ont été attribués à *C. parvum* alors qu'on se rend compte désormais qu'il pouvait s'agir d'une autre espèce ou d'un autre génotype. Ainsi, lorsque l'on citera des publications datant d'avant les années 2000 ou n'ayant pas fait appel à des techniques évoluées de génotypage, et que l'on évoquera *C. parvum*, il est possible que l'on parle en fait d'une autre espèce encore alors non identifiée. C'est d'ailleurs ce qui fait toute la difficulté de l'étude de la cryptosporidiose, car les choses ne sont pas figées et les modèles, notamment lors des études épidémiologiques, sont sans cesse à ré-établir.

1.3.4. Espèces susceptibles d'infecter les humains

Chez l'homme, les 2 espèces *C. parvum* et *C. hominis* représenteraient à elles seules 80 à 97% des cas de cryptosporidiose.

D'autres espèces moins fréquemment incriminées sont *C. canis*, *C. felis* et *C. meleagridis*, *C. cuniculus*. De façon anecdotique on a retrouvé des infections à *C. muris* et *C. suis*, *C. baileyi*, *C. ubiquitum*, *C. andersoni*. Très récemment, des infections à *C. viatorum* ont été décrites chez des voyageurs. Enfin, plusieurs génotypes ont été retrouvés dans des fèces d'humains, mais on a supposé que leur présence était due à un simple transit à travers les intestins, étant donné leur nombre très faible : *C. suis*-like genotype, *C. andersoni*-like genotype, les génotypes chipmunk, skunk, horse, pig et le génotype *C. hominis* monkey (FAYER, 2004 ; XIAO et FAYER, 2008 ; NICHOLS *et al.*, 2010 ; SMITH et NICHOLS, 2010 ; CHALMERS *et al.*, 2011).

Ainsi, c'est à *C. parvum* et *C. hominis* que nous nous intéresserons principalement lorsque nous évoquerons les risques zoonotiques de la cryptosporidiose.

1.4. Cycle évolutif

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

Le cycle de *Cryptosporidium* est un cycle monoxène, à savoir qui se déroule chez un hôte unique (O'DONOGHUE, 1995).

Il peut s'effectuer en 3 ou 4 jours (ROCQUES, 2006) et la période pré-patente, de l'ingestion à l'excrétion d'oocystes, est en moyenne de 3 à 5 jours mais peut s'étendre de 2 jours jusqu'à 2 semaines (O'DONOGHUE, 1995 ; FAYER, 2004), et l'infection peut par la suite persister plusieurs mois, même si elle est de courte durée le plus souvent (O'DONOGHUE, 1995).

La période patente, à savoir la durée totale d'excrétion, est variable selon l'espèce de *Cryptosporidium* et selon l'hôte parasité. Elle est comprise entre quelques jours et quelques mois et dépend notamment de l'immunocompétence de l'hôte et de l'espèce de *Cryptosporidium* concernée (O'DONOGHUE, 1995 ; PAOLETTI, 2002).

Ce cycle a lieu dans la partie apicale (exposée à la lumière de l'organe) des cellules épithéliales. Le plus souvent il s'agit de cellules épithéliales du tubes digestif, mais il peut semblerait qu'il puisse aussi s'agir de cellules épithéliales autres, comme par exemple de cellules de l'arbre respiratoire (PETRY *et al.*, 2010) voire d'autres épithéliums: vésicule biliaire, canaux pancréatiques (FAYER, 2004).

Dans ce cycle, se déroulent différentes étapes, qui commencent par l'ingestion d'un premier oocyste (voir figure 4). Puis au sein de l'hôte, vont se succéder les étapes décrites et illustrées ci-dessous dans la figure 5:

Figure 4: Cycle oro-fécal de *Cryptosporidium* sp chez un hôte (Source : CDC (Center for Disease Control and Prevention)).

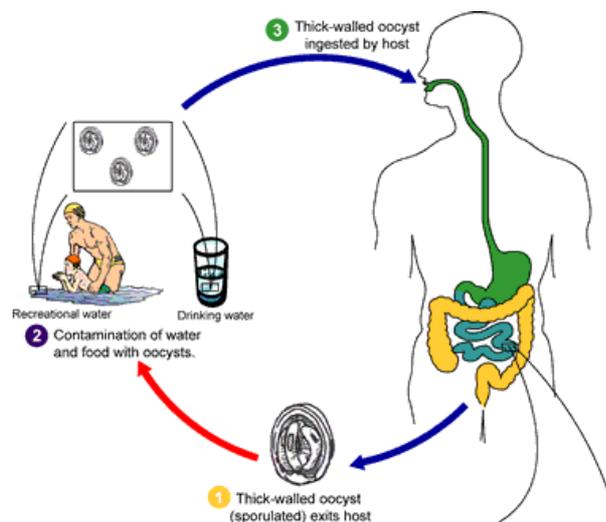
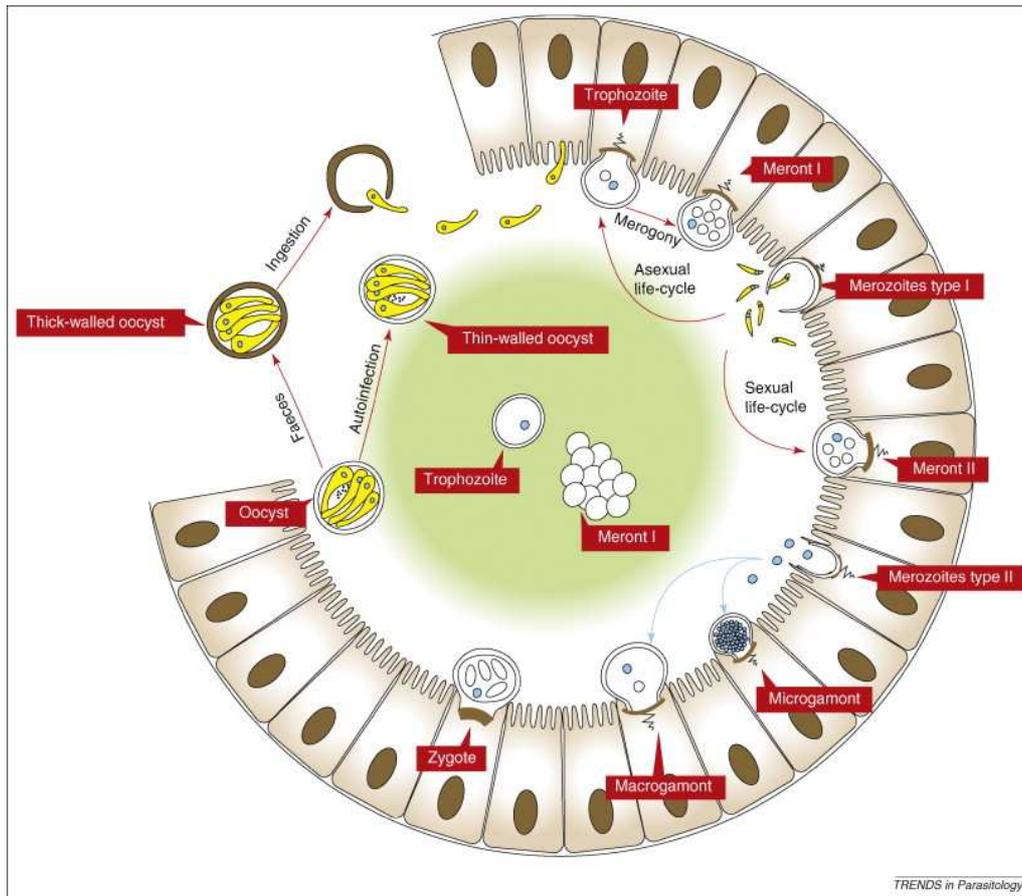


Figure 5: Cycle évolutif de *C. parvum* dans l'intestin (Source : BOROWSKI *et al.*, 2008).

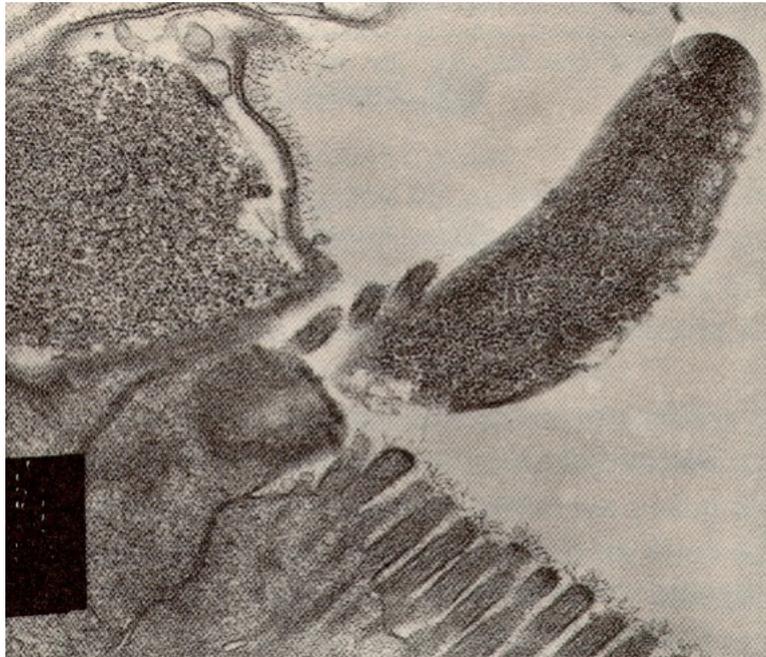


1.4.1. La phase d'excystation

Les oocystes à paroi épaisse de *Cryptosporidium* sont transmis par voie orale. Les oocystes ingérés se retrouvent dans les tractus digestif de l'hôte et subissent une **excystation** ou **dékvstement** dans l'iléon.

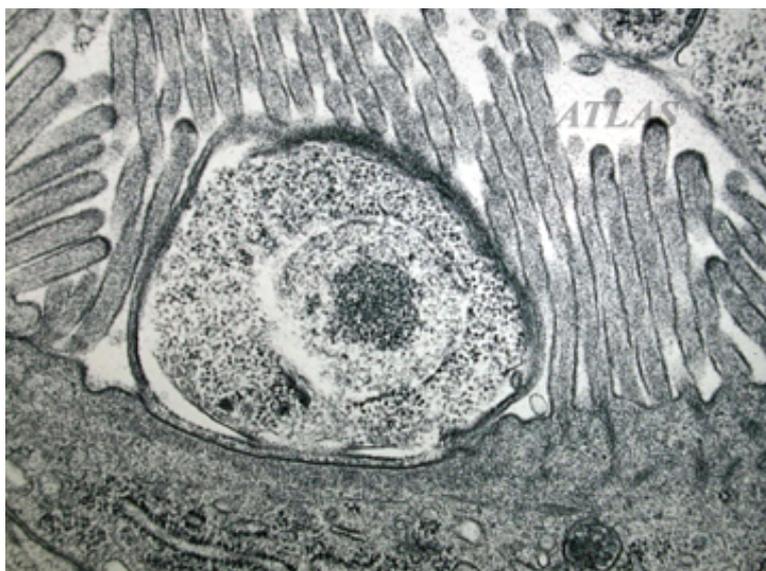
Quatre sporozoïtes infectieux sont libérés, grâce à l'altération de la paroi de l'oocyste dans le milieu intestinal (influence de la température, des conditions réductrices, de la présence de dioxyde de carbone, des enzymes pancréatiques, des sels biliaries), laissant un oocyste vide avec un corps résiduel. Les sporozoïtes s'attachent à la membrane apicale de la cellule épithéliale de la bordure en brosse (figure 6) et forment un trophozoïte (figure 7).

Figure 6: Image au microscope électronique à transmission de l'invasion d'une cellule intestinale par un sporozoïte (Source : PONCELET, 2002).



Le trophozoïte n'est pas dans le cytoplasme, il est en contact avec celui-ci par une zone d'attachement et de nutrition, on dit qu'il est en position intracellulaire mais extracytoplasmique. Il est recouvert et entouré par la membrane cytoplasmique de la cellule-hôte qui forme ce que l'on appelle une « vacuole parasitophore » (O'DONOGHUE, 1995 ; BOROWSKI *et al.*, 2008).

Figure 7: Image au microscope électronique à transmission d'un trophozoïte de *C. parvum* localisé à la surface des cellules épithéliales d'intestin (Source : KOREAN SOCIETY FOR PARASITOLOGY (KSP)).



1.4.2. La phase de mérogonie

Le trophozoïte va alors subir une **mérogonie ou schizogonie** (processus de multiplication asexuée ; figure 8) pour se transformer en méronte ou schizonte de première génération qui est le stade intracellulaire suivant, contenant 6 ou 8 mérozoïtes arrangés parallèlement les uns aux autres (figure 9). (*Remarque : les mérozoïtes sont aussi une des formes invasive de Cryptosporidium et peuvent se retrouver de façon extracellulaire dans la lumière de l'intestin.*)

Figure 8: Image au microscope électronique à transmission d'un trophozoïte en cours de mérogonie ou méronte immature (Source : KSP).



Figure 9: Image au microscope électronique à transmission d'une méronte de première génération mature contenant 8 mérozoïtes (Source : KSP).



Les mérozoïtes de type 1 sortent des mérontes de 1^{ère} génération (figure 10) pour initier soit un cycle auto-infectieux dans lequel ils envahissent les entérocytes pour former

d'autres mérontes de 1^{ère} génération, soit un cycle sexuel dans lequel ils envahissent les entérocytes pour former des mérontes de 2^{ème} génération. Ces derniers seront à l'origine de 4 mérozoïtes de type 2 (figure 11), (O'DONOGHUE, 1995 ; BOROWSKI *et al.*, 2008).

Figure 10: Image au microscope électronique à balayage d'un méronte de type 1 avec 7 mérozoïtes (m) visibles (Source : FAYER et UNGAR, 1986).

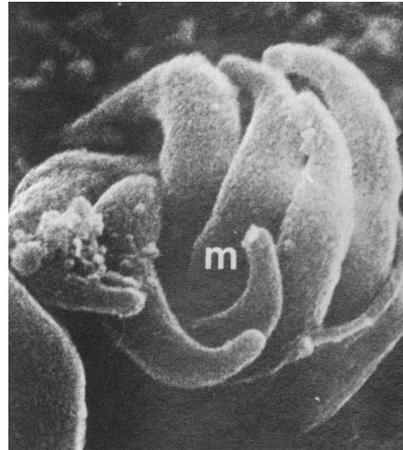
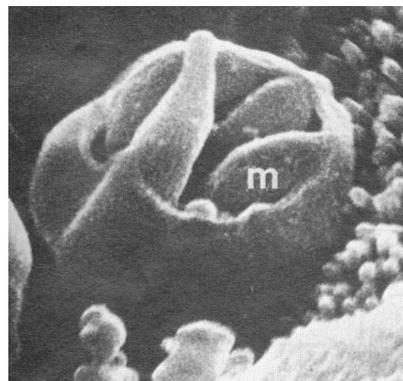


Figure 11: Image au microscope électronique à balayage d'un méronte de type 2 avec 4 mérozoïtes (m) visibles (Source : FAYER et UNGAR, 1986).



1.4.3. La phase de gamétogonie

Vient ensuite l'étape de **gamétogonie** où les mérozoïtes de type 2 sont libérés et infectent d'autres entérocytes pour former des micro- et des macrogamontes qui sont, respectivement, les stades gamontes mâle (figure 12) et femelle (figure 13) du cycle de développement de *Cryptosporidium* (O'DONOGHUE, 1995 ; BOROWSKI *et al.*, 2008).

Figure 12: Image au microscope électronique à transmission d'un microgamonte de *C. parvum* (Source : KSP).

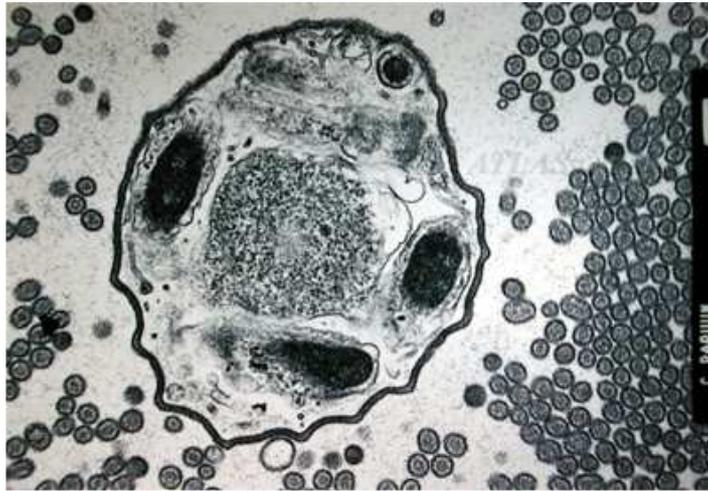


Figure 13: Image au microscope électronique à transmission d'un macrogamonte de *C. parvum* (Source : KSP).



1.4.4. Les phases de fertilisation et de sporogonies

Les microgamontes libèrent jusqu'à 16 microgamètes.

Ces microgamètes fertilisent un macrogamonte ce qui va former soit un oocyste à fine paroi, soit un oocyste à paroi épaisse (figure 14 et 15), dans lesquels auront lieu des **sporogonies** (processus de division du noyau à l'origine de la formation de 4 sporozoïtes dans l'oocyste). Les oocystes à paroi fine infecteront *in situ* les entérocytes de l'iléon de l'hôte lui-

même, via la libération des sporozoïtes qu'ils contiennent directement dans la lumière de l'intestin de celui-ci ; ceux à paroi épaisse passeront dans les fèces et se retrouveront ainsi dans le milieu extérieur (O'DONOGHUE, 1995 ; BOROWSKI *et al.*, 2008).

Figure 14: Image au microscope électronique à transmission d'un oocyste immature de *C. parvum* (Source : KSP).

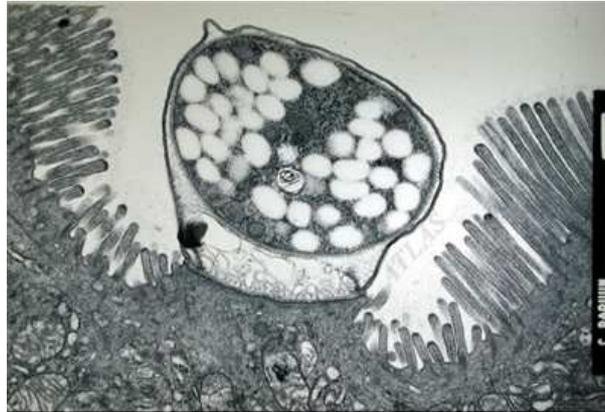
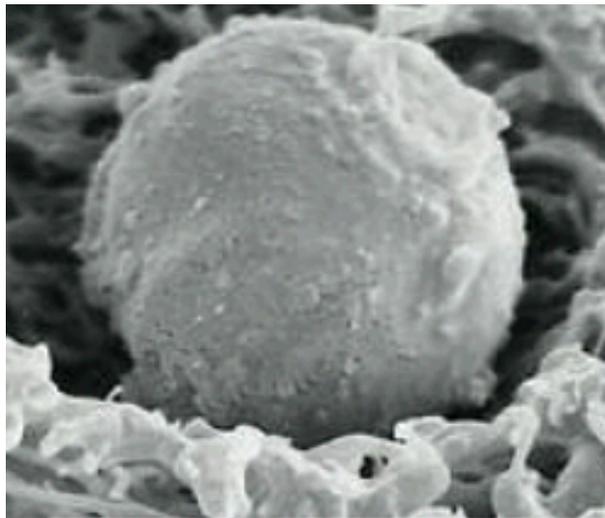


Figure 15: Image au microscope électronique à balayage d'un oocyste de *C. parvum* (Source : site internet de BioUV).



1.4.5. Particularités du cycle de *Cryptosporidium*

Il est important de noter qu'environ 20 % des oocystes produits dans l'intestin d'un hôte sont des oocystes à paroi fine donc peuvent éclore *in situ* et réinfecter ce même hôte directement (CHARTIER et PARAUD, 2010).

En outre, les oocystes de *C. parvum* rejetés dans le milieu extérieur le sont sous forme sporulée, contenant 4 sporozoïtes nus et sont directement infectants pour un autre individu qui l'ingérerait. On a donc une efficacité de surinfection de l'hôte lui-même et une rapidité

d'infection d'autres individus très importante, d'où le caractère explosif du cycle du parasite (CHARTIER et PARAUD, 2010).

Le cycle de *C. parvum* est donc un cycle très efficace et rapide, permettant à la fois des surinfections de l'hôte initial ainsi qu'une libération massive dans l'environnement d'oocystes directement infectieux.

1.4.6. Une localisation unique dans la cellule-hôte

La localisation du parasite, intracellulaire et extra-cytoplasmique est biologiquement unique (FAYER, 2004). Elle peut expliquer en partie son extrême résistance aux agents antimicrobiens.

L'accolement du zoïte (sporozoïte ou mérozoïte) à la cellule-hôte est médié par des récepteurs qui sont exprimés à la surface apicale du zoïte pendant le déchargement des organelles du pôle apical. De nombreuses enzymes sont alors libérées, notamment des rhopties et des micronèmes. Au cours de son accolement à la cellule hôte, le parasite libère également des molécules qui déclenchent des mécanismes responsables de son englobement par des prolongements de la membrane apicale de l'hôte. Ces sortes de microvillosités s'élèvent autour du sporozoïte et forment la membrane de la vacuole parasitophore qui entourera presque totalement le zoïte. Cette membrane a donc pour origine la cellule épithéliale de l'hôte.

L'organe de nutrition (figure 16) constitue un procédé unique d'attachement du parasite à la cellule-hôte, qui n'est pas sans rappeler nous l'avons vu, l'accolement des Grégarines à leurs cellules-hôtes par l'épimérite et leur alimentation par mésocytose. Il dérive à la fois de la cellule hôte et du parasite. Cette organelle se trouve à la base de chaque vacuole parasitophore. La paroi « basale » de la vacuole est pliée pour former comme une sorte de peigne qui fusionne avec les microvillosités intestinales. Ce procédé permet de faciliter le passage de nutriments du parasite à la cellule-hôte. Cette localisation très protégée est peut être une explication à la large résistance au traitement de *Cryptosporidium* sp. L'organe de nutrition pourrait bloquer l'entrée dans le parasite de molécules intracellulaires à visée thérapeutique. A l'abri dans sa loge extra-cytoplasmique, le parasite pourrait ainsi résister à l'action de molécules à activité intracellulaire (O'DONOGHUE, 1995).

Figure 16: Image au microscope à transmission de l'organe de nutrition de *C. parvum* (Source : PAOLETTI 2002).

